



**HAL**  
open science

# Sélection et intégration d'une souche probiotique fonctionnelle dans une matrice sèche

Guillaume Lemetais

► **To cite this version:**

Guillaume Lemetais. Sélection et intégration d'une souche probiotique fonctionnelle dans une matrice sèche. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS070 . tel-00993268

**HAL Id: tel-00993268**

**<https://theses.hal.science/tel-00993268>**

Submitted on 20 May 2014

**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.

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

**AGROSUP DIJON**

INSTITUT NATIONAL SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, DE  
L'ALIMENTATION ET DE L'ENVIRONNEMENT

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques

**THESE**

présentée pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Bourgogne**

**Sciences des Aliments**

Option: Génie des Procédés

Par **Guillaume LEMETAIS**

**SELECTION ET INTEGRATION D'UNE SOUCHE PROBIOTIQUE  
FONCTIONNELLE DANS UNE MATRICE SECHE**

Soutenance prévue le 19 Novembre 2012 devant la Commission d'Examen composée de:

Dr. GUILLOUET S.  
Pr. DELAUNAY S.  
Pr GERVAIS P.  
Dr BENEY L.  
Dr GRANGETTE C.  
Pr ARTUR Y.  
Dr MOLIMARD P.  
Dr RAMOS P.

INSA Toulouse  
ENSAIA Nancy  
AgroSup Dijon  
AgroSup Dijon  
Institut Pasteur Lille  
Université de Bourgogne  
Merck MF, Dijon  
Senoble, Jouy

Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse  
Examineur  
Examineur  
Invité  
Invité

## REMERCIEMENTS

Cette thèse CIFRE est le fruit d'une collaboration entre l'Unité Mixte de Recherche en Procédés Alimentaires et Microbiologiques et la société Merck Médication Familiale. Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Patrick Gervais, responsable de l'UMR PAM pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche, mais aussi pour l'attention et le soutien qu'il a portés à mon travail de doctorant.

Je remercie tout particulièrement Laurent Beney, Maître de conférences au sein de l'UMR PAM d'avoir co-dirigé cette thèse. Merci pour son intérêt permanent, son soutien constant et ses précieux conseils.

Je souhaite aussi remercier la société Merck MF qui a financé cette thèse CIFRE. J'adresse plus particulièrement mes remerciements à Pascal Molimard et Stéphanie Courau, pour leur sympathie, leur aide et leur implication dans ce projet.

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance au docteur Stéphane Guillouet, enseignant-chercheur à l'INSA de Toulouse et au professeur Stéphane Delaunay, enseignant-chercheur à l'ENSAIA-INPL de Nancy pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de recherche et membres du jury.

Mes remerciements s'adressent également aux personnes ayant participé à ce projet :

- Philippe Langella, Luis Bermudez et Jean-Marc Chatel (INRA, MICALIS) pour leurs conseils et leur aide précieuse.
- Patricia Ramos (Senoble) pour ses conseils lors des réunions de projet.
- Florian et Noura (INRA, MICALIS) pour leur sympathie et leur patience lors des points téléphoniques.

Merci à Alain Durand, Rémy Cachon et Joëlle De Coninck de m'avoir accueilli si souvent à la PPB. J'en profite pour remercier les apôtres du rédox, Romain, la Miche, Florence, Charline et Samira.

Je remercie le personnel du Laboratoire et, plus particulièrement, Jean-Marie, Stéphane, Sylvie, Eric, Laurence, Mélanie. Merci aux secrétaires qui se sont succédées et ont toujours apporté une aide précieuse : Karine, Hanene, Marie-Laure, Claudie, Hélène et Emmanuelle.

Merci au bureau du fond, Yann pour ses explications incompréhensibles lors des voyages en train, Julia et Marcia pour leur bonne humeur et leurs cours de portugais, et enfin Kirikou à qui je souhaite bon courage !

Merci à mes colocataires, Alexandre, Bruno, Pauline et Sébastien pour les bons moments passés ensemble. J'ai également une pensée pour Matthieu.

Je termine en remerciant mes parents, ma famille et mes amis pour leur soutien sans faille. Enfin, je remercie de tout coeur Stéphanie d'avoir été là.

## SYMBOLES ET ACRONYMES

### *Symboles*

$a_w$	Activité de l'eau
$H_{II}$	Phase hexagonale de type II
$L_\alpha$	Phase lamellaire liquide cristaline
$L_\beta$	Phase lamellaire gel
$P$	Pression (Pa)
$R$	Constante des gaz parfaits ( $8,31 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )
$T$	Température (K)
$T_m$	Température de transition de phase gel→liquide cristaline
$T_g$	Température de transition vitreuse
$\bar{V}_w$	Volume molaire partiel de l'eau ( $= 1,8 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ )
$\mu_w$	Potentiel chimique de l'eau dans la solution ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
$\mu_w^0$	Potentiel chimique de l'eau pure ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
$\Psi_p$	Potentiel hydrique de pression (Pa)
$\Psi_s$	Potentiel hydrique osmotique (pression osmotique $\pi = -\Psi_s$ ) (Pa)
$\frac{dV}{dt}$	Variation de volume au cours du temps ( $\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$ )

### *Acronymes*

ADN	Acide désoxyribonucléique
AsNa	Ascorbate de sodium
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
cFDA	Carboxyfluoresceine diacétate
CRO	Contract Research Organization
DO	Densité Optique
DTS	Distribution de temps de séjour
EFSA	European Food Safety Authority
FAO	Food and Agricultural Organization
GABA	Gamma-Aminobutyric acid
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
GRAS	Generally regarded as safe
HR	Humidité Relative
IgA	Immunoglobulines A
IL	Interleukines
IP	Iodure de Propidium
IRTF	Infrarouge à Transformée de Fourier
LAB	Lactic Acid Bacteria
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MRS	de Man, Rogosa et Sharpe (milieu de croissance)
NK	Natural Killer

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffer Saline
PRR	Pattern Recognition Receptor
QPS	Qualified Presumption of Safety
ROS	Reactive Oxygen Species
TIM	TNO's Intestinal Models
TLR	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultraviolet

### *Formules*

CH <sub>4</sub>	Méthane
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
H <sub>2</sub>	Dihydrogène
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
H <sub>2</sub> S	Sulfure d'hydrogène
N <sub>2</sub>	Diazote
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ion superoxyde
OH <sup>·</sup>	Radical hydroxyle

## LISTE DES PUBLICATIONS

**Lemetais G.**, Ebel B., Beney L., Cachon R., Sokol H., Langella P. and Gervais P. *Probiotics for prevention of cardiovascular diseases – A review*. Accepted in Critical Reviews in Food Science and Nutrition. DOI: 10.1080/10408398.2011.579361

**Lemetais G.**, Dupont S., Beney L. and Gervais P. *Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival*. Accepted in Applied Microbiology and Biotechnology. DOI: 10.1007/s00253-012-4014-3

Dupont S., **Lemetais G.**, Ferreira T., Cayot P., Gervais P. and Beney L. 2012. *Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land?* Evolution 66(9): 2961-2968.

**Lemetais G.**, Kechaou N., Chain F., Langella P., Gervais P. and Beney L. *Dehydration strongly impacts probiotic functionality*. Submitted.

Martin F., Ebel B., **Lemetais G.**, Nguyen Thi Minh H., Gervais P., Cachon R., Chambin O. *Use of flow cytometry to follow the viability of encapsulated Bifidobacterium bifidum subjected to a freeze-drying process*. Submitted.

## Table des matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>15</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>19</b>
<b>1. Les probiotiques et l'organisme humain</b> .....	<b>19</b>
1.1. Le microbiote intestinal, un écosystème complexe .....	19
1.1.1. Organisation du tube digestif.....	20
1.1.2. Composition du microbiote .....	22
1.1.3. Fonctions du microbiote .....	23
1.2. Utilisation de micro-organismes probiotiques.....	24
1.2.1. Descriptif .....	24
1.2.2. Mécanismes d'action .....	25
1.2.3. Importance de la viabilité dans l'effet probiotique.....	27
1.3. Effets santé attribués aux probiotiques .....	29
<b>2. Sélection et production de micro-organismes probiotiques frais</b> .....	<b>34</b>
2.1. Critères de sélection .....	34
2.1.1. Sélection des souches pour leurs aptitudes fonctionnelles .....	36
2.1.2. Sélection des souches pour leur résistance au procédé de fabrication.....	37
2.1.3. Sélection des souches pour leur tolérance aux stress du tractus gastro-intestinal .....	38
2.2. Production de biomasse.....	41
<b>3. Stabilisation de micro-organismes</b> .....	<b>47</b>
3.1. L'eau composant actif des cellules biologiques .....	47
3.1.1. L'eau comme élément structurant .....	48
3.1.2. L'eau comme solvant des réactions biochimiques .....	49
3.2. Impact du retrait de l'eau sur les cellules .....	50
3.2.1. Mécanismes à l'origine des transferts d'eau entre la cellule et son environnement..	50
3.2.2. Rôle du stress oxydant.....	53
3.2.3. Conséquences structurales et fonctionnelles du séchage sur les cellules .....	55
3.2.3.1. <i>Effet du séchage sur la membrane</i> .....	56
3.2.3.2. <i>Effet du séchage sur les autres structures cellulaires</i> .....	59
3.2.4. Maitrise des conditions de stockage .....	61
3.2.5. Maitrise des conditions de réhydratation.....	63
3.3. Techniques industrielles de stabilisation .....	64
3.3.1. La congélation .....	64
3.3.2. L'atomisation.....	65



3.3.3.	La lyophilisation.....	66
3.3.4.	Techniques de séchage alternatives.....	68
3.4.	Voies d’optimisation de la résistance microbienne au séchage.....	71
3.4.1.	Modification des conditions de culture.....	71
3.4.2.	Réalisation de pré-stress.....	71
3.4.3.	Addition de composés protectants.....	72
3.4.4.	Encapsulation.....	73
<b>4.</b>	<b>Conclusion de l’étude bibliographique et axes de recherche de la thèse.....</b>	<b>77</b>
	<b>MATERIEL &amp; METHODES.....</b>	<b>80</b>
<b>1.</b>	<b>Souches de micro-organismes et conditions de culture.....</b>	<b>80</b>
1.1.	Souches de bactéries.....	80
1.1.1.	Bactéries sélectionnées et souches de référence.....	80
1.1.2.	Conditions de culture.....	81
1.2.	Souches de levures.....	81
1.2.1.	Origine des souches.....	81
1.2.2.	Conditions de culture.....	82
<b>2.</b>	<b>Procédés de stabilisation.....</b>	<b>82</b>
2.1.	Déshydratation en milieu liquide.....	83
2.1.1.	Préparation de solutions à activité de l’eau contrôlée.....	83
2.1.2.	Protocole de déshydratation et de réhydratation.....	83
2.1.2.1.	<i>Cinétiques lentes (rampes osmotiques)</i> .....	83
2.1.2.2.	<i>Cinétiques rapides (chocs osmotiques)</i> .....	84
2.2.	Séchage.....	84
2.2.1.	Séchage sur couches minces.....	84
2.2.1.1.	<i>Protocole de déshydratation et de réhydratation</i> .....	84
2.2.1.2.	<i>Utilisation d’enceintes de séchage contrôlées</i> .....	85
2.2.2.	Déshydratation par formation de mousses.....	87
2.3.	Procédés industriels de séchage.....	87
2.3.1.	Lyophilisation.....	87
2.3.2.	Atomisation.....	87
2.4.	Test d’oxydation.....	88
2.5.	Encapsulation.....	88
2.5.1.	Procédé d’encapsulation.....	88
<b>3.</b>	<b>Mesure de la viabilité et de la fonctionnalité.....</b>	<b>89</b>

3.1.	Mesure de la viabilité .....	89
3.2.	Analyse des modifications structurales et fonctionnelles des cellules .....	89
3.2.1.	Estimation de l'intégrité membranaire (Cytométrie en flux) .....	89
3.2.2.	Estimation de l'activité enzymatique (Cytométrie en flux).....	90
3.2.3.	Dosage de l'oxydation intracellulaire (Spectrofluorimétrie).....	91
3.2.4.	Reprise de croissance (Lecteur de plaques).....	91
3.2.5.	Observation de bactéries encapsulées (Microscopie confocale) .....	92
3.2.6.	Observation de micro-domaines Sur7-GFP (Microscopie confocale).....	92
3.3.	Mesure de la fonctionnalité probiotique.....	93
3.3.1.	Mesure des propriétés immuno-modulatrices.....	93
3.3.2.	Mesure de l'hydrophobicité de surface .....	93
<b>4.</b>	<b>Caractérisation selon les critères de l'EFSA.....</b>	<b>94</b>
4.1.	Mesure de la Concentration Minimale d'Inhibition (CMI) .....	94
<b>RESULTATS &amp; DISCUSSION .....</b>		<b>96</b>
<b>1.</b>	<b>Compréhension des mécanismes mis en jeu au cours du séchage des bactéries .....</b>	<b>96</b>
1.1.	Impact du procédé de séchage sur la viabilité cellulaire .....	96
1.1.1.	Impact d'un cycle de séchage complet .....	97
1.1.2.	Impact de chaque étape du cycle de séchage.....	97
1.1.2.1.	Etape de déshydratation : Effet de la cinétique et de l'utilisation d'additifs .....	98
1.1.2.2.	Etape de réhydratation : Effet de la cinétique, de la température et de la composition du milieu .....	99
1.1.2.3.	Etape de maintien à l'état sec .....	101
1.1.3.	Impact du stress mécanique et du stress oxydant sur le taux de survie des bactéries..	104
1.1.3.1.	Etude du stress mécanique induit par le séchage.....	104
1.1.3.2.	Etude du stress oxydant induit lors du séchage .....	118
1.1.4.	Discussion .....	119
1.2.	Effet du procédé de séchage sur la fonctionnalité cellulaire .....	121
1.2.1.	Impact d'un cycle de séchage complet .....	121
1.2.2.	Impact du stress mécanique et du stress oxydant sur la fonctionnalité des bactéries..	131
1.2.3.	Discussion .....	132
<b>2.</b>	<b>Mise en place d'outils de sélection de souches probiotiques.....</b>	<b>134</b>
2.1.	Production de micro-organismes frais.....	134
2.2.	Criblage du procédé de fabrication.....	134
2.2.1.	Cycle de congélation-décongélation.....	135
2.2.2.	Cycle de séchage-réhydratation.....	136

2.2.3. Discussion .....	140
<b>3. Essais de stratégies de protection innovantes.....</b>	<b>143</b>
3.1. Séchage par formation de mousses.....	143
3.1.1. Impact des adjuvants de séchage sur le taux de survie.....	143
3.1.2. Impact des adjuvants de séchage sur l'intégrité des cellules.....	145
3.1.3. Impact des adjuvants de séchage sur la fonctionnalité probiotique.....	146
3.2. Utilisation de cinétiques lentes (encapsulation) .....	148
3.2.1. Impact sur la survie des cellules.....	148
3.2.2. Impact sur la fonctionnalité cellulaire .....	150
3.2.3. Impact sur la résistance à l'acidité gastrique .....	151
3.2.4. Mécanisme d'action.....	151
3.3. Co-séchage d'une bactérie fragile et d'une bactérie résistante.....	153
3.3.1. Discussion .....	156
<b>4. Sélection d'une souche et production industrielle .....</b>	<b>158</b>
4.1. Transposition industrielle .....	158
4.2. Production en fermenteur .....	159
4.3. Séchage.....	160
4.4. Innocuité du lyophilisat bactérien .....	161
4.5. Mise en gélule .....	162
4.6. Validation de la viabilité et de la fonctionnalité après industrialisation.....	163
4.7. Résistance aux conditions du tractus digestif.....	164
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>167</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>173</b>

## Liste des figures

**Figure 1:** Comparaison de la diversité microbienne dans le colon humain, le cæcum de souris, l'océan et le sol

**Figure 2:** Structure et conditions physicochimiques du tractus digestif

**Figure 3:** Quantité et répartition des micro-organismes le long du tractus digestif

**Figure 4:** Comparaison entre souris conventionnelles et souris axéniques

**Figure 5:** Interactions bactéries - cellules hôtes. Les micro-organismes peuvent interagir avec l'hôte au niveau des cellules dendritiques (a), des cellules épithéliales (b) ou des plaques de Peyer (c)

**Figure 6:** Nombre de cas de grippe en France métropolitaine sur la période 1997-2012

**Figure 7:** Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques destinés à l'alimentation humaine

**Figure 8:** Représentation de l'encombrement du cytoplasme d'une cellule

**Figure 9:** Arrangements possibles des phospholipides membranaires

**Figure 10:** Représentation des couches d'hydratation dans une bicouche lipidique

**Figure 11:** Représentation schématique de la variation de pression osmotique et du volume cellulaire des micro-organismes

**Figure 12:** Radicaux libres formés à partir de la molécule d'oxygène

**Figure 13:** Modifications structurales induites lors de perturbations hydriques

**Figure 14:** Taux de survie de la souche *L. plantarum* L-73 en fonction de la vitesse de déshydratation. Les cellules ont été déshydratées en présence de glycérol ( $a_w=0,11$ )

**Figure 15:** Impact du stress oxydant lors de perturbations hydriques

**Figure 16:** Impact de l'humidité relative (a) et de l'ambiance gazeuse (b) sur la survie au cours du temps de la souche *L. bulgaricus*

**Figure 17:** Taux de survie de *S. cerevisiae*, *E. coli* et *L. acidophilus* au cours du stockage

**Figure 18:** Diagramme d'état de l'eau. La flèche rouge représente l'étape de congélation

**Figure 19:** Diagramme d'état de l'eau. La flèche rouge représente le procédé d'atomisation

**Figure 20:** Diagramme d'état de l'eau. Les flèches rouges correspondent aux trois étapes du procédé de lyophilisation

**Figure 21:** Diagramme d'état de l'eau. Les flèches rouges représentent les étapes de séchage par formation de mousses

**Figure 22:** Evolution de la Tg du tréhalose, saccharose et glucose en fonction de l'hydratation

**Figure 23:** Représentation schématique de deux types de particules, les microcapsules et les microsphères

**Figure 24:** Schéma de l'installation utilisée pour déshydrater les cellules en rampe

**Figure 25:** Schéma des enceintes de séchage utilisées

**Figure 26:** Evolution de l'humidité relative dans les enceintes de séchage au cours du temps

**Figure 27:** Evolution de la masse des échantillons dans les enceintes de séchage en fonction du temps

**Figure 28:** Types de réponses obtenues par cytométrie en flux lors du passage de micro-organismes vivants ou morts, marqués et non marqués à l'IP

**Figure 29:** Type de réponse obtenue par cytométrie en flux lors du passage de micro-organismes marqués avec de l'IP et de la cFDA

**Figure 30:** Répartition des microdomaines Sur7-GFP chez la levure à l'état physiologique

**Figure 31:** Taux de survie des souches *L. plantarum*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus* et *L. zae* à un séchage par lyophilisation, sur couche mince ou par atomisation

**Figure 32:** Impact de la cinétique de déshydratation sur le taux de survie de la souche *L. bulgaricus*.

**Figure 33:** Impact des conditions de déshydratation sur la survie de la souche *L. bulgaricus*

**Figure 34:** Impact de la cinétique de réhydratation sur le taux de survie de la souche *L. bulgaricus*

- Figure 35:** Impact de la température et du milieu de réhydratation sur la survie de la souche *L. bulgaricus*
- Figure 36:** Impact des conditions d'hydratation sur le taux de survie de la souche *L. bulgaricus* au cours du stockage
- Figure 37:** Dosage de l'oxydation intracellulaire de la souche *L. bulgaricus* après séchage et stockage sous air à 4 niveaux d'hydratation
- Figure 38:** Taux de survie des souches *L. plantarum* et *L. bulgaricus* après séchage
- Figure 39:** Représentation schématique des mécanismes mis en jeu lors du séchage
- Figure 40:** Pourcentage de cellules non perméabilisées et d'activité enzymatique après congélation
- Figure 41:** Pourcentage de cellules non perméabilisées et d'activité enzymatique après lyophilisation
- Figure 42:** Pourcentage de cellules non perméabilisées et d'activité enzymatique après séchage sur couche mince
- Figure 43:** Pourcentage de cellules non perméabilisées après un stress osmotique et un stress oxydant. Le stress osmotique a été réalisé avec du NaCl et le stress oxydant avec de la ménadione
- Figure 44:** Types de mutants de *S. cerevisiae* affectés par un stress oxydant effectué avec du peroxide d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou de la ménadione (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)
- Figure 45 :** Photo des flacons après lyophilisation sans adjuvants ou séchage par formation de mousse et lyophilisation avec du tréhalose
- Figure 46:** Cultivabilité des souches probiotiques sur milieu gélosé après déshydratation par formation de mousses ou lyophilisation
- Figure 47:** Intégrité des souches *L. plantarum*, *B. bifidum* et *L. zae* après déshydratation par formation de mousses ou lyophilisation
- Figure 48:** Pourcentage d'hydrophobicité des souches après déshydratation par formation de mousses ou lyophilisation
- Figure 49:** Intégrité des souches *L. plantarum* et *L. zae* après encapsulation et séchage dans une matrice d'alginate seul ou alginate-protéines de pois
- Figure 50:** Résistance au passage de l'estomac des souches *L. plantarum* et *L. zae* encapsulées dans une matrice alginate-protéines de pois
- Figure 51:** Cinétique de séchage de la souche *L. plantarum* encapsulée dans une matrice alginate-protéines de pois
- Figure 52:** Taux de survie des souches *L. bulgaricus* (à gauche) et *B. bifidum* (à droite) après séchage dans du tampon, dans du milieu de culture ou culture séparée et co-séchage
- Figure 53:** Taux de survie de la souche *L. bulgaricus* après séchage en présence de *B. bifidum* dans du tampon, dans le milieu de culture de *B. bifidum* ou après co-culture et co-séchage
- Figure 54:** Taux de survie de la souche *L. bulgaricus* dans du milieu de culture oxydé, neutre ou réduit
- Figure 55:** Diagramme de production d'une souche probiotique
- Figure 56:** Courbe de croissance de la souche *L. plantarum* en fermenteur 5L et évolution de la concentration en glucose
- Figure 57:** Taux de survie de la souche *L. plantarum* lors d'une lyophilisation sans adjuvants et en présence du mélange sorbitol (20g/L), ascorbate de sodium (1% m/m)
- Figure 58:** Evolution de la viabilité de la souche *L. plantarum* dans les gélules à 4 °C, 25 °C et 30 °C
- Figure 59:** Quantités cumulées de souche *L. plantarum* CNRZ1997 cultivables en sortie d'iléon
- Figure 60:** Paramètres affectant la survie au séchage et stratégies de protection proposées

## Liste des tableaux

**Tableau 1:** *Micro-organismes considérés comme probiotiques*

**Tableau 2:** *Etudes cliniques chez l'homme portant sur l'effet de l'ingestion de bactéries probiotiques pour lutter contre les infections hivernales*

**Tableau 3:** *Nature et composition des milieux utilisés pour simuler le passage de l'estomac*

**Tableau 4:** *Nature et composition des milieux utilisés pour simuler le passage de l'intestin*

**Tableau 5:** *Principaux ingrédients entrant dans la composition des milieux de production des bactéries lactiques*

**Tableau 6:** *Rendement de production de souches de *B. longum* en fonction des conditions de culture*

**Tableau 7:** *Pression de turgescence de différents types de micro-organismes*

**Tableau 8:** *Constantes de vitesse des radicaux hydroxyles avec divers substrats biologiques*

**Tableau 9:** *Souches de bactéries utilisées dans cette étude*

**Tableau 10:** *Souches de levures utilisées dans cette étude*

**Tableau 11:** *Masses de glycérol/NaCl correspondant aux *aw* testées au cours de l'étude*

**Tableau 12:** *Sels utilisés pour le contrôle de l'humidité relative des enceintes de séchage*

**Tableau 13:** *Evolution de la composante pro-inflammatoire (IL-12p70) et anti-inflammatoire (IL-10) de la souche *L. bulgaricus* lors d'un stress oxydant et d'un stress osmotique*

**Tableau 14:** *Productivité des différentes souches du projet*

**Tableau 15:** *Pourcentage de viabilité (IP) des souches du projet après différentes perturbations représentatives du procédé de fabrication ou du tractus digestif*

**Tableau 16:** *Pourcentage d'activité enzymatique (cFDA) des souches du projet après différentes perturbations représentatives du procédé de fabrication ou du tractus digestif*

**Tableau 17:** *Classement de la résistance des souches du projet selon le type de séchage*

**Tableau 18:** *Evolution de la composante pro-inflammatoire (IL-12p70) et anti-inflammatoire (IL-10) de la souche *B. bifidum* après séchage par formation de mousses et lyophilisation*

**Tableau 19:** *Evolution de la composante pro-inflammatoire (IL-12p70) et anti-inflammatoire (IL-10) des souches *L. plantarum* et *L. zeae* après encapsulation et séchage dans une matrice alginate-protéines de pois*

**Tableau 20:** *Valeurs des principaux paramètres physicochimiques avant séchage*

**Tableau 21 :** *Conditions de culture testées et retenues pour la production industrielle de la souche *L. plantarum* CNRZ 1997*

**Tableau 22:** *Détermination des concentrations minimales inhibitrices (méthode Etest®, BioMérieux)*

**Tableau 23 :** *Composition des gélules vérum réalisées par la société Novéal*

*INTRODUCTION*

## INTRODUCTION

A l'heure où l'on recherche des traces de vie microbienne dans notre système solaire et même au-delà, le tube digestif humain constitue un écosystème complexe largement inconnu. En effet, il est généralement admis que pour chaque cellule de notre organisme, le corps humain contient également 1 archée, 10 bactéries et 100 virus. Ces organismes interagissent entre eux mais communiquent également avec l'hôte. La présence de ce microbiote favorise la digestion et permet le développement du système immunitaire. L'idée de consommer des micro-organismes pour orienter le comportement de cette flore ou de pallier les insuffisances dans le cas de pathologies a donné naissance au concept de probiotiques. Depuis plusieurs années, l'ingestion de micro-organismes bénéfiques fait l'objet d'études cliniques de plus en plus nombreuses. Ainsi, la maîtrise des étapes de sélection de souches fonctionnelles capables d'induire une réponse du microbiote et/ou de l'hôte (criblage) et de stabilisation de ces micro-organismes sur de longues périodes est d'un intérêt industriel majeur.

L'étape de criblage nécessite la mise en place de tests simples et représentatifs pour éviter de tester un trop grand nombre de souches chez l'humain (coût financier, protocoles lourds...). En effet, si les microbes sont présents en très grand nombre dans l'intestin et dans l'environnement, toutes les espèces ne sont pas actives dans le tractus et toutes ne sont pas cultivables par les méthodes de microbiologie classiques. Une fois sélectionnée, la souche probiotique doit être cultivée puis stabilisée, le plus souvent par déshydratation. En effet, l'eau est un élément essentiel à la croissance et à l'activité des micro-organismes. Elle structure les macromolécules et favorise les échanges. Le séchage, en retirant l'eau intracellulaire permet de stabiliser les cellules sur de longues périodes et de les conserver à l'état viable et revivifiable. Trois techniques sont majoritairement utilisées à l'échelle industrielle pour produire des micro-organismes secs en grand nombre : la lyophilisation, l'atomisation et la fluidisation. Mais ces techniques peuvent être fortement létales. Il est donc nécessaire de protéger les micro-organismes puisque, selon la réglementation, un probiotique doit être consommé vivant. Un des moyens classiquement utilisé pour protéger les cellules est l'ajout de protectants (perméants, vitrifiants, anti-oxydants). D'autres alternatives, comme la maîtrise des cinétiques de déshydratation et de réhydratation ou encore l'encapsulation permettent également de mieux préserver les cellules. De plus, si la viabilité est un paramètre souvent mis en avant dans les études scientifiques, très peu se sont intéressées à la fonctionnalité des micro-organismes après séchage.



Depuis plusieurs années, l'Unité Mixte de Recherche Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM, AgroSup Dijon, uB) étudie la réponse physique et biologique des cellules soumises à différentes perturbations de leur environnement (Hydratation, Température, Pression, Oxydation).

Ce travail de thèse s'intègre au sein d'un programme collaboratif FUI (Programme « Probiotique ») labélisé par le pôle de compétitivité Vitagora et financé par l'état, la région Bourgogne et le Grand Dijon. Il regroupe, en plus de l'UMR PAM (AgroSup Dijon, uB) et de la société Merck Médication Familiale, le laboratoire Unité Ecologie et Physiologie du Système Digestif de l'INRA de Jouy-en-Josas et la société Senoble. L'objet du programme global de recherche est de développer une nouvelle génération de produits probiotiques fonctionnels possédant des effets immuno-modulateurs et/ou antioxydants pour les filières hydratées (yaourt) et déshydratées (complément alimentaire). Le but de cette thèse est de sélectionner et d'intégrer une souche probiotique immuno-modulatrice dans une matrice sèche. Dans ce document, les travaux réalisés conduisent à des développements susceptibles de déboucher sur des applications industrielles.

La première étape, menée par l'INRA de Jouy-en-Josas a été de constituer une collection de 158 souches probiotiques et de tester leur aptitude à moduler la réponse immunitaire sur des modèles cellulaires. Les souches présentant la meilleure fonctionnalité ont été sélectionnées et testées chez l'animal (souris). En parallèle, ces bactéries ont été transmises à l'UMR PAM (AgroSup Dijon, uB) pour évaluer leurs résistances au procédé de fabrication et aux perturbations du tractus digestif. En fonction de ces résultats, une souche a été choisie, intégrée dans une matrice protectrice, produite industriellement et fait actuellement l'objet d'une étude clinique randomisée en double aveugle contre placebo. Le travail présenté ici se focalise sur les étapes de sélection de bactéries probiotiques et d'optimisation de leur déshydratation. Pour cela, différentes techniques de séchage ont été comparées en s'intéressant aux conséquences des perturbations mécaniques et oxydatives sur la survie cellulaire et l'effet probiotique. La compréhension de ces phénomènes a ensuite permis la mise en place de tests de criblage pour mesurer et prédire la résistance des souches du projet aux perturbations induites par le procédé de fabrication. Enfin, plusieurs stratégies d'optimisation de la viabilité et de maintien de la fonctionnalité ont été développées. Cette étude ayant démarré simultanément à la phase de criblage des 158 souches, les expérimentations ont été réalisées sur trois micro-organismes modèles (*Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Saccharomyces cerevisiae*) et sur la souche finale du projet (*Lactobacillus plantarum*).

La première partie de ce mémoire, correspondant à l'analyse bibliographique, rappelle le cheminement conduisant à l'industrialisation d'un produit probiotique sec. La seconde partie de ce document rassemble le matériel et les méthodes utilisés au cours de ce travail de recherche. La troisième partie expose et discute les résultats obtenus. Enfin, la conclusion générale reprend les principaux points développés et proposent une démarche de sélection d'une nouvelle bactérie probiotique.

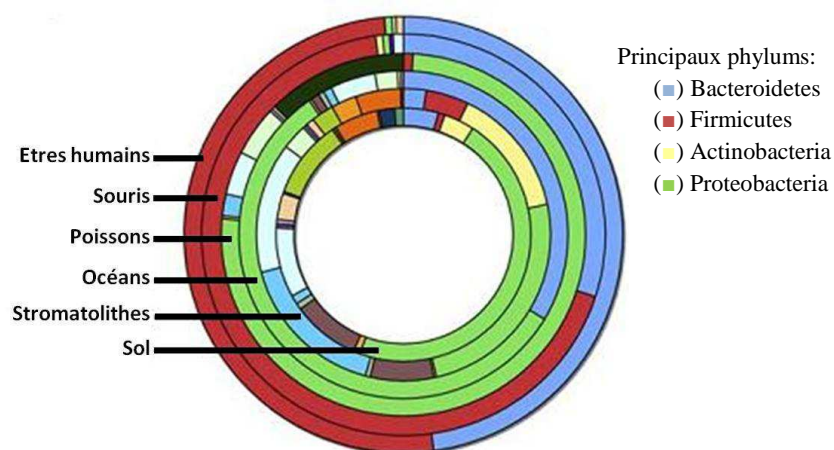
*PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE*

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Les probiotiques et l'organisme humain

#### 1.1. Le microbiote intestinal, un écosystème complexe

Le tractus gastro-intestinal humain est un environnement riche au sein duquel 100 mille milliards de microbes ( $10^{14}$ ) cohabitent. La grande majorité de ces organismes se retrouve au niveau du colon ( $10^{11}$ - $10^{12}$ /mL), soit la plus grande concentration connue de microbes dans un écosystème (Ley et al. 2006a; Whitman et al. 1998). Ils contribuent à l'extraction de l'énergie des aliments ou au maintien de l'homéostasie intestinale. Par son rôle et sa complexité, ce microbiote est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière (Backhed et al. 2005; Zocco et al. 2007). Ainsi, une modification de profil du microbiote est souvent associée à des pathologies intestinales ou à l'obésité (Ley et al. 2006b). A l'heure actuelle, environ 80% des espèces bactériennes du colon ne sont pas cultivables en routine par les méthodes de microbiologie conventionnelle (Blaut et al. 2002; Charalampopoulos and Rastall 2009; Duncan et al. 2007). Les estimations sur le nombre de micro-organismes varient entre 500 et 1000 espèces différentes, soit plus de 7000 souches dont la grande majorité fait partie des phylums des Firmicutes et des Bacteroidetes et environ 2000 gènes distincts (Charalampopoulos and Rastall 2009; Hooper and Gordon 2001; Ley et al. 2006a). Par comparaison avec d'autres habitats, les tractus digestifs humains et murins contiennent une faible diversité de phylums majoritaires (Figure 1).



**Figure 1:** Comparaison de la diversité microbienne dans le colon humain, le cæcum de souris, l'océan et le sol (Ley et al. 2006a)

A l'origine, le tube digestif de l'enfant est stérile *in utero*. Les premières colonisations se font principalement par l'intermédiaire de la flore vaginale, intestinale et cutanée de la mère lors

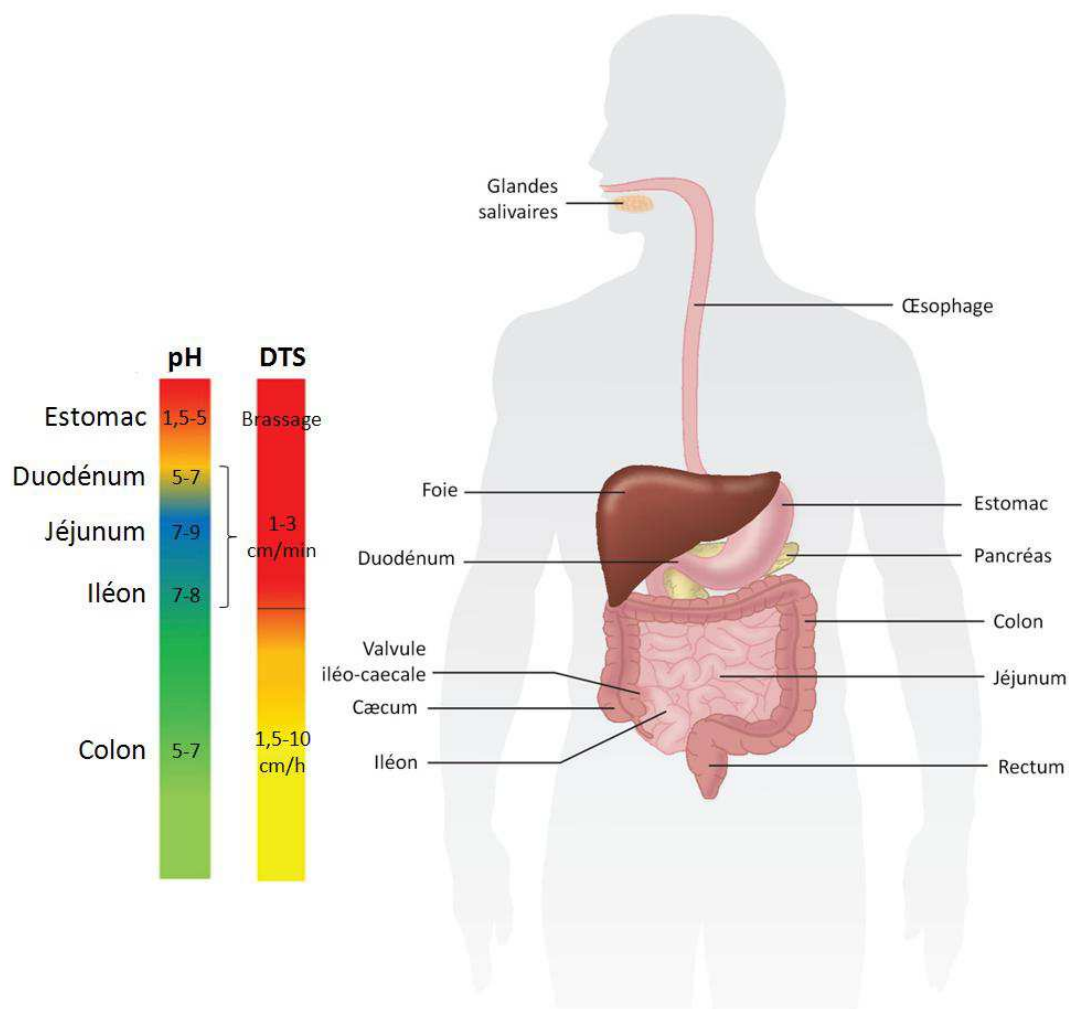
de l'accouchement (O'Hara and Shanahan 2006). Il semble également que les conditions d'hygiène, différentes entre pays nordiques et méditerranéens par exemple, soient à l'origine de colonisations diverses (Adlerberth and Wold 2009; Lindberg et al. 2004). Avec les années, l'évolution de la composition du microbiote va être soumise à des facteurs génétiques (Zoetendal et al. 2001), environnementaux et alimentaires (Ley et al. 2006a; Turnbaugh et al. 2008; Turnbaugh et al. 2007). Par exemple, il a été observé sur des populations japonaises que leur flore intestinale a acquis de nouvelles capacités enzymatiques en intégrant un gène provenant de bactéries allochtones (Hehemann et al. 2010). De façon globale, trois enterotypes différents sont identifiables chez l'homme, les « Bacteroides majoritaires », les « Ruminococcus majoritaires » et les « Prevotella majoritaires » (Arumugam et al. 2011; Wu et al. 2011). Cependant, malgré la présence d'espèces et de souches différentes, le microbiome inter-individu apparaît largement équivalent en terme de fonctionnalité (Qin et al. 2010; Turnbaugh and Gordon 2009; Walter and Ley 2011). L'organisation exacte de ce microbiote est encore majoritairement inconnue mais les études récentes montrent que la communauté microbienne intestinale se structure (Macfarlane and Dillon 2007) et communique (Hughes et al. 2010). Enfin, chez l'individu sain, la composition de la flore intestinale est très stable au cours du temps même si des variations ponctuelles peuvent être observées (prise d'antibiotiques, hygiène, stress, changement de régime alimentaire...) (Sonnenburg et al. 2004; Walter 2008).

#### 1.1.1. Organisation du tube digestif

Le système digestif est divisé en sections distinctes, comportant chacune une flore microbienne spécifiquement adaptée aux conditions physico-chimiques. Ainsi, le tube digestif est composé de la cavité buccale, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), du gros intestin (côlon ascendant, côlon transversal et côlon descendant) puis du rectum et de l'anus (Figure 2).

Le premier compartiment, l'estomac, est un réservoir (~1,3 L) dans lequel le chyme alimentaire est brassé et imprégné par les sucs gastriques. Le jus stomacal est constitué de mucus, de pepsinogène (converti en pepsine), d'acide chlorhydrique, de facteur intrinsèque et de gastrine (Wilson 2008). Le chyme passe ensuite dans l'intestin grêle. Ce dernier mesure entre 4 et 7 mètres chez l'homme et comprend le duodénum (~0,25 m), le jéjunum (~2,5 m) et l'iléon (~3,5 m). Les parois mesurent 20 µm d'épaisseur (Ismail and Hooper 2005) et sont recouvertes de villosités et de microvillosités formant une bordure en brosse. Les sécrétions

intestinales maintiennent un pH légèrement basique ( $7 < \text{pH} < 8$ ) et la quantité d'oxygène diminue. C'est au niveau de l'intestin grêle que les composés alimentaires sont dégradés en sucres simples, acides aminés et acides gras qui vont être absorbés. Les sels biliaires, le suc pancréatique et les enzymes (protéases, lipases et amylases) permettent la digestion du chyme alors que les composés non digérés (fibres, amidon résistant, quelques peptides et lipides) passent dans le gros intestin (Walter and Ley 2011). L'iléon comporte, dans sa partie distale, des agrégats de follicules lymphoïdes appelés « plaques de Peyer ». Ces follicules sont composés de cellules particulières qui échantillonnent le contenu luminal, les « cellules M », et représentent l'un des sites d'induction de la réponse immunitaire de l'intestin (GALT) (Walter and Ley 2011).



**Figure 2:** Structure et conditions physicochimiques du tractus digestif (Walter and Ley 2011)

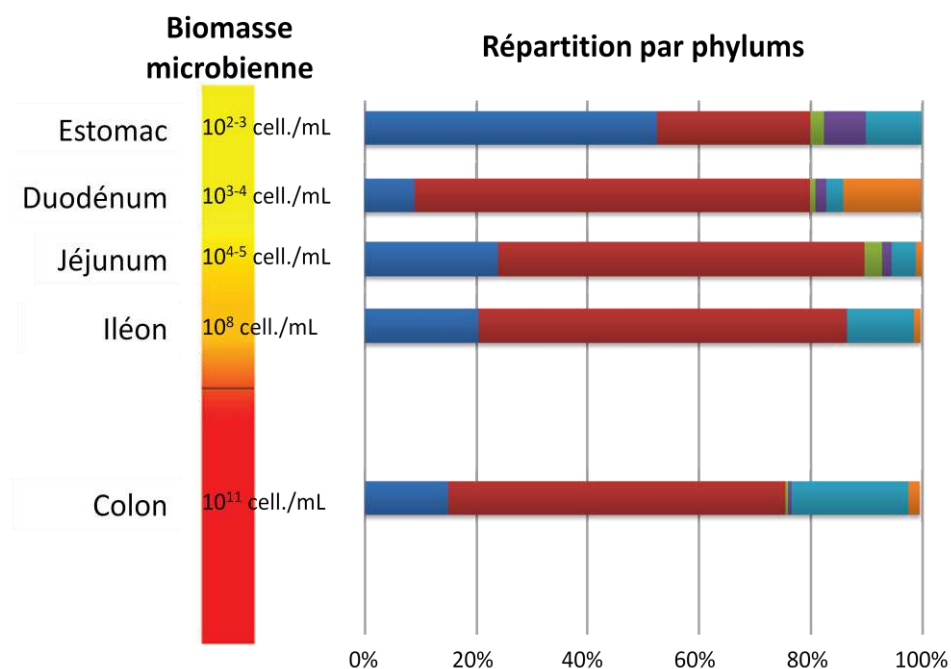
Les valeurs indiquées de pH et de distribution de temps de séjour (DTS) représentent des valeurs moyennes par section

Enfin, le gros intestin est beaucoup plus court que le grêle (~1,5 m) mais le temps de transit y est largement supérieur (Fonty and Chaucheyras-Durand 2007). Il comprend le cæcum, le colon (ascendant, transverse, descendant et enfin, sigmoïde). Le pH est légèrement acide dans la partie proximale du gros intestin et augmente progressivement jusqu'à la neutralité, le

péristaltisme ralentit et le potentiel d'oxydoréduction diminue fortement. De plus, la forte concentration de micro-organismes entraîne la production de gaz ( $H_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2S$ ,  $CH_4$ ). Le colon ascendant peut être assimilé à un fermenteur semi-continu et le colon descendant à un système batch (Fonty and Chaucheyras-Durand 2007). A la différence de l'intestin grêle, le colon ne contient pas de villosités mais un épithélium de surface.

### 1.1.2. Composition du microbiote

Les régions distinctes du tube digestif créent des habitats uniques au sein desquels les espèces autochtones occupent des niches écologiques et forment des populations stables dans le temps (Savage 1977; Walter and Ley 2011). Chaque jour, environ  $10^{10}$  micro-organismes transitent par l'estomac et se retrouvent dans un environnement hostile (acidité,  $O_2$ ...), en présence de souches acidotolérantes. La quantité de bactéries résidentes de l'estomac est d'environ  $10^2$ - $10^3$  par mL (Figure 3), dont 50 % font partie du phylum des Proteobacteria (surtout des Enterobacter et *Helicobacter pylori*) (Wilson 2008). On retrouve également des levures du genre Candida. Dans l'intestin grêle, la densité cellulaire passe de  $10^3$ - $10^4$  cellules/mL au niveau du duodénum à  $10^8$  cellules/mL dans l'iléon (Walter and Ley 2011). Ce sont surtout des Firmicutes. Malgré la présence de composés antimicrobiens (sécrétions biliaires et pancréatiques) la quantité de micro-organisme est multipliée par un chiffre compris entre 10 000 et 100 000 entre le duodénum et l'iléon.

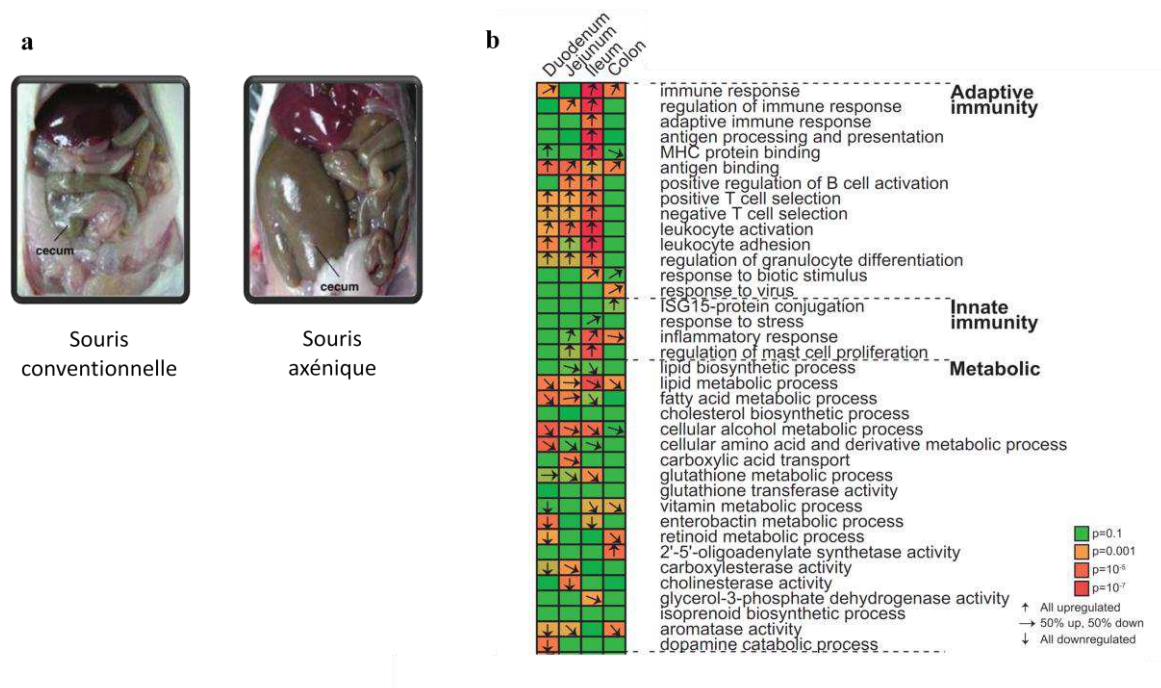


**Figure 3:** Quantité et répartition des micro-organismes le long du tractus digestif (Walter and Ley 2011; Wilson 2008) - Proteobacteria (■), Firmicutes (■), Fusobacteria (■), Actinobacteria (■), Bacteroidetes (■), Autres (■)

Au niveau du gros intestin, la quantité de micro-organismes croît fortement (Wilson 2008), allant jusqu'à représenter 50 % du volume du contenu (Cummings 1998). Parmi les  $10^{13}$ - $10^{14}$  micro-organismes présents, la grande majorité sont des bactéries anaérobies strictes du phylum des Firmicutes, des Bacteroidetes (*Bacteroides* spp, *Clostridium* spp) ou des Actinobacteria (*Bifidobacterium* spp, *Atopobium* spp) même si des bactéries anaérobies facultatives sont également présentes (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*). On note la présence de Proteobacteria (*Escherichia coli*). Enfin, en dehors de cette flore majoritaire, on retrouve également, en quantité moindre, des archées, des protozoaires et des champignons (Walter and Ley 2011).

### 1.1.3. Fonctions du microbiote

Le microbiote intestinal représente une communauté fonctionnelle pour l'hôte qui l'héberge à demeure. Tout d'abord, la présence microbienne influence la structure et l'organisation du tractus (Figure 4a). Chez des souris axéniques, l'absence de flore entraîne une réduction de la vascularisation de l'intestin, de la production de cytokines, des activités enzymatiques digestives mais aussi la présence d'une couche de mucus plus importante et un besoin calorique supérieur (Hooper 2004; Shanahan 2002). En effet, il a été démontré que les populations microbiennes du tractus contribuaient à l'absorption des nutriments (glucides, lipides) et régulaient le stockage des graisses (Backhed et al. 2004; Backhed et al. 2005).



**Figure 4:** Comparaison entre souris conventionnelles et souris axéniques. (a) Photo de la cavité abdominale (Guarner 2012), (b) Comparaison de la régulation de gènes intestinaux pour des souris conventionnelles vs axéniques (Larsson et al. 2011)



Le microbiote participe à la décomposition des substances non digérées, à la production de vitamines et à la régulation de la physiologie intestinale. Les glucides sont transformés en acides organiques et en acides gras à chaîne courte (acétate, butyrate...) (Gibson and Roberfroid 1995; Rumney and Rowland 1992), bénéfiques pour les colonocytes ou la prévention contre l'infection (Fukuda et al. 2011; Pryde et al. 2002). La flore intestinale joue aussi un rôle important dans la maturation et la stimulation du système immunitaire intestinal de l'hôte (Macpherson and Harris 2004; Mazmanian et al. 2005). Enfin, la présence de micro-organismes module l'expression des gènes de l'intestin (Figure 4b), cette transcription se révélant même, souche dépendante (Hooper et al. 2001; Larsson et al. 2011). Cette dernière étude montre que les gènes impliqués dans les réponses immunitaires et le métabolisme sont principalement régulés par le microbiote intestinal dans l'intestin grêle, et notamment l'iléon dans le cas de l'immunité acquise.

## 1.2. Utilisation de micro-organismes probiotiques

### 1.2.1. Descriptif

L'écosystème intestinal est un milieu en perpétuel déséquilibre, constamment perturbé par le flux de nutriments et de micro-organismes. Ainsi, la flore résiliente, les cellules immunitaires et les cellules épithéliales interagissent entre elles pour rétablir un équilibre provisoire. Cependant, d'autres facteurs peuvent agir sur cet écosystème. Par exemple, les probiotiques par leur présence et/ou leur activité(s) communiquent avec le microbiote et les cellules de l'organisme hôte. Au début du XX<sup>ième</sup> siècle, Elie Metchnikoff (1845-1916) fut le premier à développer l'idée de bactéries bénéfiques pour la santé. Selon ce dernier, la bonne santé et la longévité de certains groupes ethniques étaient dues à leur ingestion fréquente de produits laitiers fermentés. Bien plus tard, un groupe de travail mixte, combinant l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), a défini officiellement les probiotiques comme étant "*des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un effet bénéfique pour la santé de l'hôte*". Aujourd'hui, plusieurs espèces microbiennes sont considérées comme probiotiques (Tableau 1).

**Tableau 1:** Micro-organismes considérés comme probiotiques (Holzapfel et al. 2001; Holzapfel et al. 1998)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres LAB	Bactéries non LAB
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>E. coli</i> Nissle 1917
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Pediococcus acidolactici</i>	<i>cerevisiae</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>thermophilus</i>	<i>boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>		<i>Sporolactobacillus</i>	
<i>L. gasseri</i>		<i>inulinus</i>	
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			
<i>L. sakei</i>			

### 1.2.2. Mécanismes d'action

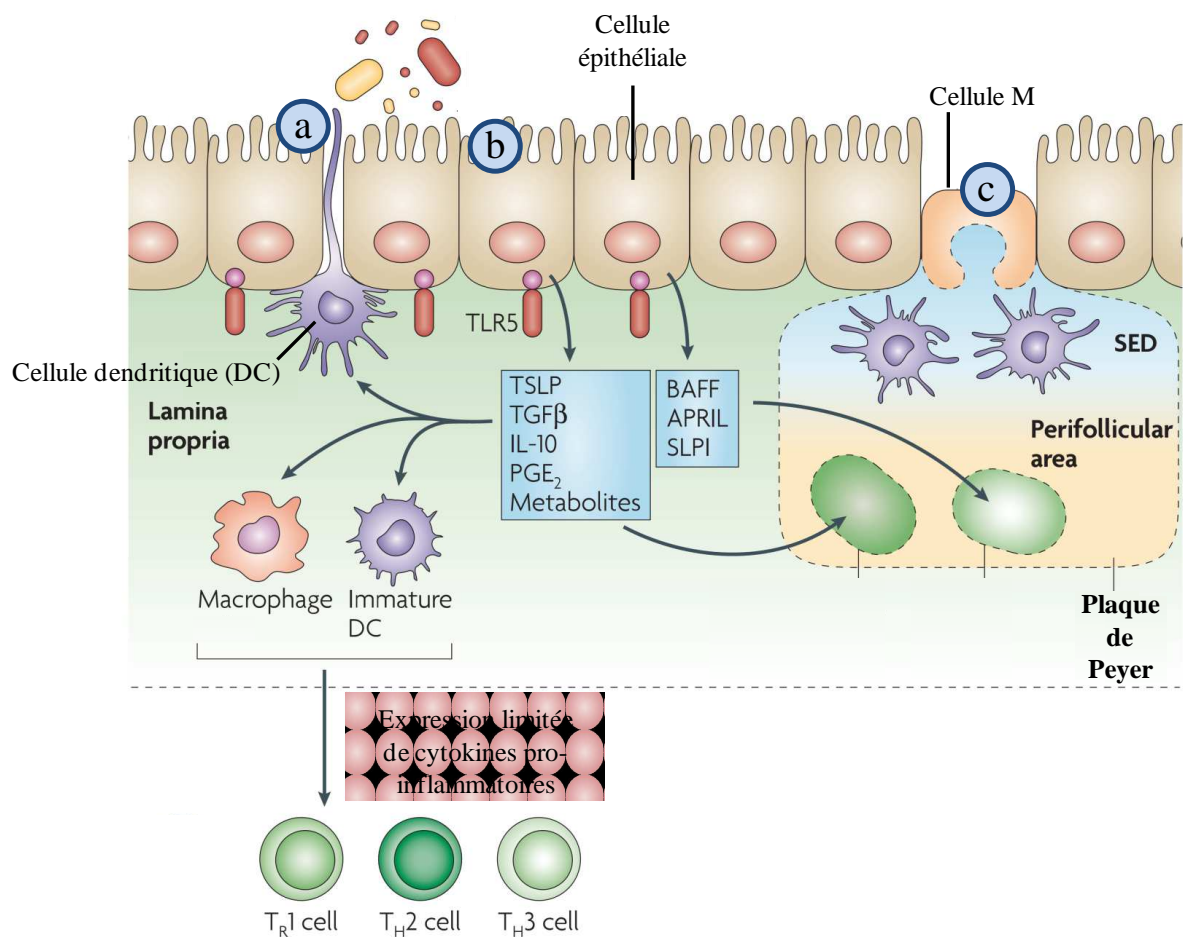
Les effets des micro-organismes probiotiques varient selon les souches et résultent généralement de mécanismes complexes, souvent non totalement élucidés. Ces effets sont dus, soit à la présence de la souche, soit à une interaction avec la flore autochtone/le système immunitaire. Il est généralement admis que les probiotiques contribuent à l'homéostasie intestinale par quatre grands modes d'action :

- Amélioration des fonctions digestives
- Exclusion ou inhibition des pathogènes
- Renforcement de la fonction barrière de l'intestin
- Modulation du système immunitaire

Concernant le premier point, la présence de la souche bénéfique va permettre la digestion de nutriments (Fuller 1991) ou la production de vitamines. De plus, la colonisation de la muqueuse associée à une rémanence de quelques heures à quelques semaines va avoir pour conséquence une évolution transitoire de la composition et/ou de la fonctionnalité de la flore. La sécrétion d'antimicrobiens (peroxyde d'hydrogène, acides organiques, bactériocines, antibiotiques), la diminution du pH luminal ou encore l'inhibition par compétition limitent l'adhésion d'autres bactéries aux cellules épithéliales (Ingrassia et al. 2005; Ouwehand et al. 2002). De plus, certaines souches sont capables d'interagir avec les cellules hôtes pour modifier la production de défensines, induire la sécrétion de mucus, augmenter la production d'IgA ou inhiber la translocation bactérienne (Corthésy et al. 2007). Ces effets favorisent le

renforcement de la fonction barrière. Enfin, les probiotiques peuvent moduler la réponse immunitaire de l'hôte au niveau local et au niveau systémique en induisant la synthèse de cytokines pro/anti-inflammatoires.

Ces échanges entre procaryotes et cellules eucaryotes se font à travers la production de métabolites (Sokol et al. 2008) ou par contact direct (Lebeer et al. 2010). Ainsi, les interactions avec l'hôte ont lieu dans le tractus, au niveau des cellules dendritiques, des cellules épithéliales ou des plaques de Peyer (Figure 5). Les cellules de l'hôte expriment des récepteurs particuliers, les Pattern Recognition Receptor (PRR), qui vont pouvoir reconnaître des motifs bactériens spécifiques. Parmi ces PRR, les récepteurs toll-like (TLRs), qui sont des protéines transmembranaires présentes à la surface ou sur les organites cellulaires, sont les mieux caractérisés (Kumar et al. 2009).



**Figure 5:** Interactions bactéries - cellules hôtes. Les micro-organismes peuvent interagir avec l'hôte au niveau des cellules dendritiques (a), des cellules épithéliales (b) ou des plaques de Peyer (c) (Artis 2008).

L'interaction motif bactérien-TLR induit alors une cascade de signaux intracellulaires conduisant à la translocation nucléaire de facteurs de transcription et à la libération de cytokines. Les structures bactériennes à l'origine de l'effet probiotique ne sont pas totalement

caractérisées. Cependant, il semble que le peptidoglycane, les acides teichoïques, les pili, les polysaccharides et l'acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien (Klinman et al. 1996) soient fortement associés à la reconnaissance (Grangette et al. 2005; Lebeer et al. 2012; Lebeer et al. 2010). Liu et al., ont décrit un effet immunostimulant et antioxydant d'exopolysaccharides de *L. plantarum* et *L. paracasei* (Liu et al. 2011). Récemment, il a été montré que la présence d'une enzyme, la cyclopropane acid synthase, était essentielle dans l'effet anti-inflammatoire de la souche *L. reuteri* (Jones et al. 2011). Les recherches actuelles suggèrent également que les bactéries du tractus peuvent communiquer avec le système nerveux central, via le nerf vague, même en l'absence de réponse immunitaire (Bravo et al. 2011; Logan and Katzman 2005). Ainsi, chez la souris, la consommation de la bactérie *L. rhamnosus* JB-1 a pour conséquences des modifications des récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et une réduction de l'anxiété.

### 1.2.3. Importance de la viabilité dans l'effet probiotique

Au niveau réglementaire, les micro-organismes probiotiques doivent forcément être consommés vivants. Cependant, quelques travaux se sont intéressés au rôle de la viabilité sur le potentiel probiotique. Certaines études décrivent un impact supérieur des bactéries vivantes. Par exemple, la souche *L. rhamnosus* GG vivante ( $10^{10-11}$  Unité Formant Colonie (UFC)/jour) montre une efficacité supérieure sur la souche morte (10 min., ~85-100 °C) dans le traitement de la diarrhée aux rotavirus chez l'enfant (Kaila et al. 1995). De même, des patients atteints de pancréatite recevant la souche vivante de *L. plantarum* 299v ( $10^9$  UFC/jour) avaient moins d'infections que ceux recevant la souche inactivée thermiquement (Kecskés et al. 2003). Plus récemment, la capacité de la souche *B. animalis* DN 173010 à déconjuguer les sels biliaires, *in vivo*, a été trouvée plus importante pour les souches vivantes que pour les souches inactivées par la chaleur (Lepercq et al. 2004). A contrario, d'autres études montrent des résultats intéressants avec des cellules inactivées. Tout d'abord, l'effet immunomodulateur sur cellules Caco-2 de la souche vivante *L. rhamnosus* GG a été comparé avec la même souche inactivée par la chaleur (20 min., 80 °C) et la même souche inactivée par les ultraviolets (UV) (5 min., 39 W, 10 cm) dans deux études différentes. Dans le premier cas, un prétraitement avec les cellules vivantes ou tuées thermiquement diminue la production d'Interleukine 8 (IL-8) après stimulation de cellules Caco-2 par du TNF- $\alpha$  (Zhang et al. 2005). Dans le deuxième cas, un prétraitement avec les cellules vivantes ou tuées par les UV diminue la production d'IL-8 après stimulation de cellules Caco-2 par de la flageline (Lopez et al. 2008). Les

résultats de 3 études décrites précédemment montrent que la souche *L. rhamnosus* GG inactivée thermiquement possède un effet inférieur à la souche vivante dans des mécanismes stimulant plutôt l'immunité acquise avec la production d'immunoglobulines A (IgA) et un effet immuno-régulateur similaire à la souche vivante. Le rapprochement est cependant difficile du fait des différences de protocoles expérimentaux et de la méconnaissance des structures impliquées dans les deux effets. D'autre part, l'administration intra-gastrique d'un mélange de probiotiques (VSL#3) viables ( $2,8 \times 10^9$  UFC/jour) ou tués par irradiations réduit similairement l'inflammation de la muqueuse intestinale de la souris (Rachmilewitz et al. 2004). L'utilisation d'ADN bactérien produit également le même effet positif. L'ADN bactérien contient des motifs CpG non méthylés qui peuvent se lier au récepteur TLR-9. D'autres auteurs ont montré que l'ADN de bifidobactéries induit la sécrétion d'IL-10 chez des donneurs sains (Lammers et al. 2003). Des essais *in vitro* ont montré que l'effet des souches *L. rhamnosus* GG, *L. gasseri* PA16/8, *B. bifidum* MP20/5 et *B. longum* SP07/3 sur la réponse à médiation cellulaire (Th1) et la réponse à médiation humorale (Th2) était dû à 50% à leur ADN (Ghadimi et al. 2008). Un article récent a mesuré, chez l'homme, le profil transcriptionnel de la région proximale du duodénum après consommation de la souche *L. plantarum* WCFS1 ( $2 \times 10^{12}$  UFC) en phase exponentielle, en phase stationnaire de croissance ou inactivée par la chaleur (10 min, 85 °C) (van Baarlen et al. 2009). Les résultats montrent que la consommation de la bactérie *L. plantarum* inactivée ou en phase stationnaire de croissance conduit à une augmentation de l'expression de TNF- $\alpha$  et à l'activation des lymphocytes T alors que la consommation de la souche en phase exponentielle induit un effet anti-inflammatoire. De même, la souche *L. acidophilus* inactivée par la chaleur empêche l'adhésion de *E. coli* sur cellules Caco-2 (Chauviere et al. 1992). Enfin, Generoso et al., ont montré un effet semblable de la souche *S. boulardii* vivante ( $10^8$  UFC/jour) et inactivée thermiquement (15 min, 121 °C) sur la translocation, la perméabilité intestinale et le score histologique de souris (Generoso et al. 2011).

Plus généralement, il paraît assez évident que l'importance de la viabilité dépend directement du mode d'action de la souche. Par exemple, de nombreux travaux ont montré que la lactase de certaines bactéries lactiques, participait à l'hydrolyse du lactose. Dans ce cas précis, le micro-organisme sert principalement de vecteur et sa survie ou non ne semble pas indispensable (Boclé and Thomann 2005). Il reste cependant complexe de rendre un microbe non viable sans altérer sa fonctionnalité. Ainsi, les résultats décrits ci-dessus montrent surtout un effet de l'ADN bactérien, une structure particulièrement résistante. Par conséquent, le chemin conduisant à l'inactivation cellulaire, plus encore que la notion de survie, conditionne

la fonctionnalité microbienne. Dans le tractus, il reste cependant possible que les voies de signalisation déclenchées par les bactéries mortes ne soient pas les mêmes que les bactéries vivantes. Par exemple, le TLR-9 est souvent présenté comme un récepteur permettant la reconnaissance de l'ADN bactérien.

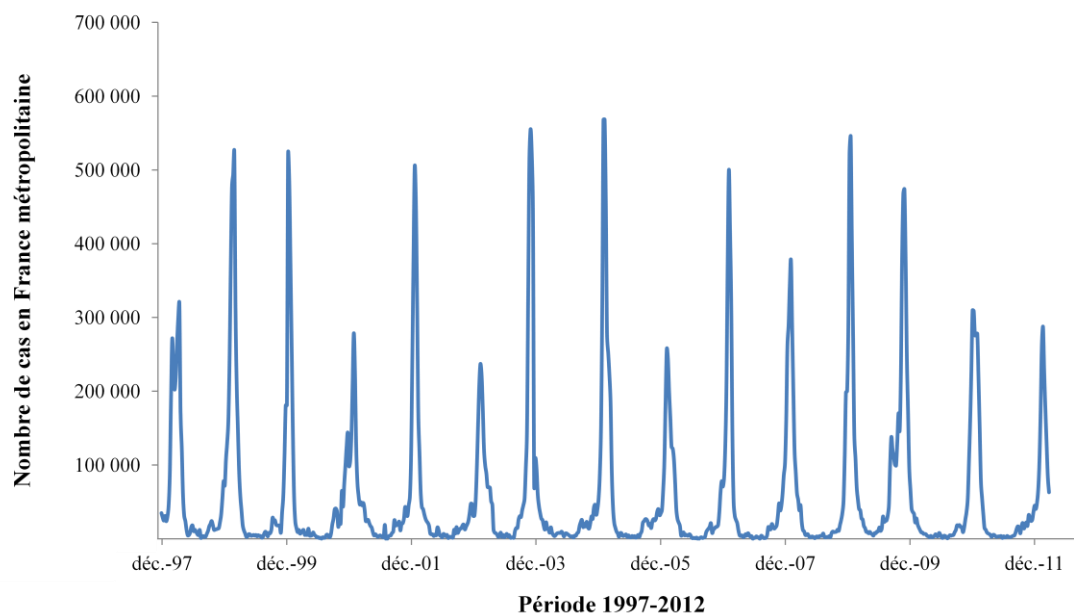
### 1.3. Effets santé attribués aux probiotiques

Ces micro-organismes sont impliqués dans l'amélioration de la santé intestinale et influencent positivement le développement et l'activité du système immunitaire. De nombreux effets leur sont attribués (Gareau et al. 2010; Gill and Prasad 2008; Moayyedi et al. 2010) :

- l'aide à la malabsorption du lactose due à l'activité lactase bactérienne (de Vrese et al. 2001),
- l'amélioration de la valeur nutritionnelle des aliments,
- la protection contre les infections gastro-intestinales (diarrhée du voyageur, diarrhée infantile, diarrhée induite par antibiotiques...) (Isolauri et al. 1991; McFarland et al. 1994),
- le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Kruis et al. 2004; Prantera et al. 2002),
- la lutte contre les infections à *H. pylori* (Nista et al. 2004; Wang et al. 2004a),
- la stimulation du système immunitaire,
- la lutte contre la constipation,
- la prévention des infections uro-génitales,
- la neutralisation de carcinogènes alimentaires,
- la réduction du risque de maladie coronarienne (Ebel et al. 2012)

Plusieurs travaux ont mis en évidence un effet de l'ingestion de micro-organismes sur la réduction des symptômes dus aux infections hivernales (Tableau 2). En effet, une baisse de l'efficacité du système immunitaire rend l'organisme particulièrement sensible à de multiples infections (virus, micro-organismes). Par exemple, la grippe est la seconde cause de mortalité par maladie infectieuse en France, avec environ 3 000 décès par an et plus de 250 000 morts dans le monde. Des épidémies plus fortes surviennent périodiquement, touchant deux fois plus de personnes que les autres années (Figure 6). La plupart des individus atteints de la grippe se rétablissent rapidement, mais le virus peut parfois provoquer des complications. Ainsi, dans une étude en double aveugle contre placebo, des enfants de garderies recevant la

souche *L. rhamnosus* GG pendant 7 mois ( $\sim 10^7$  UFC/jour) ont été moins malades et moins absents (Hatakka et al. 2001). Les mêmes résultats ont été obtenus chez des enfants plus âgés avec les souches *L. acidophilus* NCFM et *B. animalis* Bi-07 ( $\sim 10^{10}$  UFC/jour) (Leyer et al. 2009). Différentes études ont également montré un effet positif des souches *B. lactis* HN019 ( $5 \times 10^9$  UFC/jour) (Gill et al. 2001), *L. rhamnosus* HN001 ( $2,5 \times 10^{10}$  UFC/jour) (Sheih et al. 2001), *L. johnsonii* La1 ( $10^9$  UFC/jour) (Fukushima et al. 2007), *L. fermentum* CECT5716 ( $10^{10}$  UFC/jour) (Olivares et al. 2007) ou encore *L. casei* DN 114001 ( $10^{10}$  UFC/jour) (Boge et al. 2009) sur la stimulation des composantes du système immunitaire inné. Dans une autre étude, la consommation de la souche *L. casei* Shirota ( $4 \times 10^{10}$  UFC/jour) pendant 3 semaines a permis de restaurer l'activité des cellules NK chez des fumeurs (Morimoto et al. 2005).



**Figure 6:** Nombre de cas de grippe en France métropolitaine sur la période 1997-2012  
(<http://websenti.u707.jussieu.fr/sentiweb>)

De même, l'administration de comprimés contenant un mélange de vitamines et de minéraux plus les souches *L. gasseri* PA 16/8, *B. longum* SP 07/3 et *B. bifidum* MF 20/5 ( $5 \times 10^7$  UFC/jour) a montré une diminution des épisodes infectieux, moins de symptômes, moins de jours de fièvre, ainsi qu'une modulation du système immunitaire (de Vrese et al. 2005; de Vrese et al. 2006). Enfin, deux études récentes ont montré l'efficacité de souches de *L. plantarum* ( $10^9$  et  $5 \times 10^8$  UFC/jour, respectivement) dans le renforcement du système immunitaire (Berggren et al. 2011; Mañé et al. 2011). Dans ce type d'étude, la principale difficulté est de montrer un effet des micro-organismes probiotiques sur des personnes saines.

**Tableau 2:** Etudes cliniques chez l'homme portant sur l'effet de l'ingestion de bactéries probiotiques pour lutter contre les infections hivernales

Patients	Durée	Traitement journalier	Résultats	Références
17	3 semaines	<i>L. casei</i> Shirota ( $4 \times 10^{10}$ UFC)	Augmentation de l'activité des lymphocytes NK après 3 et 6 semaines Effet nul au bout de 12 semaines	(Nagao et al. 2000)
52	3 semaines	<i>L. rhamnosus</i> HN001 ( $2,5 \times 10^{10}$ UFC)	Augmentation de l'activité phagocytaire et de l'activité des lymphocytes NK (147% vs 71%)	(Sheih et al. 2001)
30	3 semaines	<i>B. Lactis</i> HN019 ( $5 \times 10^9$ UFC ou $5 \times 10^{10}$ UFC)	Augmentation du nombre de cellules NK, de neutrophiles et de monocytes	(Gill et al. 2001)
99	3 semaines	<i>L. casei</i> Shirota ( $4 \times 10^{10}$ UFC)	Augmentation de l'activité des lymphocytes NK chez des fumeurs	(Morimoto et al. 2005)
479	12 et 20 semaines	<i>L. gasseri</i> PA 16/8, <i>B. longum</i> SP 07/3 et <i>B. bifidum</i> MF 20/5 ( $5 \times 10^7$ UFC)	Pas d'effet sur le nombre d'infections Diminution de la durée moyenne des épisodes infectieux et de la sévérité des symptômes Augmentation des lymphocytes Tcytotoxiques	(de Vrese et al. 2006)
19	3 semaines	<i>L. casei</i> Shirota ( $4 \times 10^{10}$ UFC)	Augmentation de l'activité des lymphocytes NK	(Takeda and Okumura 2007)
24	12 semaines	<i>L. johnsonii</i> La1 ( $10^9$ UFC)	Dans le groupe probiotique, augmentation de la sérum-albumine et diminution de la production de TNF- $\alpha$	(Fukushima et al. 2007)
50	4 semaines	<i>L. fermentum</i> CECT5716 ( $10^{10}$ UFC)	Augmentation significative d'IgA Incidence plus faible de la grippe	(Olivares et al. 2007)
30	8 semaines	<i>L. paracasei</i> Lpc-37 ( $3,9 \times 10^8$ UFC) <i>L. acidophilus</i> 74-2 ( $2,9 \times 10^4$ UFC) <i>B. lactis</i> DGCC 420 ( $5,9 \times 10^4$ UFC)	Stimulation des lymphocytes Treg et de l'activité phagocytaire des monocytes et granulocytes	(Friedrich et al. 2008)



Patients	Durée	Traitement journalier	Résultats	Références
326	24 semaines	<i>L. acidophilus</i> NCFM <i>B. animalis</i> Bi-07 (10 <sup>10</sup> UFC)	Réduction de la fièvre, la toux et de l'incidence et la durée des épisodes. Réduction du nombre de jours d'école manqués	(Leyer et al. 2009)
308	7 ou 13 semaines	<i>L. casei</i> DN 114001 (10 <sup>10</sup> UFC)	Augmentation du nombre d'anticorps de la grippe après vaccination	(Boge et al. 2009)
1072	12 semaines	<i>L. casei</i> DN 114001 (2 x 10 <sup>10</sup> UFC)	Réduction de la durée des épisodes infectieux	(Guillemard et al. 2010)
50	24 semaines	<i>L. plantarum</i> CECT 7315/7316 (5 × 10 <sup>9</sup> UFC ou 5 × 10 <sup>8</sup> UFC)	Les fortes doses de probiotiques entraînent une augmentation significative de lymphocytes T et NK. Les faibles doses augmentent le nombre de lymphocytes T, B et les cellules présentatrices d'antigènes	(Mañé et al. 2011)
272	12 semaines	<i>L. plantarum</i> HEAL 9 et <i>L. paracasei</i> 8700 (10 <sup>9</sup> UFC)	Le nombre de jours de rhume a été réduit (8,6 jours vs 6,2 jours dans le groupe probiotique)	(Berggren et al. 2011)

*Ce premier chapitre de l'analyse bibliographique met en évidence l'importance du microbiote intestinal sur le plan structurel et fonctionnel. Le tube digestif de l'être humain est composé de la cavité buccale, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), du gros intestin (côlon ascendant, côlon transversal et côlon descendant) puis du rectum et de l'anus. Chacune de ces sections possède une flore microbienne résidente, spécifiquement adaptée aux conditions physicochimiques régnantes. Dans l'intestin grêle, la vitesse de transit est élevée (1-3 cm/min) et la flore peu concentrée (de  $10^{3-4}$  jusqu'à  $10^8$  cellules/mL). Cette section se présente comme une interface essentielle entre l'hôte et son microbiote par la présence de cellules spécifiques capables d'échantillonner le contenu luminal et d'induire la réponse immunitaire. Le gros intestin (colon) est caractérisé par la richesse en nombre ( $10^{11}$  cellules/mL) et en diversité de son écosystème microbien.*

*Au cours de leur passage dans le tractus digestif, les micro-organismes probiotiques vont pouvoir interagir avec le microbiote intestinal, les cellules épithéliales et/ou les cellules immunitaires de l'hôte. Aujourd'hui, de nombreux effets santé sont associés aux micro-organismes probiotiques (digestion du lactose, prévention des infections gastro-intestinales, stimulation du système immunitaire, traitement des MICI...).*

*Dans notre étude, nous avons choisi de rechercher des souches probiotiques immuno-stimulantes pour permettre la prévention des infections hivernales.*

## 2. Sélection et production de micro-organismes probiotiques frais

Avant de pouvoir être commercialisé, un produit contenant un micro-organisme probiotique doit satisfaire à des critères scientifiques, réglementaires et économiques. Ainsi, la souche probiotique doit bénéficier d'un dossier scientifique valide résumant ses aptitudes, être conforme à la réglementation en vigueur pour garantir la sécurité du consommateur, et pouvoir être produite à large échelle au meilleur coût.

### 2.1. Critères de sélection

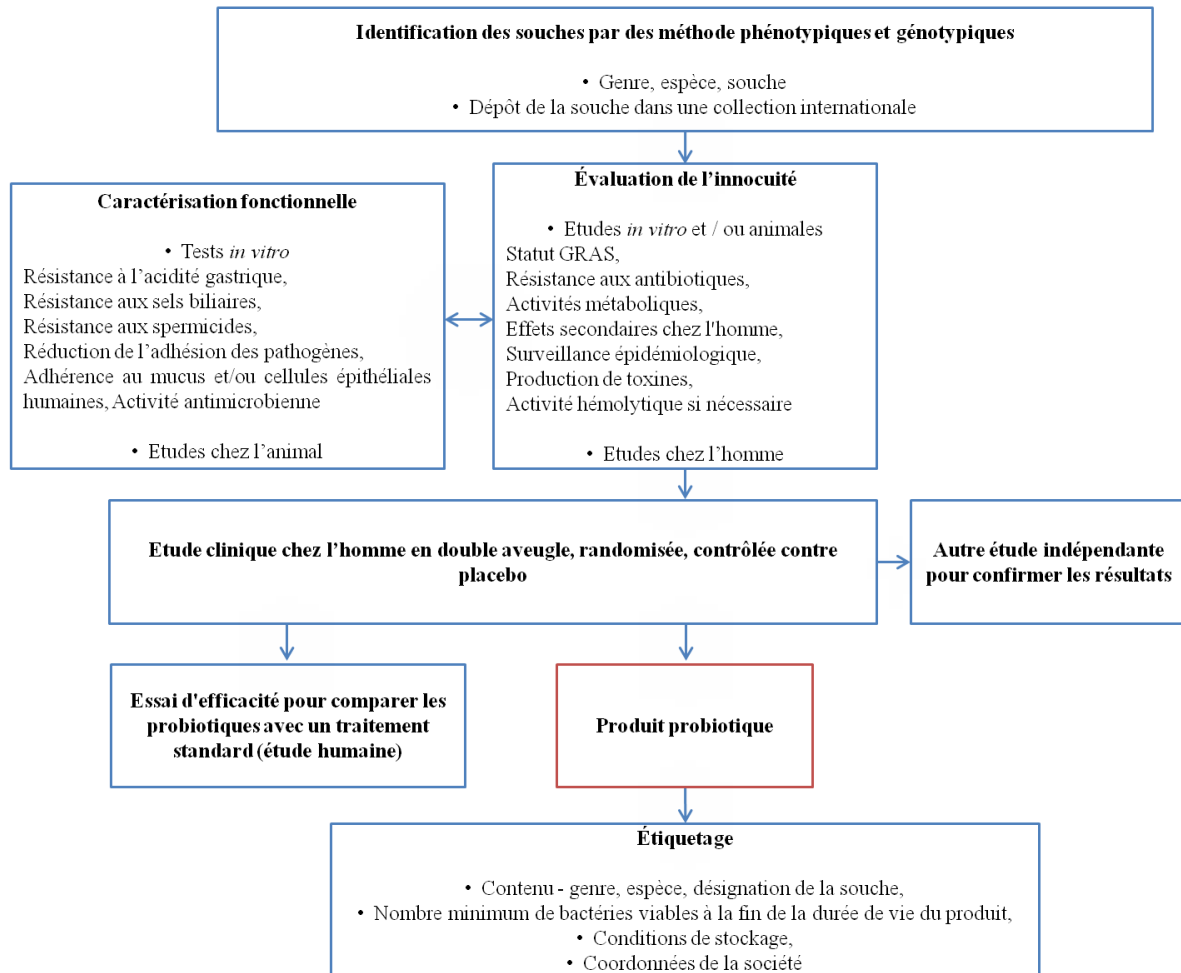
Tout d'abord, pour qu'un produit, contenant un ou plusieurs micro-organisme(s) probiotique(s), puisse être commercialisé, il doit respecter les critères de recommandation des autorités compétentes. En 2002, la FAO et l'OMS ont établi les lignes directrices à suivre pour commercialiser un produit contenant des probiotiques (Figure 7). La sélection de souches probiotiques peut donc être divisée en quatre catégories distinctes :

- Bénéfice santé
- Innocuité
- Production industrielle
- Résistance aux stress du tractus gastro-intestinal

La première caractéristique d'une souche probiotique est d'avoir un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. Pour bénéficier d'une allégation santé, une bactérie doit être parfaitement identifiée et caractérisée. Elle doit avoir le statut « Generally regarded as safe » (GRAS) et être déposée dans une collection internationale. Depuis 2007, l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a adopté l'approche « Qualified Presumption of Safety » (QPS) pour l'évaluation des risques potentiels à l'utilisation de micro-organismes (EFSA 2007; Sanders et al. 2010) et a durci les conditions d'acceptation des demandes d'allégations santé. Dans un rapport de 2009, l'EFSA a estimé que les allégations utilisées pour les produits probiotiques déjà sur le marché manquaient de preuves scientifiques (étude clinique) et/ou que les souches n'étaient pas assez caractérisées.

La caractérisation concerne l'innocuité (résistance aux antibiotiques, production de toxines), la fonctionnalité (activité métabolique, adhésion) et la capacité de résistance aux perturbations du tractus. Ainsi, pour être probiotique, la bactérie doit être sensible aux antibiotiques et résistante aux stress gastro-intestinaux. La souche doit enfin faire l'objet d'études *in vivo* chez l'animal puis chez l'homme.

En plus de l'évaluation de l'innocuité de la souche et de la détermination des propriétés fonctionnelles, les caractéristiques technologiques comme la résistance aux phages, la survie lors du procédé de fabrication ou encore la stabilité pendant le stockage peuvent être prises en compte (Jankovic et al. 2010; Saarela et al. 2000).



**Figure 7:** Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques destinés à l'alimentation humaine (FAO/WHO 2002)

Une souche probiotique doit donc répondre aux critères réglementaires ainsi qu'aux critères de production industrielle avant d'être commercialisée. Les directives concernent également la qualité et la quantité des bactéries ingérées. Ainsi, les micro-organismes doivent être consommés vivants et la dose a été fixée autour de  $10^9$  UFC/g. Aucune quantité précise de bactéries probiotiques n'est nécessaire pour assurer un effet bénéfique. La quantité efficace, pour une souche donnée et un effet donné, est la quantité qui a pu démontrer ses effets en étude clinique. Cependant, il a déjà été démontré que l'effet des souches était dépendant de la dose de bactérie (Ghadimi et al. 2008). Si le tractus gastro-intestinal de l'être humain ou d'autres écosystèmes représentent des sources importantes de potentiels probiotiques, très peu de souches ont un effet sur la santé, sont cultivables facilement et répondent aux critères

réglementaires. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées à la mise en place de tests de criblage pertinents permettant de sélectionner des micro-organismes simplement et rapidement sur leurs aptitudes fonctionnelles, leur résistance au procédé de fabrication utilisé et/ou leur tolérance aux stress du tractus.

### 2.1.1. Sélection des souches pour leurs aptitudes fonctionnelles

La plupart des souches faisant l'objet d'études sont sélectionnées en laboratoire sur leurs aptitudes fonctionnelles, c'est-à-dire sur leur activité enzymatique, leur aptitude à moduler le système immunitaire, leur activité antimicrobienne ou leur capacité d'adhésion. Trois modèles cellulaires sont principalement utilisés pour la mesure des propriétés immunomodulatrices des bactéries probiotiques : les cellules mononucléaires de sang périphérique (PBMC) ou les lignées cellulaires Caco-2 et HT-29 :

- Les cellules PBMC sont particulièrement intéressantes dans le cadre d'un screening car elles ne nécessitent pas de cultures et repiquages successifs et donnent une réponse facilement interprétable (analyse d'une cytokine pro-inflammatoire et une anti-inflammatoire) (Foligne et al. 2010; Perez-Cano et al. 2010; Sokol et al. 2008). Une corrélation entre les résultats obtenus *in vitro* avec des PBMC et ceux obtenus *in vivo* chez la souris a été mise en évidence (Drouault-Holowacz et al. 2006; Foligne et al. 2007). Néanmoins, si ces cellules constituent de bons modèles d'études, la réponse étudiée reste binaire et dépendante de l'état physiologique des cellules (individu prélevé, cycle de congélation-décongélation). La caractérisation doit donc être complétée, par une étude chez l'animal par exemple, avant de passer à l'étude chez l'homme.

- Les lignées cellulaires Caco-2 et HT-29 nécessitent une induction par des molécules pro-inflammatoires et sont surtout utilisées pour observer le potentiel anti-inflammatoire des micro-organismes (Delcenserie et al. 2008; Grimoud et al. 2010; O'Hara et al. 2006).

De nombreux métabolites bactériens (acides organiques, acides gras, peroxyde d'hydrogène, diacétyles) peuvent avoir une action antibactérienne (Dunne et al. 2001). Généralement, la caractérisation de cette activité est mesurée à travers l'inhibition de croissances de bactéries pathogènes (*B. cereus*, *Clostridium difficile*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*...) (Collado et al. 2007; Jacobsen et al. 1999).

Pour l'adhésion, les cellules Caco-2, Int-407 et HT-29 sont classiquement utilisées en raison de leurs similitudes morphologiques et physiologiques avec les entérocytes humains (Dunne

et al. 2001; Jacobsen et al. 1999). Les cellules HT-29 MTX sont des cellules excréant du mucus. La souche *L. rhamnosus* GG a montré son aptitude à adhérer *in vitro* sur cellules HT-29, HT-29 MTX et Caco-2 (Gopal et al. 2001) et *in vivo* pendant une semaine sur la muqueuse humaine (Alander et al. 1999). Cette capacité d'adhésion a été associée à la présence de pilis à sa surface (Kankainen et al. 2009). D'autres tests simples, comme la mesure du potentiel zeta ou l'adhésion dans des solvants type hexadecane, sont utilisés pour prédire l'aptitude des souches à adhérer (Deepika et al. 2009; Rosenberg et al. 1980). L'adhésion n'est pas une condition *sine qua non* pour exercer des effets probiotiques mais laisse plus de chance à la bactérie d'agir en augmentant le temps de rétention dans l'intestin et en favorisant le contact avec les cellules épithéliales.

### 2.1.2. Sélection des souches pour leur résistance au procédé de fabrication

Très peu d'études sont actuellement disponibles sur la sélection de micro-organismes bénéfiques pour leur aptitude à résister aux stress du procédé de fabrication. Pourtant, il semble que les micro-organismes actuellement sur le marché soient particulièrement tolérants aux perturbations du procédé. Par exemple, la souche *B. animalis* ssp. *lactis* BB12 possède un taux de survie au séchage supérieur à 40% après lyophilisation et à 70% après atomisation (Heidebach et al. 2010; Simpson et al. 2005). Dans le cadre de la résistance à la déshydratation, de nombreuses études utilisent le milieu liquide pour mimer les perturbations rencontrées lors du séchage. Ainsi, certains auteurs ont montré des résultats similaires en terme de cinétique optimale de déshydratation (Mille et al. 2004). L'utilisation de glycérol, de sels ou de sucres permet d'observer des différences de survie et de contraction volumique entre les souches (Poirier et al. 1998). Pour prédire l'aptitude de bactéries à tolérer le procédé d'atomisation, Simpson et al., ont mesuré la tolérance à la chaleur (42, 52, 55, 57 et 60 °C, 5 min) et à la présence d'oxygène (croissance, agitation, 24h) de 30 souches de bifidobactéries (Simpson et al. 2005). Parmi les souches présentant une résistance combinée à ces deux stress, 5 sur 6 possèdent également un fort taux de viabilité après atomisation.

D'autres auteurs ont utilisé le système CINAC pour comparer le temps nécessaire pour atteindre la vitesse d'acidification maximale. Cette méthode a été reliée à la survie des souches à la congélation (Fonseca et al. 2000). Dans une étude de 2007, Rault et al., ont utilisé la cytométrie en flux et deux marqueurs fluorescents (iodure de propidium et carboxyfluoresceine diacétate) pour mesurer la survie de 4 souches de *L. bulgaricus* après congélation-décongélation (Rault et al. 2007). Une étude récente a testé, entre autres, la

résistance de 63 souches de *L. plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* et *Lactobacillus pentosus* à des stress osmotiques, thermiques et oxydants (Parente et al. 2010). Les cellules ont été centrifugées et resuspendues en présence d'une solution de NaCl (3M, 1 h, 30 °C), soit une  $a_w$  de 0.89, pour le stress osmotique, d'une solution d' $H_2O_2$  (0,1% (v/v), 30 min, 30 °C) pour le stress oxydant ou dans du tampon phosphate (PBS) (15 min., 55 °C) pour le stress thermique. Pour les stress oxydants et thermiques, les résultats montrent des différences entre les souches. De même, 4 souches bactériennes *Deinococcus radiodurans*, *E. coli*, *Ralstonia metallidurans*, et *Shewanella oneidensis* ont été soumises à des concentrations allant de 0 à 880 mM de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) pendant 1h. La perméabilité (iodure de propidium, IP), le potentiel membranaire (rhodamine-123), l'activité estérase (fluorescéine diacétate), la concentration intracellulaire en espèces réactives de l'oxygène (ROS) (hydroéthidine) et le pH intracellulaire (carboxyfluorescéine diacétate, cFDA) ont été suivis par cytométrie en flux afin d'évaluer l'état physiologique des cellules après le stress oxydant.

### 2.1.3. Sélection des souches pour leur tolérance aux stress du tractus gastro-intestinal

Différents modèles reproduisant les conditions physicochimiques du tractus gastro-intestinal existent dans la bibliographie. Ces modèles simulent généralement soit la partie gastrique, soit la partie intestinale du tube digestif. Des modèles dynamiques, plus proches de la réalité ont également été développés. Par exemple, le TNO Intestinal Model (TIM) est un modèle *in vitro* dynamique qui simule les étapes successives du transit digestif. Il comprend deux sous-unités, le TIM-1 qui simule l'estomac et l'intestin grêle et le TIM-2 pour le gros intestin (seul le TIM-1 sera utilisé dans la partie résultats). Le TIM-1 comprend un compartiment gastrique avec simulation des mouvements de vidange, sécrétion d'acides, d'enzymes et d'électrolytes, contrôle du pH, simulation du sphincter pylorique et un compartiment intestinal avec simulation des mouvements péristaltiques, sécrétions intestinales, présence d'une membrane semi-perméable pour la simulation de l'absorption des produits digérés et système de contrôle de la température et du pH. Cet appareil a déjà été utilisé sur des micro-organismes et a montré de bonnes corrélations avec la réalité.

Tout d'abord, l'estomac broie les aliments (action mécanique) et libère des sécrétions gastriques (action chimique). Les cultures microbiennes doivent résister à la présence de pepsine et au faible pH de l'estomac. Si la résistance à l'acidité stomacale est presque toujours étudiée, les paramètres opératoires varient énormément (Tableau 3) (Dunne et al. 2001). En

effet, la durée du séjour des aliments dans l'estomac est fonction de leur consistance mais également de la force de la tonicité gastrique. L'acidité stomacale varie de pH=1,5 à pH=6 après la prise alimentaire. Pour l'heure, il n'y a pas de véritable consensus sur le niveau de pH et la composition exacte du milieu.

Le comportement des bactéries dans un milieu acide se révèle généralement dépendant de la souche. Ainsi, certaines souches peuvent rester totalement cultivables après 1h30 à pH=2, alors qu'il ne reste qu'une bactérie sur un milliard en moins de 30 minutes, pour d'autres (Corcoran et al. 2005). La présence de sucres métabolisables, notamment de glucose, améliore significativement la résistance à l'acide des bactéries en stimulant l'action des pompes F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase *via* la glycolyse. Masco et al., ont testé 66 souches sur leur résistance à l'acidité gastrique et mesuré la réponse en lecteur de plaques par fluorescence (SYTO9 et IP). De façon générale, les souches résistent mieux à l'acidité en présence d'une matrice alimentaire (Conway et al. 1987).

**Tableau 3:** Nature et composition des milieux utilisés pour simuler le passage de l'estomac

pH	Composition du milieu	Durée de l'exposition	Références bibliographiques
1,2	NaCl (2 g/L) pepsine (3,2 g/L)	2h	(Chen et al. 2012)
1,55	NaCl (2 g/L)	2h/3h	(Krasaekoopt et al. 2004)
1,8	NaCl (2 g/L) pepsine (3 g/L)	3h	(Doherty et al. 2011)
1,9	Pepsine (0,26 g/L)	30 min.	(Picot and Lacroix 2004)
2	Glucose (3,50g/L), NaCl (2,05g/L), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,60g/L), KCl (0,37g/L), CaCl <sub>2</sub> (0,11g/L), lysosyme (0,10g/L), bile (0,05g/L), pepsine (0,01g/L)	1h30	(Corcoran et al. 2005)
2	NaCl (5 g/L), pepsine (3g/L), microaération (6% O <sub>2</sub> )	1min., 1h30, 3h	(Masco et al. 2007)
2,5	NaCl (8,5 g/L) pepsine (3 g/L)	1h30	(Giulio et al. 2005)
3	Tampon phosphate	30 min.	(Hood and Zoitola 1988)

Il semble également que les souches possédant la cyclopropane acid synthase résistent mieux à l'acidité (Shabala and Ross 2008). Cette faculté serait notamment due à la capacité de l'enzyme à stabiliser la membrane en diminuant la perméabilité aux protons H<sup>+</sup>.

Le Tableau 4 recense les milieux utilisés pour simuler le passage de l'intestin contenant les acides biliaires et le suc pancréatique. Ces deux stress peuvent être réalisés séparément ou



simultanément. Les acides biliaires sont synthétisés par le foie à partir de cholestérol et sont sécrétés au niveau du duodénum sous forme conjuguée (500-700 mL/jour). Les activités microbiennes du colon peuvent modifier ces acides (Dunne et al. 2001). Des tests de cultivabilité en milieu solide utilisant de la bile d'origine bovine, porcine ou humaine à des concentrations comprises entre 0,3% et 7,5% ont été développés (Pennacchia et al. 2004). Des concentrations comprises entre 0,1% et 0,3%, représentatives des conditions physiologiques, sont recommandées. De plus, ces tests restent longs (24-72h selon les souches) et non représentatifs de ce qui se passe au niveau du tractus. Ding et Shah ont utilisé deux types de sels biliaires, de l'oxgall (forme conjuguée et déconjuguée) et de l'acide taurocholique (forme conjuguée) pour étudier la tolérance à la bile (3%, pH=5,8, 8h, milieu MRS) de 8 bactéries probiotiques (Ding and Shah 2007). Dans les deux cas (oxgall et acide taurocholique), les souches montrent une importante destruction après 4h (respectivement -4.2 log et -4,4 log en moyenne) et après 8h (respectivement -6.5 log et -6,4 log en moyenne).

**Tableau 4:** Nature et composition des milieux utilisés pour simuler le passage de l'intestin

pH	T°C	Composition du milieu	Durée de l'exposition	Références bibliographiques
6,8	37 °C	Pancréatine (10 g/L), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (6,8g/L), bile (0,5-1-2-4-8-12 g/L)	2h	(Chen et al. 2012)
7,4	37 °C	Bile (2 g/L), pancréatine (1 g/L), PBS	3h	(Duc et al. 2004)
7,5	37 °C	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2,8 g/L), lysozyme (0,1 g/L), bile (0,05 g/L)	12h	(Doherty et al. 2011)
8	37 °C	Bile (45 g/L), NaCl (5 g/L), pancréatine (1 g/L)	3h	(Michida et al. 2006)
8	37 °C	NaCl (5 g/L), pancréatine (1 g/L), anaérobiose	1min, 1h30, 3h	(Masco et al. 2007)
8	37 °C	NaCl (5 g/L), bile (3 g/L), anaérobiose	1h	(Masco et al. 2007)

Une étude sur la souche *L. reuteri* ATCC 55730 montre que le contact avec la bile induit un stress membranaire, une dénaturation des protéines et des dommages à l'ADN (Whitehead et al. 2008). Plus particulièrement, trois gènes favorisant la survie de la souche lors d'une exposition à la bile ont été identifiés: lr1864, lr0085 et lr1516. Dans une étude de 2010, des auteurs se sont intéressés à 90 souches de *L. fermentum* (Bao et al. 2010). Parmi elles, 35 souches ont été sélectionnées pour leur croissance en milieu acide (pH=3), puis seulement 11 pour leur tolérance à l'acidité gastrique (pH=2,5, 3h). La résistance à la bile (0,3, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6 et 1,8%) et l'activité antibactérienne de ces 11 bactéries ont ensuite été évaluées. Ainsi, dans cette étude, le critère de sélection majeur de la souche est la capacité à

passer l'estomac. Le caractère probiotique recherché (activité antibactérienne) n'est mesuré qu'à l'issue des tests de résistance aux stress du tractus.

L'objectif du criblage est de pouvoir tester un maximum de souches en un minimum de temps. Cette volonté de criblage haut débit (Ruiz-Moyano et al. 2008) est matérialisée par l'abandon progressif des techniques de cultures classiques et l'utilisation de plus en plus fréquente de la cytométrie en flux (Chen et al. 2012; Rault et al. 2007) ou du lecteur de microplaques (Masco et al. 2007). Ces études remettent en cause la définition même de la viabilité pour un micro-organisme. En effet, l'utilisation de boîtes de pétri est une méthode longue, qui sous-estime la viabilité et ne tient compte que d'un seul paramètre, la capacité de division. A contrario, en sélectionnant les marqueurs de façon adéquate, la cytométrie permet d'étudier un plus grand nombre de paramètres (Díaz et al. 2010). Une étude a étudié quatre méthodes de numération (Cultivabilité, FISH, Double marquage Syto9/IP et analyse par cytométrie, PCR) et montré que la méthode utilisée pouvait influencer les résultats de l'analyse (Lahtinen et al. 2006).

Enfin, si la survie des bactéries aux stress du tractus gastro-intestinal est calculée précisément, la préservation de la fonctionnalité n'est jamais mesurée. Que ce soit pour la production de starter ou de probiotiques, il est nécessaire d'avoir des informations sur la survie et l'état métabolique de la souche. Un problème qui pourrait être résolu par l'utilisation de la cytométrie en flux.

## 2.2. Production de biomasse

Les probiotiques sont généralement des bactéries lactiques, Gram (+), qui poussent dans des milieux riches. La maîtrise des conditions de fermentation des souches doit permettre de produire une grande quantité de biomasse avec une viabilité élevée, et d'améliorer la survie lors du séchage et de la conservation à l'état sec.

A l'échelle industrielle, l'optimisation des conditions de croissance représente une étape majeure du procédé de production. Tout d'abord, le choix des composants du milieu de culture doit répondre aux besoins nutritionnels des micro-organismes, à des critères réglementaires et à des critères économiques (Tableau 5). Le milieu de culture peut être un milieu à base de lait, ou un milieu synthétique type MRS (Doleyres and Lacroix 2005). Par exemple, les lactobacilles sont micro-aérophiles et nécessitent un milieu contenant des sucres fermentescibles, des protéines, des vitamines, des dérivés d'acides nucléiques, des acides gras ou esters d'acides gras et des sels minéraux type magnésium, manganèse et fer

(Charalampopoulos and Rastall 2009). Les meilleures conditions de croissance pour la production de *L. acidophilus* sont de 40 g/L de glucose, 20 g/L de peptone, 20 g/L d'extraits de levure, 5 g/L de sodium acétate, 3 g/L de sodium citrate (pH=6,0 et T=30 °C) (Taillandier et al. 1996). Des substances prébiotiques comme le fructose, l'oligofructose ou l'inuline peuvent également être ajoutées.

**Tableau 5:** Principaux ingrédients entrant dans la composition des milieux de production des bactéries lactiques (Béal et al. 2008)

Rôle des composants	Ingrédients
Source de carbone	Monosaccharides
	Disaccharides
	Lactosérum
	Lait écrémé
Source d'azote	Concentrés protéiques de lactosérum
	Hydrolysats protéiques de lactosérum
	Hydrolysats de caséine
	Extraits de levures
	Peptones de levures
Vitamines et facteurs de croissance	Peptones d'origine animale ou végétale (soja)
	Acide ascorbique
	Tween
	Vitamines du groupe B
Sels minéraux	Ca, Mg, Mn, Fer
Sels à pouvoir tampon	K, Na, NH <sub>4</sub>
Antimousses	Tween
	Monoglycérides acétylés
	Antimousses avec/sans silicone

Pour satisfaire à la réglementation, il est nécessaire de pouvoir produire les micro-organismes probiotiques dans des milieux ne contenant pas de composés d'origine animale. Des milieux à base de produits végétaux (soja, jus de carotte...) ont donc été développés. Par exemple, les souches *B. breve* et *B. bifidum* se développent dans un milieu contenant 6% de jus de carotte, 12% de jus de choux et 3% de jus d'oignons (Savard et al. 2003). Généralement, les rendements obtenus sont inférieurs à ceux atteints lors de l'utilisation de MRS.

Lors de la production industrielle, l'étape de fermentation est traditionnellement réalisée en culture batch ou fed-batch (Lacroix and Yildirim 2007). En effet, si la fermentation continue donne généralement de meilleurs rendements (Tableau 6), elle engendre des risques de contamination et peut conduire à une perte des caractéristiques de la souche au cours du

temps. Les cellules produites par fermentation en continu possèdent également des propriétés différentes (morphologie, résistance aux stress) (Doleyres and Lacroix 2005).

Les paramètres opératoires tels que la température, le pH, la vitesse d'agitation, le neutralisant utilisé pour la régulation du pH et la pression d'oxygène sont contrôlés (Béal et al. 2008). Les principaux facteurs limitant la croissance sont l'accumulation de métabolites (acide lactique, acide acétique) et la disparition progressive des nutriments dans le milieu. Ainsi, le contrôle du pH permet d'obtenir des rendements de production de biomasse plus élevés. Cachon *et al.*, ont montré une augmentation (x7) de la quantité de cellules de *Lc. Lactis* lorsque le pH est fixé à 6,5 par rapport à un pH non régulé (Cachon et al. 1998). Le contrôle de l'atmosphère gazeuse de l'enceinte est un paramètre important. Plusieurs gaz ou mélanges de gaz peuvent être utilisés comme N<sub>2</sub> pur, CO<sub>2</sub> pur, N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> ou encore N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>. Une étude montre que la composition de l'atmosphère gazeuse n'influence pas forcément la courbe de croissance et la quantité finale de cellules mais modifie la production d'exopolysaccharides de la souche *B. longum* JBL05 (Ninomiya et al. 2009). Or ces exopolysaccharides sont soupçonnés dans l'effet probiotique des bactéries (Liu et al. 2011).

**Tableau 6:** Rendement de production de souches de *B. longum* en fonction des conditions de culture

Fermentation	Milieu	Souche	Productivité (x10 <sup>10</sup> UFC.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Référence bibliographique
Culture batch Pas de contrôle pH	Lait	<i>B. longum</i>	2,6	(Ventling and Mistry 1993)
	MRS	<i>B. longum</i> CRC 002	10,5	
	MRS*	<i>B. longum</i> ATCC 15707	27,5	(Doleyres et al. 2002)
Culture batch pH contrôlé	MRS	<i>B. longum</i> ATCC 15707	72	(Doleyres et al. 2002)
	MRS*	<i>B. longum</i> ATCC 15707	144	(Doleyres et al. 2002)
Culture continue pH contrôlé	MRS*	<i>B. longum</i> ATCC 15707	250-690	(Doleyres et al. 2002)

\* Milieu modifié

A la fin de l'étape de fermentation, les cellules sont récoltées, concentrées et lavées. La culture est ainsi concentrée entre 10 et 40 fois (Béal et al. 2008). La centrifugation peut cependant engendrer des altérations des propriétés de surfaces de la membrane et conduire à une inactivation des cellules (Peterson et al. 2012). Lors de l'opération de lavage, des composés protectants sont ajoutés pour permettre une meilleure survie des cellules au cours de l'étape suivante de séchage.

Le processus de fabrication est relativement stressant pour les cellules (contrôle du pH, centrifugation...) même si toutes les espèces ne présentent pas la même sensibilité à ces

perturbations. Des auteurs ont démontré la capacité de *L. plantarum* à s'adapter à différentes conditions de culture en modifiant ses voies métaboliques (Plumed-Ferrer et al. 2008). Si la synthèse des composés cellulaires essentiels et la réponse au stress de la bactérie ne sont pas affectées, la quantité finale de biomasse et les protéines exprimées varient selon le substrat. De même, les profils protéomiques de la souche *Lc. lactis* subsp. *cremoris* NCDO763 varient selon le milieu de croissance utilisé (lait écrémé, lait écrémé microfiltré ou M17) (Gitton et al. 2005).

Le contrôle des paramètres opératoires est également primordial dans la préservation de la fonctionnalité bactérienne. Ainsi, la température et la phase de croissance modifient l'activité antibactérienne *in vitro* de souches de *Lactobacillus* (Fayol-Messaoudi et al. 2005). De même, le temps de croissance modifie la capacité d'adhésion de la souche. Deepika *et al.*, ont montré sur la souche *L. rhamnosus* GG que l'adhésion était maximale après 13h (début de phase stationnaire) (Deepika et al. 2009). La phase de croissance joue également un rôle important dans l'effet immuno-modulateur de la souche *L. plantarum* WCFS1. Ainsi, l'effet anti-inflammatoire observé lors de l'ingestion de bactéries en phase exponentielle devient pro-inflammatoire en phase stationnaire (van Baarlen et al. 2011). De même, le milieu de croissance a un impact sur l'effet immuno-modulateur de la souche *Lc. lactis* subsp. *lactis* G50 (Kimoto-Nira et al. 2008). Ce résultat est confirmé par une étude récente montrant que le procédé de fabrication d'un lait fermenté peut modifier l'effet sur le système immunitaire (Souza et al. 2012). Enfin, le pH du milieu de croissance peut également modifier l'activité immuno-modulatrice (Sashihara et al. 2007). Des auteurs ont comparé le protéome de la souche *L. rhamnosus* GG après production dans les conditions de laboratoire (MRS) et production industrielle (milieu lait) et montrent de fortes différences (Koskenniemi et al. 2009). Ainsi, la production industrielle s'accompagne de la surexpression de certaines enzymes et de la diminution de l'expression d'autres protéines, notamment impliquées dans la formation du peptidoglycane. La modification du milieu lors du passage à l'échelle industrielle peut modifier les caractéristiques de la souche. L'identification des structures ou des composés à l'origine de l'effet probiotique est donc essentielle pour pouvoir quantifier l'impact réel des conditions de croissance sur la fonctionnalité microbienne.

La composition du milieu de culture influence aussi la résistance aux perturbations ultérieures (procédé, tractus) d'une souche microbienne. Une publication récente a montré que le pH du milieu de culture avait une influence très importante sur la morphologie et la survie de la souche *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 à l'acidité stomacale (Vinderola et al. 2011).

Aujourd'hui, en plus de l'optimisation de la quantité de biomasse, il apparaît essentiel de caractériser précisément la physiologie cellulaire au cours de la production, ou au moins avant et après culture. Par exemple, la cytométrie de flux et la PCR sont des outils permettant le suivi en continu de la fermentation et la caractérisation de la souche (Lacroix and Yildirim 2007). De plus, l'augmentation rapide de génomes bactériens séquencés disponibles (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*...) devrait aider dans le choix des composés du milieu de culture pour favoriser certaines voies (transporteurs spécifiques, synthèse de solutés...) ou améliorer certaines aptitudes probiotiques telle que la capacité d'adhésion (Teusink and Smid 2006).

*Ce second chapitre de l'analyse bibliographique montre que les phases de sélection et de production de bactéries probiotiques sont des étapes essentielles dans la commercialisation de nouveaux produits. De plus, les bactéries doivent répondre à des critères réglementaires précis, et être parfaitement caractérisées.*

*Les probiotiques peuvent être sélectionnés sur leurs aptitudes fonctionnelles, leurs tolérances aux perturbations du tractus ou leurs capacités de résistance au procédé de fabrication. Actuellement, la résistance au procédé de fabrication n'est pas prise en compte dans le cas de souches sélectionnées in vitro en laboratoire pour leurs aptitudes fonctionnelles. A contrario, le test de résistance à l'acidité stomacale est souvent déterminant pour classer les souches même si le manque d'homogénéité dans les protocoles expérimentaux ne facilite pas la comparaison entre études.*

*La production à grande échelle nécessite également une évolution de la composition du milieu de culture et des paramètres opératoires utilisés en laboratoire. Ces étapes du procédé de fabrication peuvent modifier la fonctionnalité des probiotiques. En effet, si la viabilité est toujours mesurée, la quantité de cellules mortes ou la validation de la fonctionnalité ne sont jamais prises en compte dans les études.*

*Dans le cadre de ce projet, nous avons choisi de d'abord classer les bactéries selon leurs aptitudes fonctionnelles in vitro (immuno-modulation). En effet, peu de micro-organismes possèdent un effet probiotique et on ne sait pas augmenter, ni réduire, la fonctionnalité. A ce niveau, deux choix sont possibles :*

- *Cas n°1 : Si plusieurs bactéries présentent une forte fonctionnalité, la résistance au procédé de fabrication et aux perturbations du tractus sera mesurée pour déterminer la souche la plus facilement industrialisable.*

- *Cas n°2 : Si une seule bactérie présente une forte fonctionnalité, des stratégies de protection seront développées pour la protéger lors du procédé de fabrication et du passage dans le tractus.*

*Un essai chez l'animal (souris) est également prévu afin de valider le choix de la souche avant la production industrielle.*

### 3. Stabilisation de micro-organismes

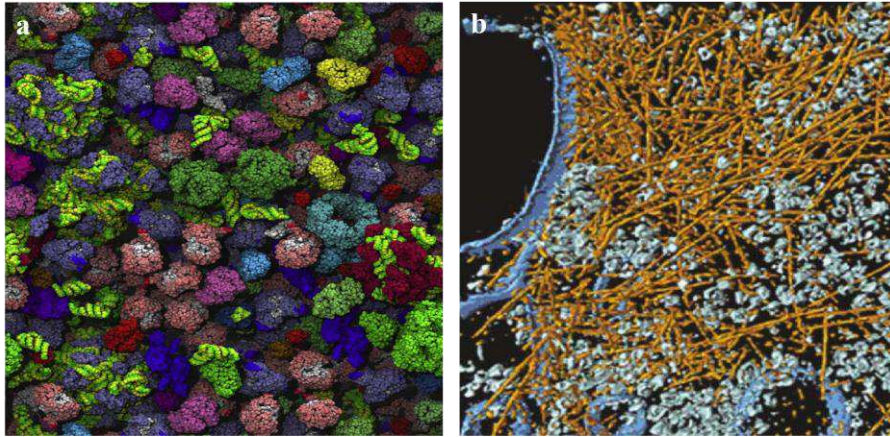
Que ce soit dans leur environnement naturel ou lors de procédés industriels, les perturbations hydriques de l'environnement imposent des contraintes physiques et physiologiques importantes aux micro-organismes. Selon la définition, le séchage est l'opération qui consiste à retirer l'eau d'un milieu. Or, l'eau est un composant majeur qui représente environ 70% du volume des cellules. La molécule d'eau est formée d'un atome d'oxygène relié à deux atomes d'hydrogène. En raison de sa polarité, l'atome d'hydrogène d'une molécule d'eau peut former des liaisons hydrogènes avec des molécules d'eau ou d'autres molécules. Ces liaisons hydrogènes ont un temps de vie moyen d'environ 1 picoseconde, mais ne cessent de se former et de se déformer. L'eau joue donc un rôle important et différent en fonction de sa concentration dans le milieu. Ainsi, l'eau n'est pas seulement un solvant mais aussi une matrice active qui interagit avec les biomolécules, un élément essentiel à la structure et la fonctionnalité des cellules (Ball 2008).

#### 3.1. L'eau composant actif des cellules biologiques

Dans une cellule, la membrane sépare le cytoplasme du milieu extracellulaire, les enzymes orchestrent les flux d'information, d'énergie et de matériel biologique, alors que les acides nucléiques portent l'information. L'ensemble de ces structures interagit et échange pour permettre la colonisation de l'environnement (Ball 2008). Le cytoplasme contient ainsi approximativement jusqu'à 400 g/L de macromolécules (Figure 8), ce qui représente 5 à 40% du volume total de la cellule (Ellis and Minton 2003). Cet encombrement a pour conséquence directe une diminution importante de la vitesse de diffusion des molécules, les macromolécules étant séparées par seulement 1-2 nm (Ball 2008). Une étude récente menée sur *E. coli* a montré que 15% de l'eau intracellulaire, correspondant à la couche d'eau autour des macromolécules, avait une mobilité (propriétés rotationnelles) retardée d'un facteur 15 par rapport à de l'eau libre (Persson and Halle 2008).

Dans la plupart des cas, les écosystèmes bactériens (dans le sol, aux interfaces et même dans le tractus digestif) sont soumis à de fréquentes fluctuations hydriques. La déshydratation du milieu conduit à une sortie d'eau des cellules et une contraction volumique.



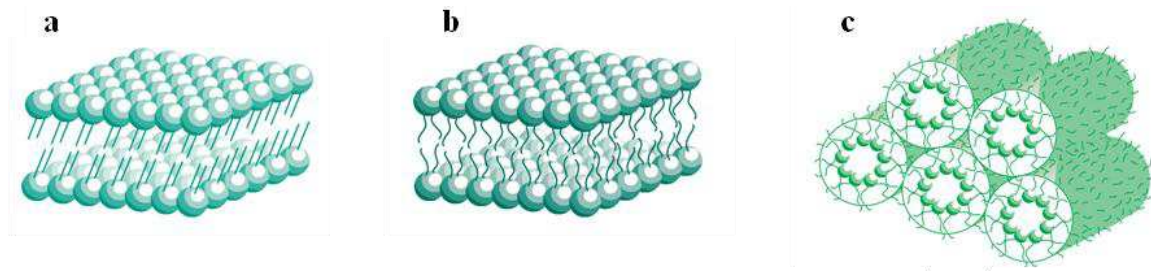


**Figure 8:** Représentation de l'encombrement du cytoplasme d'une cellule. (a) Vision schématique (McGuffee and Elcock 2010) ou (b) chez *Dictyostelium discoideum*, avec les filaments d'actine en orange, les membranes en bleu foncé et les autres macromolécules en bleu clair (Medalia et al. 2002)

### 3.1.1. L'eau comme élément structurant

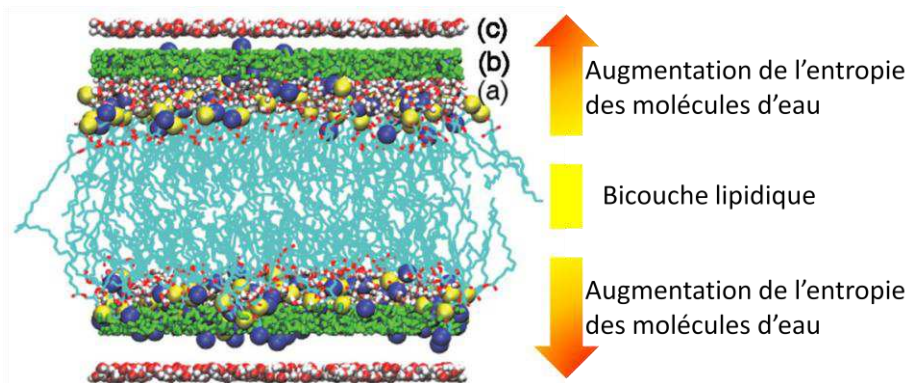
Un rôle primordial de l'eau dans la cellule est de structurer les macromolécules. Les molécules d'eau confinées dans des espaces étroits possèdent des propriétés différentes de celles localisées dans la masse. C'est notamment le cas pour l'eau située autour des macromolécules comme les protéines. La couche d'hydratation n'est pas forcément uniforme autour des protéines, mais plutôt un patchwork de clusters d'eau. En s'éloignant de la protéine, les molécules d'eau deviennent désordonnées. Il a été également démontré qu'une diminution de la quantité d'eau affectait directement la couche d'hydratation des protéines et leur structure, notamment les régions mobiles. Les modifications structurales observées sont semblables à celles qui se produisent pendant la liaison au substrat. Par conséquent, il a été possible d'établir une relation entre l'hydratation, la mobilité et la fonctionnalité des enzymes (Nagendra et al. 1998). De nombreuses liaisons avec les molécules d'eau entre les différentes régions de la molécule sont conservées, même lorsque le niveau d'hydratation est bien inférieur à celui requis pour l'activité. La perte d'activité qui accompagne la déshydratation semble être causée par la disparition des molécules d'eau localisées au niveau du site actif et nécessaires à la reconnaissance enzyme-substrat (Nagendra et al. 1998).

L'eau possède également un rôle structurant pour les membranes des micro-organismes. Ces membranes sont composées de phospholipides organisés en bicouches dans lesquelles sont insérées des protéines. A l'état physiologique, les phospholipides membranaires sont dans un état liquide-cristallin ( $L_a$ ) (Figure 9).



**Figure 9:** Arrangements possibles des phospholipides membranaires. (a) phase gel notée  $L_{\beta}$ , (b) phase liquide notée  $L_{\alpha}$ , (c) phase hexagonale notée  $H_{II}$  (Vigh et al. 1998)

La déshydratation des phospholipides induit une transition de phase de l'état liquide cristallin ( $L_{\alpha}$ ) vers l'état gel ( $L_{\beta}$ ) (Beney and Gervais 2001) (Figure 9). Or, à l'état gel la couche d'hydratation n'est plus la même. Ainsi, en parallèle de la transition de phase lipidique, les molécules d'eau sont plus ordonnées et les liaisons hydrogènes renforcées (Binder 2007). De plus, chaque molécule d'eau possède un moment dipolaire (1,8 Debye). Ainsi, une perturbation hydrique peut également contribuer à une modification du potentiel électrique de surface (Gawrisch et al. 1992). D'autres travaux ont montré la présence de trois couches d'hydratation différentes à proximité d'une bicouche membranaire (Figure 10), avec des propriétés dynamiques (diffusion, relaxation...) et une entropie différente (Debnath et al. 2010).



**Figure 10:** Représentation des couches d'hydratation dans une bicouche lipidique. Trois couches d'eau présentant une entropie croissante ont été identifiées, les molécules situées à l'interface (a), celle intermédiaires (b) et les molécules dans la masse (c) (Debnath et al. 2010)

Enfin, l'eau permet de stabiliser la structure des acides nucléiques (Fuller et al. 2004). L'hydratation de la structure de l'ADN joue un rôle fonctionnel en déterminant sa conformation (Brovchenko et al. 2007).

### 3.1.2. L'eau comme solvant des réactions biochimiques

De par ses caractéristiques, l'eau joue un rôle crucial dans les fonctions membranaires et la régulation des protéines. Des auteurs ont observé que le gradient de mobilité des

molécules d'eau associé au site actif d'une enzyme (metalloprotease) favorisait les interactions enzyme-substrat. Ce mécanisme est induit par l'ion métallique et le site actif de l'enzyme (Ball 2011; Grossman et al. 2011). Il semble que l'eau joue un rôle vital dans la fixation du substrat et la reconnaissance moléculaire entre les deux entités (Ball 2011).

De plus, en raison de sa constante diélectrique élevée, l'eau est un très bon solvant pour les ions et les poly-électrolytes (ADN, protéines...) (Ball 2008). Ainsi, les molécules d'eau solvatent les cations en orientant leurs atomes d'oxygène vers l'ion, alors qu'elles orientent leurs atomes d'hydrogène vers l'ion dans le cas des anions. Enfin, l'eau facilite également le transfert d'électrons entre les protéines et autres biomolécules.

### 3.2. Impact du retrait de l'eau sur les cellules

Le séchage est un procédé de stabilisation qui consiste à retirer l'eau du milieu pour ralentir les réactions biochimiques. Or, ces molécules d'eau structurent les macromolécules et favorisent les échanges. Ce stress va donc pouvoir altérer la structure et la fonctionnalité des bactéries probiotiques. Généralement, l'eau passe de la phase liquide contenant les cellules à la phase gazeuse de l'environnement. Ce phénomène induit une sortie d'eau du milieu intracellulaire vers l'environnement extérieur, entraîne une augmentation du rapport surface/volume des cellules et une augmentation de la concentration en solutés. Lorsque la majorité de l'eau du milieu a disparu, les cellules se retrouvent en contact direct avec la phase gazeuse et notamment les molécules d'oxygène. Ces deux perturbations, la sortie d'eau et le stress oxydant sont détaillés dans les deux sections suivantes.

#### 3.2.1. Mécanismes à l'origine des transferts d'eau entre la cellule et son environnement

L'étude des phénomènes se déroulant au cours du procédé de séchage se révèle particulièrement complexe en raison de la transition de l'état liquide vers l'état solide. Ainsi, la plupart des études s'intéressant à la dynamique du comportement des cellules au cours de la déshydratation ont été effectuées dans des milieux liquides modèles qui reproduisent les transferts d'eau observés lors du séchage. En effet, l'ajout d'un soluté (sel, sucre, polyol) dans de l'eau pure conduit à une modification de l'état hydrique du milieu. En accord avec l'équation de Gibbs-Donnan, il y a un flux d'eau important depuis le compartiment intracellulaire vers le milieu extérieur jusqu'à l'équilibre des activités de l'eau entre les deux compartiments (Potts 1994). On parle alors de déshydratation en milieu liquide.

L'hydratation du milieu influence directement l'hydratation des cellules et il est largement admis que les transferts d'eau entre la cellule et le milieu externe ne résultent pas de phénomènes actifs. Au plan thermodynamique, ces mouvements sont régis par des gradients de potentiel chimique qui s'établissent à l'interface (membrane plasmique) entre la cellule et le milieu. Le potentiel chimique de l'eau dans une solution correspond essentiellement à :

$$\mu_w = \mu_w^0 + RT \ln a_w + \bar{V}_w P \quad (1)$$

L'eau pure est la référence pour l'état standard initial  $\mu_w^0$ . L'équation 1 peut donc être transformée :

$$\frac{\mu_w - \mu_w^0}{\bar{V}_w} = \frac{RT \ln a_w}{\bar{V}_w} + P = \psi_s + \psi_p \quad (2) \text{ avec } \psi_s = \frac{RT \ln a_w}{\bar{V}_w} \text{ et } \psi_p = P \quad (3)$$

Le premier terme représente le potentiel de l'eau et est symbolisé par  $\Psi$  (Pa). Le potentiel de l'eau dans une solution liquide résulte de deux composants  $\Psi_s$  (attribuable aux solutés présents dans la solution), et  $\Psi_p$  (résultant de la pression hydrostatique). La pression osmotique  $\Pi$  d'une solution est liée au potentiel osmotique par la relation :

$$\Pi = -\Psi_s \quad (4)$$

En situation de croissance optimale, les concentrations intracellulaires sont supérieures à celles du milieu externe. Ceci implique que le potentiel hydrique osmotique intracellulaire est plus faible qu'à l'extérieur. La présence de la membrane hémiperméable, perméable à l'eau et faiblement perméable aux solutés hydrophiles, donne lieu à l'établissement spontané de flux osmotiques (principalement de l'eau) vers l'intérieur des cellules. La résistance à l'étirement de l'enveloppe cellulaire contient cet afflux d'eau qui s'exprime par une augmentation du potentiel isostatique interne (Zimmermann 1977) par rapport au potentiel isostatique externe et explique la pression de turgescence intracellulaire ( $\Delta P = \Psi_p^C - \Psi_p^E$ ). La pression de turgescence dépend fortement du type de micro-organisme (Tableau 7).

**Tableau 7:** Pression de turgescence de différents types de micro-organismes

Type de micro-organisme	Pression de turgescence (MPa)	Références bibliographiques
Levures	0,05 à 0,2	(de Maranon et al. 1996)
Bactéries Gram positif	1,5 à 2,5	(Poolman and Glaasker 1998)
Bactéries Gram négatif	0,3 à 1,1	(Koch 1988)

A l'issue d'une variation du potentiel hydrique du milieu, qui entraîne une variation du potentiel hydrique intracellulaire, la cellule atteint un nouvel état stationnaire. Ce

rééquilibrage des potentiels hydriques résulte de la variation du volume cellulaire. Le volume final atteint est relié à la pression osmotique par la relation de Boyle Van't Hoff :

$$\pi = \Psi_s = R.T. \frac{n_s}{V} \quad (5)$$

Car l' $a_w$  est égale à la fraction molaire en eau. La fraction  $\frac{n_s}{V}$  est la concentration en soluté exprimée en  $\text{mol.m}^{-3}$

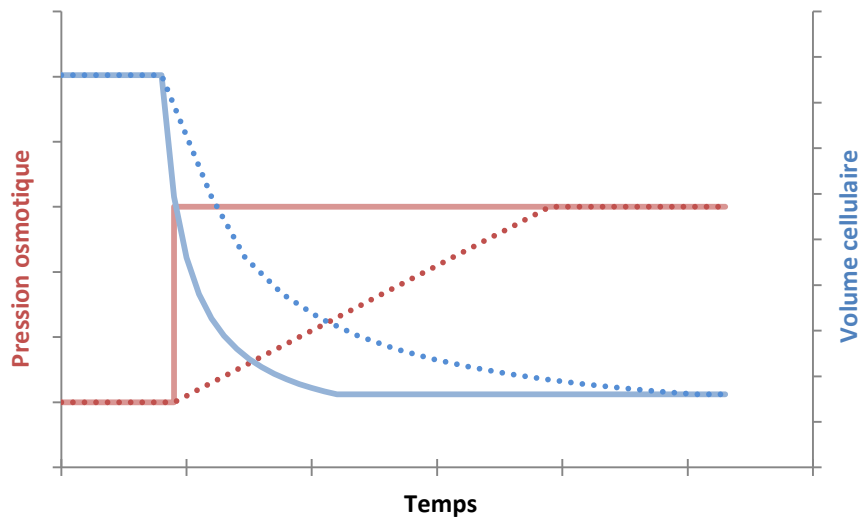
Alors,

$$V = \frac{R.T.n_s}{\pi} \quad (6)$$

Les composants qui n'influencent pas la pression osmotique forment le volume non osmotique  $b$  :

$$V - b = \frac{R.T.n_s}{\pi} \quad (7)$$

Le volume non osmotique représente environ 15% du volume cellulaire physiologique d'*E. coli* (Poirier et al. 1998) et 40% de *S. cerevisiae* (de Maranon et al. 1996). Dans le cas d'un stress hyperosmotique, l'eau intracellulaire a tendance à sortir de la cellule, ce qui a pour conséquence l'annulation de la pression de turgescence puis la diminution du volume cellulaire jusqu'à un nouvel état d'équilibre (Figure 11).



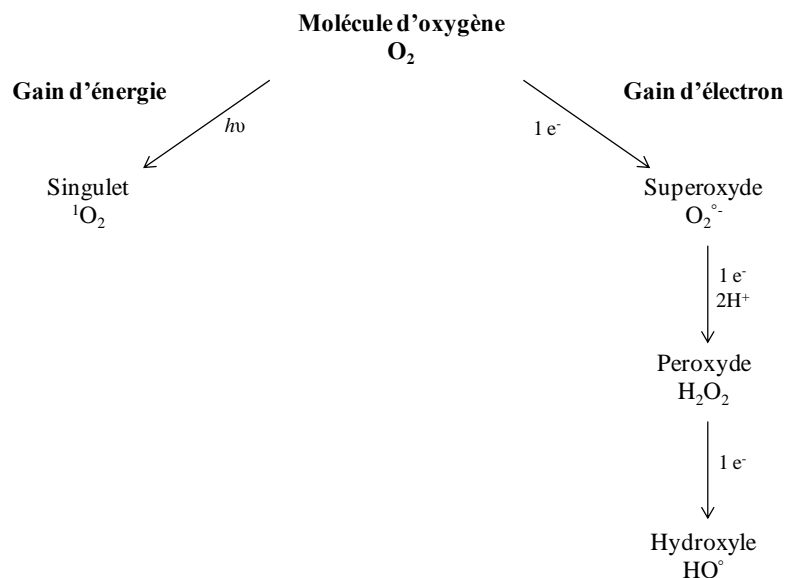
**Figure 11:** Représentation schématique de la variation de pression osmotique et du volume cellulaire des micro-organismes. La variation de pression osmotique est représentée pour un choc (—) et pour une rampe (---). De même, l'évolution du volume cellulaire est figurée pour un choc (—) et pour une rampe (---)

La cinétique de ce phénomène est principalement liée à la résistance qu'oppose la membrane cellulaire au transfert de l'eau et des solutés, au rapport entre la quantité de surface et le volume de la cellule ainsi qu'à la vitesse d'apparition du gradient de potentiel hydrique entre la cellule et le milieu.

### 3.2.2. Rôle du stress oxydant

Si plusieurs études admettent un effet du stress oxydant lors du séchage, ce dernier est assez mal caractérisé. Au cours du séchage, les cellules sont d'abord dans un milieu liquide avant de se retrouver en contact direct avec les molécules d'oxygène de l'air. Il apparaît également que la déshydratation induit une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, les radicaux libres, qui peuvent provoquer une altération des lipides, des protéines et/ou de l'ADN et avoir des conséquences importantes sur le métabolisme cellulaire (França et al. 2007).

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres qui interviennent ont une propriété caractéristique commune, celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène (Delattre et al. 2005). Il existe deux grandes classes de radicaux libres, formés soit par un transfert d'électron, soit par un transfert d'énergie (Ziegelhoffer and Donohue 2009). Le transfert d'électron à une molécule d'oxygène peut former le radical superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et le radical hydroxyle  $\cdot OH$ , tous trois toxiques pour les cellules. Dans le second type de réaction, le transfert d'énergie à une molécule d'oxygène conduit à la formation de l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) (Ziegelhoffer and Donohue 2009).



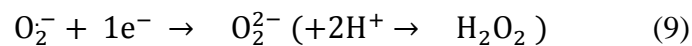
**Figure 12:** Radicaux libres formés à partir de la molécule d'oxygène

Le dioxygène est un diradical stable, qui contient 2 électrons non appariés avec le même nombre quantique de spin sur son orbitale la plus externe. Cette organisation permet à la molécule d' $O_2$  d'accepter des électrons lorsqu'elle va oxyder un autre atome. Cependant, en

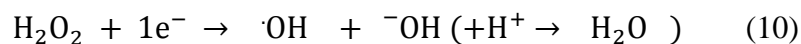
raison du principe de Pauli, l'oxygène ne pourra accepter les électrons que un par un. Ainsi, la molécule d'O<sub>2</sub> devient la forme réduite O<sub>2</sub><sup>-</sup>, que l'on nomme radical superoxyde.



Sous la forme d'un radical superoxyde, la molécule d'oxygène peut alors accepter un autre électron supplémentaire et former une espèce non radicalaire, le peroxyde d'hydrogène (Delattre et al. 2005).



Le peroxyde d'hydrogène est régulé *in vivo* grâce à la catalase qui accélère sa dismutation et à la glutathion peroxydase qui catalyse sa réduction. L'ajout d'un autre électron à l'oxygène entraîne la fragmentation de la molécule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la formation d'un radical hydroxyle (Delattre et al. 2005). La genèse des radicaux hydroxyles est due à la réaction de Fenton, qui nécessite un ion métallique divalent (fer ou cuivre) et un équivalent réducteur (NADH) pour régénérer le métal.



Les radicaux hydroxyles sont très réactifs (Tableau 8) mais peu sélectifs, ayant une durée de vie courte (10<sup>-6</sup>s), qui diffusent très peu et réagissent sur leur lieu de production (à quelques dizaines de nanomètres de distance) (Delattre et al. 2005). A contrario, les radicaux superoxydes possèdent des constantes de vitesse plus faibles (< 10<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>.L.s<sup>-1</sup>) avec des durées de vie élevées (dizaine de seconde) et peuvent diffuser au-delà de leur lieu de production. Leur effet délétère est souvent lié à la réaction de Haber Weiss (réaction 11) :



Plus généralement, O<sub>2</sub><sup>-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réagissent préférentiellement avec les protéines alors que ·OH cause des dommages à l'ADN (Ziegelhoffer and Donohue 2009). Les vitesses de réactions sont particulièrement élevées, notamment avec les protéines et les lipides.

**Tableau 8 :** Constantes de vitesse des radicaux hydroxyyles avec divers substrats biologiques (Farhataziz and Ross 1977)

Substrat biologique	Constante de vitesse ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ )
Cystéine	$4,0 \times 10^{10}$
Linoléate	$1,1 \times 10^{10}$
Glucose	$7,4 \times 10^8$
ADN	$4,0 \times 10^8$

L'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) peut-être formé à partir de l'énergie lumineuse ( $h\nu$ ), d'une réaction enzymatique ou d'une source exogène d'énergie. Il se produit alors une inversion de spin de l'un des deux électrons non appariés de l'oxygène. Ce radical est le plus réactif de toutes les espèces. Il réagit avec tous les composants de la cellule, les acides gras polyinsaturés de la membrane, les protéines et les acides nucléiques (Ziegelhoffer and Donohue 2009). Sa durée de vie est d'environ 45 minutes en phase gazeuse alors qu'elle est seulement de l'ordre de la microseconde dans l'eau (Piette 1991).

Les micro-organismes possèdent généralement une résistance limitée à l'oxygène, notamment les espèces anaérobies et microaérophiles (Imlay 2003). Les conséquences directes de ce stress oxydant peuvent être une peroxydation des lipides insaturés, une oxydation des protéines et/ou de l'ADN. La peroxydation des membranes peut altérer leur fonctionnalité (fluidité, modification de la perméabilité, perte d'activités enzymatiques).

Lors de l'exposition à un stress oxydant, l'expression de nombreux gènes est affectée (Ceragioli et al. 2010; Mols and Abee 2011). Ainsi, les gènes codant pour les catalases, thioredoxines reductases et peroxidases sont surexprimés. La formation de radicaux libres a été détectée chez des cellules végétales lors du séchage (Price et al. 1989). Si l'origine exacte de ces espèces réactives est encore inconnue, il semble que l'arrêt du métabolisme ou les modifications intracellulaires induites par le séchage (perte d'eau, concentration de macromolécules, modification du pH...) puissent provoquer leur apparition.

### 3.2.3. Conséquences structurales et fonctionnelles du séchage sur les cellules

Le procédé de séchage se décompose généralement en trois étapes :

- la déshydratation
- le maintien à l'état sec
- la réhydratation



Cette transition d'un milieu liquide à un milieu solide lors de la déshydratation puis d'un milieu solide à un milieu liquide lors de la réhydratation va induire des modifications structurales et fonctionnelles des cellules. Dans cette partie, nous nous intéresserons uniquement aux perturbations hydriques importantes, entraînant un arrêt du métabolisme et correspondant au niveau d'hydratation atteint pour conserver des micro-organismes sur de longues périodes ( $a_w < 0,30$ ).

### 3.2.3.1. Effet du séchage sur la membrane

La membrane cellulaire est généralement considérée comme la « cible privilégiée » des perturbations hydriques. Au cours du procédé de séchage, les membranes peuvent subir des modifications morphologiques, fusionner et perdre une partie de leur fonctionnalité (Potts 1994). Lors de la sortie d'eau, la densité de têtes polaires dans la membrane augmente, ce qui conduit à une augmentation des interactions de van der Waals et, par conséquent, de la température de transition de phase lipidique (Crowe et al. 1992). La température à laquelle les lipides passent d'une conformation fluide ( $L_\alpha$ ) à une conformation structurée ( $L_\beta$ ), est la température de transition de phase liquide-gel ( $T_m$ ). Lors d'un séchage, les lipides de la membrane passent en phase gel (Figure 9). La présence de différents lipides possédant chacun leurs propres  $T_m$ , peut provoquer la coexistence de phases durant les étapes de déshydratation et réhydratation. De façon plus générale, la réorganisation membranaire prend du temps et pourrait être à l'origine de modifications de la perméabilité membranaire (Milhaud 2004).

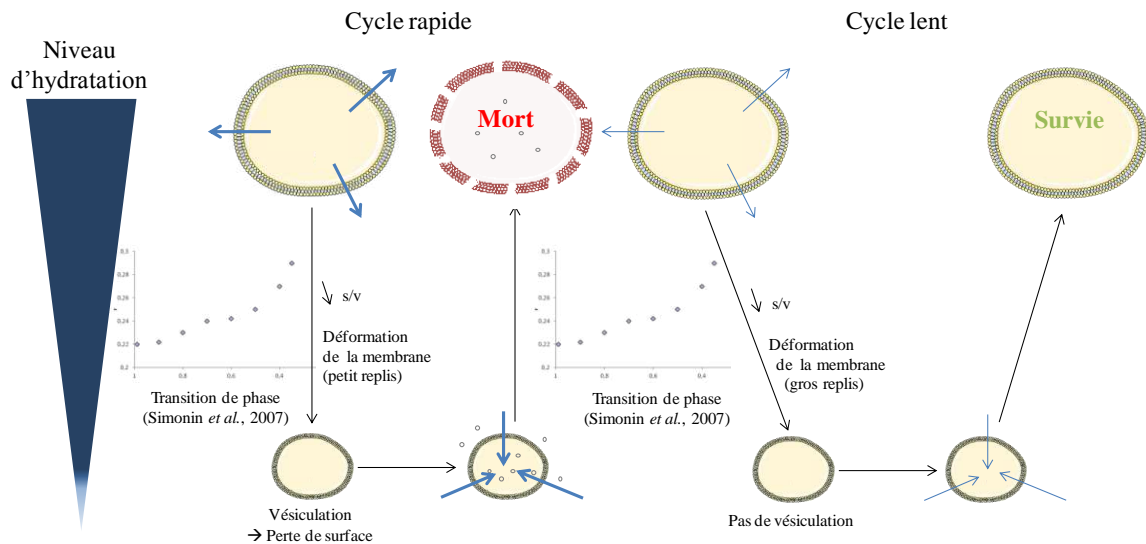
Gervais et al., ont observé, en milieu liquide, que la cinétique de variation de la pression osmotique modifiait grandement le taux de survie des micro-organismes (Gervais et al. 1992). Ces résultats ont conduit à proposer une explication mécanique et un impact des flux d'eau sur l'élasticité membranaire. L'utilisation de l'IRTF et de la microscopie électronique a montré que les perturbations osmotiques en milieu liquide induisaient un changement de conformation des phospholipides membranaires et des phénomènes de vésiculation (Mille et al. 2002). Les mêmes auteurs ont démontré un impact de la cinétique de réhydratation sur la survie de la souche *E. coli* K12 à une déshydratation en milieu liquide (Mille et al. 2003). Ainsi, le taux de survie passe de 0,7% pour une réhydratation instantanée à 36% lors d'une réhydratation en 16 minutes. L'utilisation de sondes spécifiques (DPH, Laurdan) en spectroscopie de fluorescence a permis d'identifier le passage de la transition de phase lipidique comme une étape clef des étapes de déshydratation et réhydratation (Beney et al. 2007). Ces observations ont conduit à proposer un scénario sur la mort des cellules au cours

de perturbations osmotiques rapides (Simonin et al. 2007). Ainsi, la sortie d'eau entraîne une séparation de phase des phospholipides et une augmentation de la perméabilité membranaire (61-133 MPa). La transition de phase lipidique affecte également la résistance de la membrane aux forces de cisaillement et à la contraction volumique. Trois types de cellules sont alors observables à l'état déshydraté (Simonin et al. 2007) :

- des cellules perméabilisées par l'étape de déshydratation (non revivifiables)
- des cellules qui ont subi une perte de surface membranaire par endo-vésiculation (non revivifiables)
- des cellules dont la membrane est plissée (revivifiables)

L'utilisation d'IRTF sur la bactérie *Geobacter sulfurreducens* a montré un impact différent des cinétiques rapides et des cinétiques lentes sur la membrane (Ragoonanan et al. 2008). Un choc hyperosmotique se caractérise par une perte d'interactions entre lipides à l'origine de la perméabilisation cellulaire. A contrario, une déshydratation lente entraîne des changements structurels plus subtils telles qu'une augmentation de la  $T_m$  et une modification de l'ordre des lipides. De plus, la corrélation directe entre  $T_m$  et taux de survie lors d'une déshydratation lente montre que la diminution de l'activité de l'eau est directement responsable des dommages à la cellule. Ces résultats soulignent l'existence de deux mécanismes de dommages à la membrane différents pour un choc hyperosmotique et une déshydratation lente.

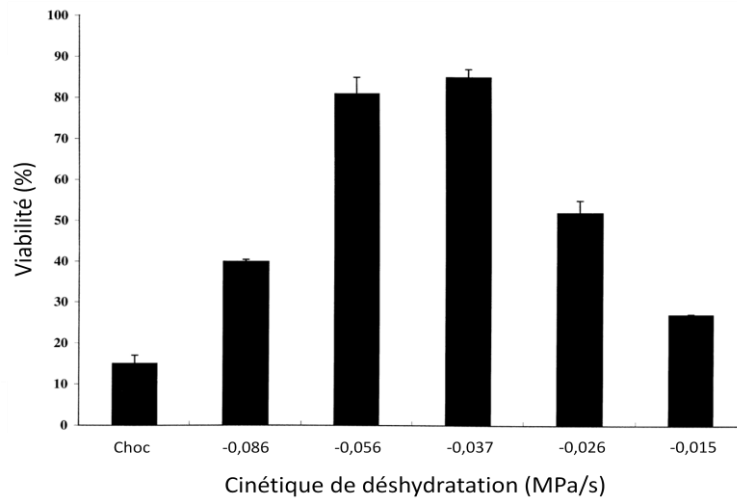
Récemment, une étude menée en milieu liquide, sur la levure *S. cerevisiae*, a montré que les mécanismes à l'origine de la survie lors d'un stress osmotique étaient directement reliés au comportement membranaire (Dupont, 2010). En effet, lorsque le transfert d'eau est progressif, la membrane plasmique se plisse pour supporter l'augmentation du rapport surface/volume (s/v) et aucune internalisation n'est observée. Une réorganisation des zones riches en stérols a également pu être mise en évidence. Lors de la réhydratation, la membrane se déplisse et les levures peuvent ainsi retrouver leur volume initial sans se perméabiliser. A contrario, une déshydratation brutale engendre une absence de réorganisation des zones riches en stérols et une internalisation de membrane conduisant à une diminution de la surface disponible. Ces événements sont à l'origine de la perméabilisation des levures au cours de l'étape de réhydratation. Il paraît vraisemblable que les phénomènes de réorganisation, à l'origine de la survie cellulaire, soient reliés à la transition de phase lipidique. En effet, la transition de phase lyotropique n'est pas instantanée et nécessite du temps (Milhaud, 2004). Ces mécanismes sont schématisés sur la Figure 13.



**Figure 13:** Modifications structurales induites lors de perturbations hydriques

Concernant les bactéries, l'étude de tels mécanismes se révèle particulièrement ardue en raison de la taille des cellules. Cependant, l'existence de transitions de phases, de contraintes mécaniques (Mille et al. 2003) et d'une compartimentation membranaire chez les procaryotes, avec des domaines riches en cardiolipides, laisse augurer l'existence de mécanismes relativement proches (Mileykovskaya and Dowhan 2000; Mileykovskaya and Dowhan 2009). Une augmentation de la quantité de malondialdéhyde (MDA), un produit de la peroxydation lipidique, a été détectée lors du séchage de *S. cerevisiae* (França et al. 2007; Pereira et al. 2003). Au niveau cellulaire, la peroxydation lipidique a pour conséquence une diminution des interactions hydrophobes entre lipides et entre les lipides et les protéines membranaires (Garre et al. 2010).

Plusieurs paramètres opératoires comme la température, l'amplitude ou la vitesse de déshydratation influent sur la survie des microorganismes. La Figure 14 montre le taux de survie de la souche *L. plantarum* L-73 en fonction de la vitesse de déshydratation en milieu liquide (glycérol). Les vitesses rapides ou lentes induisent de faibles taux de survie (< 30%). A contrario, pour les vitesses intermédiaires (0,037 et 0,056 MPa/s), la viabilité est supérieure à 80%. Selon les auteurs, une bonne corrélation a été observée entre déshydratation en milieu liquide et séchage en milieu aérien.



**Figure 14:** Taux de survie de la souche *L. plantarum* L-73 en fonction de la vitesse de déshydratation. Les cellules ont été déshydratées en présence de glycérol ( $a_w=0,11$ ) (Poirier et al. 1997)

La température de déshydratation peut modifier le taux de survie des cellules. Ainsi, Beney et al, montrent que la survie de la levure *S. cerevisiae* augmente avec l'abaissement de la température (Beney et al. 2001). D'autres travaux montrent également un meilleur taux de survie des levures à un choc osmotique à basse température ( $< 8$  °C) et pour des températures supérieures à 25 °C (Laroche et al. 2001). La maîtrise du niveau d'hydratation et de la température permet de contrôler la fluidité membranaire des microorganismes durant les étapes de déshydratation et de réhydratation (Simonin et al. 2008).

### 3.2.3.2. Effet du séchage sur les autres structures cellulaires

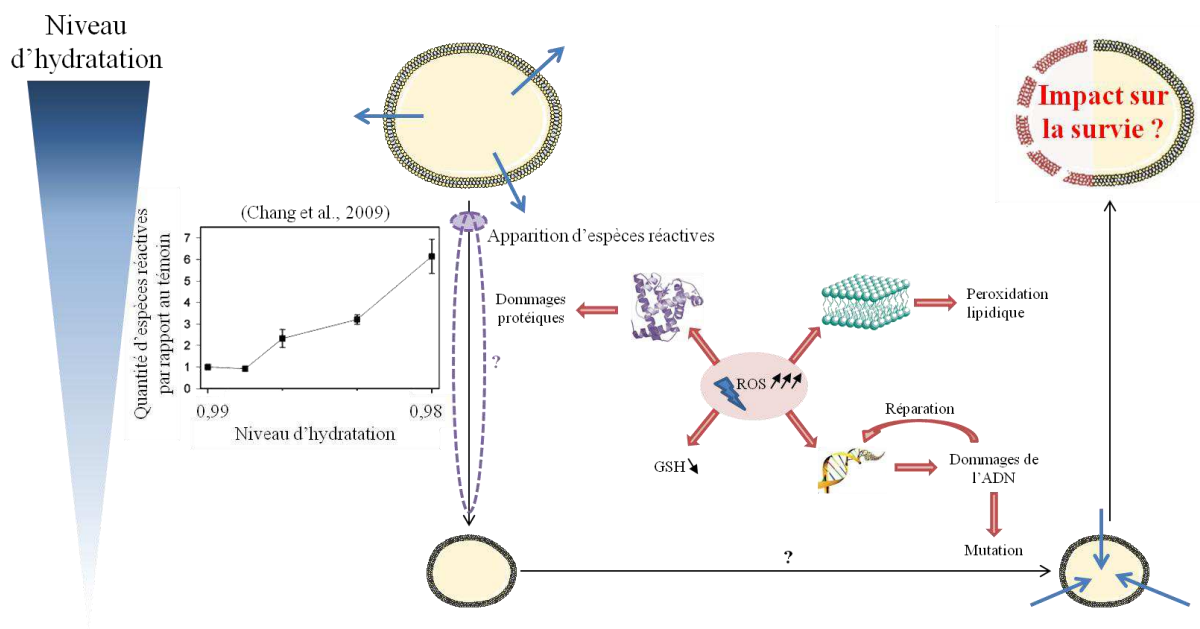
Durant les premières étapes du séchage, la cellule peut mettre en place des mécanismes de régulation pour lutter contre le stress hydrique (Klipp et al. 2005). Certains systèmes biochimiques permettent de protéger les cellules contre les radicaux libres, comme les enzymes (SOD) (França et al. 2005; Pereira et al. 2003) ou les molécules non enzymatiques (NADPH, NADH,  $\beta$ -carotène, acide ascorbique, glutathion, thiorédoxine) (Espindola et al. 2003). Par exemple, le glutathion joue un rôle prépondérant dans la protection des membranes cellulaires et dans le maintien de l'homéostasie redox. Cette molécule est maintenue sous sa forme réduite (GSH) par la glutathion réductase qui utilise le NADPH comme équivalent réducteur (Cabiscol et al. 2000). Garre et al., ont montré chez la levure *S. cerevisiae* que le séchage induisait une surexpression des gènes *TRR1* et *GRX5* impliqués dans la réponse à un stress oxydant (Garre et al. 2010). De même, la surexpression du gène *TRX2*, codant pour une thiorédoxine, entraîne une diminution des dommages du stress oxydant (Gómez-Pastor et al. 2010). Enfin, il a également été montré que l'exposition

des cellules à des fortes concentrations en sels conduisait à une augmentation de l'activité catalase chez *B. cereus* (den Besten et al. 2009). Il semble que le stress oxydant apparaisse très tôt lors du séchage (Chang et al. 2009).

Aux plus faibles valeurs d'hydratation les structures cellulaires peuvent être touchées. Ainsi, la déshydratation induit des modifications conformationnelles importantes qui peuvent entraîner une perte de fonctionnalité des protéines. En effet, le retrait de l'eau conduit à une diminution des liaisons hydrogènes entre protéines et molécules d'eau, ce qui peut induire des transitions structurales (dénaturation, agrégation...) et une diminution de l'activité biologique après réhydratation. Lors d'un séchage à une humidité relative de 30%, la quantité d'eau résiduelle dans la cellule est d'environ 0,03g/g de matière sèche. Or, la quantité d'eau minimum pour le maintien de la structure des protéines est d'environ 0,05g/g de matière sèche (Potts 1994). Selon le type de protéine, trois comportements face au procédé de déshydratation ont été identifiés (Prestrelski et al. 1993) :

- une résistance aux modifications conformationnelles
- un dépliement durant la déshydratation et un repliement lors de la réhydratation
- un dépliement durant la déshydratation et une perte définitive de la structure

Les protéines peuvent également subir des réactions d'oxydation, ce qui conduit à une altération de leur fonctionnalité ou à leur inactivation (Figure 15).



**Figure 15:** Impact du stress oxydant lors de perturbations hydriques

Des études en IRTF montrent des modifications conformationnelles induites par le séchage avec une diminution des hélices  $\alpha$  et une augmentation des feuillets  $\beta$  (Roy and Gupta 2004).

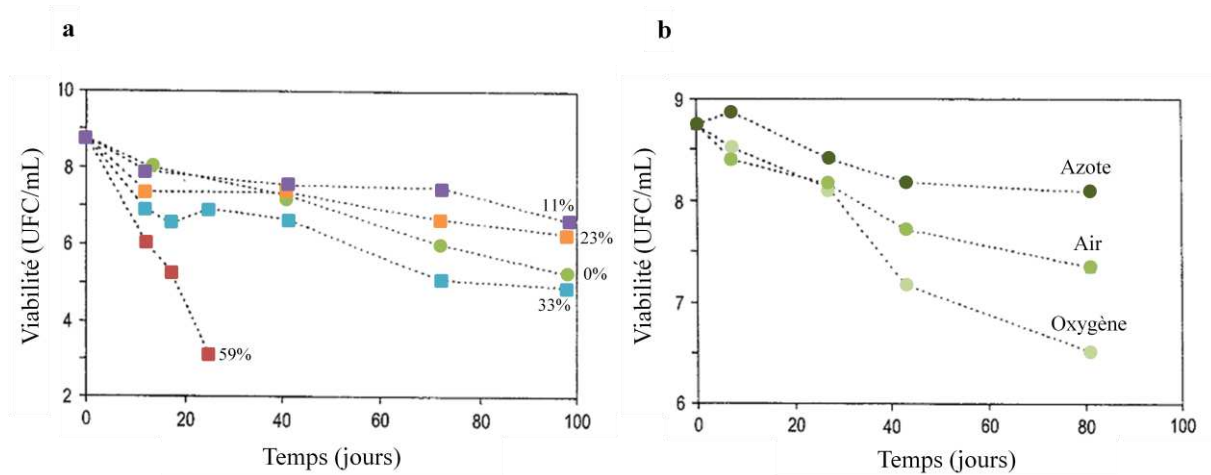
Les acides nucléiques sont également susceptibles d'être affectés par le retrait d'eau. Ainsi, la souche *E. coli* est sensible à une mutation de l'arginine pour un séchage à une activité de l'eau inférieure à 0,53. Par comparaison, l'énergie nécessaire à la dépurination de l'ADN est environ 6 fois plus élevée que l'énergie nécessaire à la dénaturation protéique (Potts 1994).

#### 3.2.4. Maitrise des conditions de stockage

La survie des bactéries au cours du temps dépend de nombreux paramètres comme l' $a_w$ , la température, la présence d'oxygène, la présence de lumière (Kurtmann et al. 2009). Tout d'abord, l' $a_w$  de stockage est un paramètre essentiel sur la survie des micro-organismes (Figure 16). Castro et al., ont stocké des cellules de *L. bulgaricus* lyophilisées à différentes humidités relatives (0%, 11%, 23%, 33% et 59% HR). Ils montrent une meilleure conservation de la souche à 11% et 23% HR (Castro et al. 1995). Deux souches de *Lactobacillus kefir* possèdent également les plus fortes valeurs de survie lors d'un stockage à de faibles niveaux d'hydratation (0-11% HR) (Golowcycz et al. 2010).

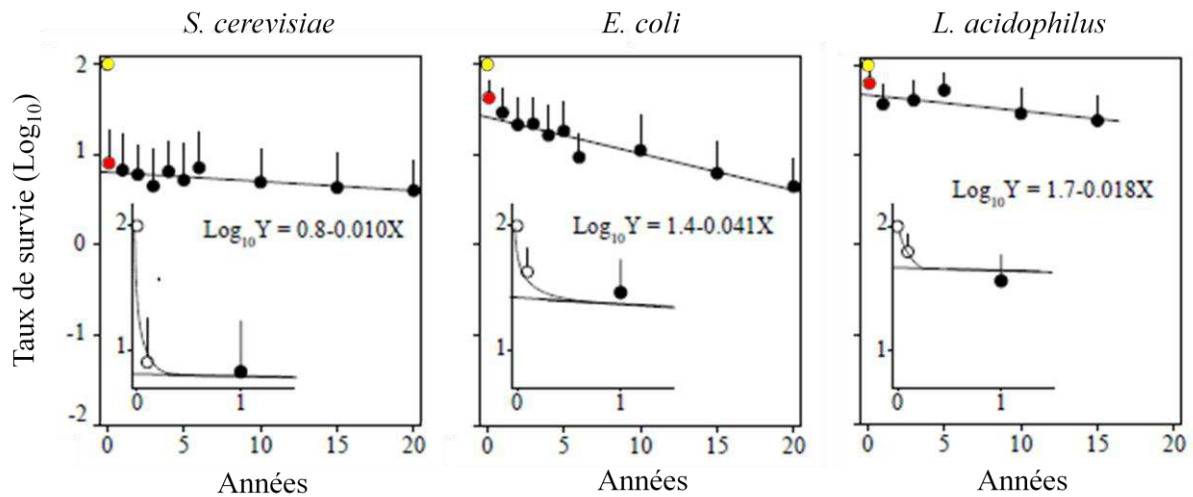
La température de stockage de la souche *L. paracasei* NFBC 338, atomisée sans adjuvants ou en présence de gomme acacia affecte fortement la survie (Desmond et al. 2002). Lors du stockage, il est également primordial de diminuer au maximum la mobilité pour retarder les réactions de dégradation. Ainsi, la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) est un facteur important sur la viabilité. La haute viscosité du verre sous ou autour de la  $T_g$  retarde la mobilité moléculaire et la vitesse des réactions. Le stockage à une température sous la  $T_g$  augmente la stabilité. L'addition de certains composés peut élever cette température de transition vitreuse et stabiliser les cellules lors du stockage.

L'oxydation représente un facteur particulièrement létal pour les cellules lors de la conservation (Figure 16).



**Figure 16:** Impact de l'humidité relative (a) et de l'ambiance gazeuse (b) sur la survie au cours du temps de la souche *L. bulgaricus* (Castro et al. 1995)

Les membranes lipidiques s'oxydent, ce qui modifie le nombre de lipides insaturés et peut aller jusqu'à la perméabilisation membranaire (Charalampopoulos and Rastall 2009). Il a ainsi été démontré que, s'ils étaient isolés de la présence d'oxygène, des liposomes ou des cellules pouvaient être conservées sur de longues périodes à l'état sec (Potts 1994). Ces phénomènes d'oxydation peuvent avoir des conséquences sur la fonctionnalité des cellules. Ainsi la peroxydation lipidique réduit l'hydrophobicité de surface ou l'activité enzymatique (Castro et al. 1996; Santivarangkna et al. 2008). Le taux de survie après séchage n'est pas directement corrélé à la survie au cours du stockage, mais la nature et le stress induits par le procédé peuvent influencer sur la survie dans le temps (Figure 17). Miyamoto-Shinohara et al., montrent que la survie à l'état sec de *S. cerevisiae*, *E. coli* et *L. acidophilus* n'est pas similaires pour les trois souches. En fonction de l'humidité de stockage, les cellules peuvent également subir des réactions de brunissement et former des produits de la réaction de Maillard. Le plus souvent, les échantillons secs sont donc conditionnés sous vide ou sous atmosphère gazeuse inerte (azote) dans un flacon scellé hermétiquement.



**Figure 17:** Taux de survie de *S. cerevisiae*, *E. coli* et *L. acidophilus* au cours du stockage. Les micro-organismes ont été lyophilisés en présence de 10% de poudre de lait écrémé et 1% de sodium glutamate et stockés sous vide. (●) représente le taux de survie avant lyophilisation (100%), (●) le taux de survie après lyophilisation et (●) le taux de survie au cours du temps (Miyamoto-Shinohara et al. 2006)

### 3.2.5. Maîtrise des conditions de réhydratation

Si les conditions de réhydratation sont souvent négligées, elles représentent pourtant une étape essentielle pour la revivification des cellules. En effet, avant la production industrielle, les tests développés en laboratoire permettant de sélectionner des souches sur leur capacité fonctionnelle sont presque toujours menés sur un nombre de cellules fraîches données. Or, les micro-organismes probiotiques doivent être consommés vivants. Il est donc primordial d'avoir une majorité de cellules vivantes dans le produit et une quantité de cellules comparable à la concentration testée lors des tests de criblage. Différentes études ont montré que la cinétique, la nature du tampon de réhydratation, le pH ou la température, jouaient fortement (Mille et al. 2004). Tout d'abord, la vitesse de réhydratation est un paramètre primordial. Ainsi, le taux de survie de la levure déshydratée en milieu liquide jusqu'à 166 MPa ( $a_w = 0,30$ ) passe de 43% lorsque la réhydratation est effectuée rapidement (choc < 1seconde) à 79% lorsque la réhydratation est effectuée lentement (rampe de 30 minutes) (Dupont et al. 2010). Cette étude souligne également que les phénomènes de perméabilisation membranaire au cours de perturbations hydriques se produisent principalement lors de l'étape de réhydratation (Dupont et al. 2010). Zhao et Zhang montrent que la nature du milieu peut avoir une forte influence sur la survie bactérienne et que cet effet est souche dépendant (Zhao and Zhang 2005). Ainsi, le taux de survie de la souche *L. brevis* après lyophilisation est maximal lorsque les cellules ont été réhydratées dans une solution de saccharose à 10%, tandis que la souche *Oenococcus oeni* est mieux préservée en présence de milieu de culture.



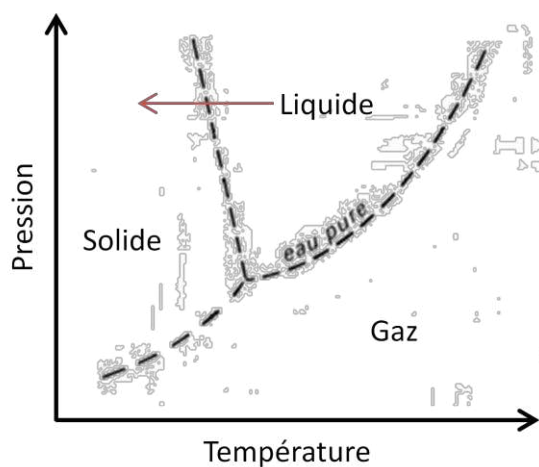
La réhydratation à basses températures ( $T \text{ } ^\circ\text{C} < 20 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) diminue également la survie après séchage (Wang et al. 2004b).

### 3.3. Techniques industrielles de stabilisation

Si la présence d'eau est une matrice de vie, elle peut également représenter une limite à la stabilisation à long terme de cellules. Par exemple, le taux de survie des microorganismes diminue rapidement lorsqu'ils sont stockés en milieu hydraté (Lothigius et al. 2010). La conservation de cellules en milieu aqueux n'est possible que sur de courtes périodes à cause des dégradations qui ont pour origine la mobilité des molécules. Cette mobilité doit donc être stoppée pour empêcher la dégradation des micro-organismes au cours du temps (Bronshtein 2004). Cet objectif va pouvoir être réalisé industriellement en figeant la matrice (congélation ultra-rapide) ou en déshydratant les cellules, soit par congélation lente, soit par séchage.

#### 3.3.1. La congélation

L'eau liquide se solidifie en glace lorsque la vitesse des molécules d'eau n'est plus assez élevée pour rompre les liaisons hydrogène (Figure 18). Les molécules d'eau forment alors un réseau tétraédrique parfaitement coordonné (Ball 2008). Ces liaisons maintiennent les molécules éloignées les unes des autres, diminuant ainsi la masse volumique de l'eau. L'effet létal de la congélation est souvent associé à une contrainte physique, le flux d'eau à travers la membrane (Muldrew and McGann 1994). La vitesse de variation de la pression osmotique, en conditionnant la vitesse du transfert d'eau entre la cellule et le milieu détermine la survie cellulaire.



**Figure 18:** Diagramme d'état de l'eau. La flèche rouge représente l'étape de congélation

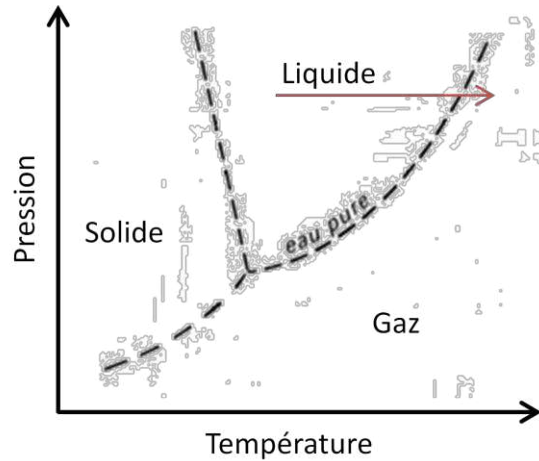
Une vitesse de congélation trop lente entraîne la formation de glace à l'extérieur de la cellule, une concentration en soluté extracellulaire et donc un transfert d'eau trop important du milieu intracellulaire vers l'extérieur. Une vitesse trop rapide va former des cristaux de glace à l'extérieur mais aussi à l'intérieur de la cellule (Dumont et al. 2004). Au-delà de l'étape de cristallisation, les dommages causés par la congélation peuvent être dus au passage de la transition de phase lipidique ou à l'augmentation de la concentration en électrolytes, puisque les cristaux de glace capturent les ions positifs et négatifs différemment (Bronshtein 2004). De nombreuses études se sont intéressées à la survie des bactéries à la congélation. Ainsi, Volkert et al., ont étudié l'impact de trois techniques de congélation sur la viabilité et la physiologie de la souche *L. rhamnosus* GG et ont mis en évidence une préservation optimale en présence de 20% de poudre de lait écrémé (m/v) (Volkert et al. 2008). D'autres auteurs ont montré que des vitesses de congélation lentes ou une pré-incubation à faible température permettaient une meilleure préservation de la souche *L. acidophilus* ATCC 4356 (Bâati et al. 2000). Les souches microbiennes possédant des acides gras cyclopropanes résistent mieux à des cycles de congélation/décongélation (Grogan and Cronan Jr 1986). Au niveau physiologique, la congélation induit des modifications des propriétés de surface (potentiel zéta) même en présence de protectants (glycérol) (Fernández Murga et al. 2000).

### 3.3.2. L'atomisation

L'atomisation est une technique de production en continu au cours de laquelle la suspension bactérienne est nébulisée puis déshydratée par passage dans un flux d'air chaud établi à co-courant ou contre-courant (Figure 19). Les microparticules se forment dans la chambre de dessiccation par vaporisation rapide et entraînement du solvant. Elles sont collectées à la base de cette chambre après séparation du flux d'air par passage dans un cyclone.

Le séchage par atomisation est de plus en plus utilisé pour la stabilisation de micro-organismes probiotiques (Corcoran et al. 2004; Desmond et al. 2002). Cependant, la température élevée peut causer des dommages membranaires (Gardiner et al. 2000; Teixeira et al. 1995), altérer la paroi ou encore l'ADN des cellules (Teixeira et al. 1997). Des auteurs ont montré que plus la température de sortie était basse, plus la viabilité était importante (Ananta et al. 2005). Néanmoins, une température de sortie trop basse entraîne une humidité résiduelle trop importante dans l'échantillon. Or, l'activité de l'eau optimale des formules sèches à base de probiotiques se situe entre 0,1 et 0,25. En deçà de cette gamme d'activité de

l'eau, la vitesse d'oxydation des lipides devient importante, la solubilité diminue et les réactions physiques augmentent. Au-delà, les réactions chimiques (enzymatiques) augmentent (Viernstein et al. 2005).



**Figure 19:** Diagramme d'état de l'eau. La flèche rouge représente le procédé d'atomisation

La fonctionnalité bactérienne peut également être modifiée par le procédé. Ainsi, on peut noter un décalage dans la reprise d'activité et la production d'acide lactique de micro-organismes atomisés (To and Etzel 1997). Le temps de reprise d'activité de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* passe de 4h à 9h quand la température de sortie augmente de 65 °C à 90 °C. Une étude récente montre une modification des propriétés fonctionnelles des souches *L. plantarum* CFR 2191, *Lactobacillus salivarius* CFR 2158 et *P. acidilactici* CFR 2193 après atomisation en présence de 10% de poudre de lait écrémé (Reddy et al. 2009). A contrario, ces souches montrent une viabilité et une fonctionnalité (résistance aux stress du tractus et assimilation du cholestérol) préservée après atomisation en présence de 10% de maltodextrines. Enfin, une dernière étude fait état d'une modification des capacités d'adhésion de la souche *L. kefir* 8348 après atomisation en présence de lait écrémé en poudre (11% m/v) (Golowczyk et al. 2011b). Il est cependant à noter que le traitement n'affecte pas les propriétés fonctionnelles des deux autres souches testées.

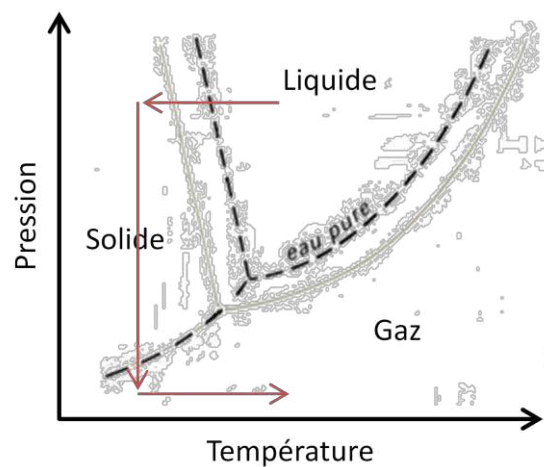
### 3.3.3. La lyophilisation

La lyophilisation est une méthode de déshydratation à basse température et à basse pression au cours de laquelle l'eau est éliminée par sublimation puis désorption. Ainsi, la lyophilisation se décompose en trois étapes successives (Figure 20) :

- La congélation, qui transforme l'eau libre en cristaux de glace
- La désorption primaire ou sublimation de la glace (cristaux formés par congélation)

- La désorption secondaire, qui va permettre l'élimination de la quantité d'eau résiduelle, non congelée

Les conséquences cellulaires du procédé de lyophilisation sont assez proches de celles générées par la congélation. Ainsi, il est généralement admis que 70% à 80% des cellules encore viables après congélation survivent à la sublimation (To and Etzel 1997). La vitesse optimale de déshydratation dépend de chaque type de cellule et est modérée par la taille et la forme des micro-organismes, la présence d'une paroi, ou encore la composition de la membrane en acide gras.



**Figure 20:** Diagramme d'état de l'eau. Les flèches rouges correspondent aux trois étapes du procédé de lyophilisation. Cette figure représente le diagramme d'état de l'eau pure (---) et les modifications engendrées par l'ajout d'un soluté dans la solution aqueuse (—).

L'utilisation de protectants permet d'augmenter fortement la survie au séchage (Leslie et al. 1995). La capacité de protection des sucres a été attribuée à leur capacité à diminuer la température de transition de phase des lipides et à maintenir la structure de la membrane et des protéines à l'état sec. De plus, en présence de solutés (sucres, sels...), les courbes délimitant chacune des phases du diagramme d'état de l'eau sont décalées. En effet, l'entropie du solvant (interactions intermoléculaires et/ou ioniques) augmente et entraîne l'abaissement de la température de congélation définie par la loi de Raoult (Marin and René 2000).

Siaterlis et al., ont étudié l'impact des conditions de culture sur la survie à la lyophilisation des souches *L. plantarum* et *L. rhamnosus* GG et ont souligné l'importance du glucose et de l'extrait de levure (Siaterlis et al. 2009). D'autres auteurs ont montré une résistance à la lyophilisation des souches *Lc. cremoris*, *L. pseudoplantarum* et *St. thermophilus* de 63%, 71% et 100%, respectivement (To and Etzel 1997). Brennan et al., ont mis en évidence une modification de l'intégrité structurale des cellules après séchage, à l'origine d'une perte de fonctionnalité (Brennan et al. 1986). Il a également été montré que des cellules possédant des

acides gras cyclopropanes résistaient mieux à la lyophilisation que les mêmes souches mutées (Muñoz-Rojas et al. 2006). Enfin, si le coût de production de micro-organismes sec est plus élevé par lyophilisation, c'est également le procédé qui préserve le mieux les cellules (Conrad et al. 2000; Strasser et al. 2009).

### 3.3.4. Techniques de séchage alternatives

D'autres techniques sont également utilisées pour la déshydratation de micro-organismes comme le séchage en lit fluidisé, le séchage sous vide, le séchage convectif ou encore la déshydratation par formation de mousses :

- *Séchage en lit fluidisé* : La fluidisation augmente fortement la surface d'échange entre le fluide chaud et le solide à sécher. Cette technique de déshydratation est assez peu adaptée aux bactéries du fait de sa faible efficacité mais est très utilisée pour la production de levures (Bayrock and Ingledew 1997). L'inconvénient est que seul le matériel granulaire peut être séché. Concernant les bactéries, la souche *L. plantarum* P743 présente un taux de survie de 32% après séchage en présence d'amidon (Linders et al. 1997). Une autre souche de *L. plantarum* testée plus récemment dans des conditions similaires possède un taux de survie de 40% (Strasser et al. 2009). D'autre part, ce procédé est particulièrement bien adapté à l'encapsulation (Manojlović et al. 2010).

Récemment, une optimisation du procédé de séchage par lit fluidisé permettant une préservation optimale des cellules a été proposée (Mille et al. 2004). Cette technique de déshydratation, développée à l'UMR PAM (AgroSup Dijon, uB), consiste à mélanger un culot bactérien à un support pulvérulent déshydraté ( $a_w = 0,05$ ) puis à sécher le mélange sous un flux d'air sec. Cette technique permet de préserver fortement la viabilité des bactéries et des levures. Ainsi, la souche *L. plantarum* est totalement protégée (100% de survie) après séchage et réhydratation. D'autres auteurs proposent de combiner atomisation et lit fluidisé. Cela permet de réduire la température de sortie de l'atomiseur donc d'augmenter la viabilité. Des essais ont déjà été menés sur des *Lactobacilles* (Gardiner et al. 2002) et des *Bifidobactéries* (Saarela 2007; Simpson et al. 2005).

- *Séchage sous vide* : D'autres techniques de séchage que la lyophilisation utilisent le vide pour passer d'une phase liquide à une phase solide. Ce procédé nécessite des temps de séchage relativement importants mais limite fortement les réactions d'oxydation. Le séchage sous vide de la levure *S. saccharomyces* a donné des taux de survie supérieurs à la

lyophilisation (90% vs 1%) en présence de 20% de tréhalose (Cerrutti et al. 2000). La présence de tréhalose et de saccharose renforce la viabilité de la souche *L. bulgaricus* CIDCA333 (Tymczyszyn et al. 2007b). Le séchage de la souche *L. paracasei* a donné des taux de survie inférieurs à 6% sans adjuvants et compris entre 20 et 50% lors de l'ajout de 25% (m/m) de sorbitol (Foerst et al. 2010). Concernant la fonctionnalité, des mesures d'IRTF avant séchage et après réhydratation sur la souche *Lactobacillus helveticus* WS1032 ont montré une évolution des bandes caractéristiques des lipides membranaires, de l'ADN et du peptidoglycane (Santivarangkna et al. 2007b). Une température trop faible lors du séchage sous vide (< 45°C) entraîne des dommages membranaires plus importants dus à un séchage trop lent (Tymczyszyn et al. 2008).

- *Séchage convectif à température ambiante* : Ce procédé, qui se rapproche des conditions de déshydratation que subissent les cellules dans l'environnement, consiste à faire passer un flux d'air sec au dessus d'une suspension. Contrairement à l'atomisation, cette technique ne nécessite pas d'augmentation de température importante. Lors de la déshydratation sous air, de nombreux paramètres opératoires sont à prendre en compte comme la température, le degré d'humidité, la vitesse de l'air et les caractéristiques de la solution. La souche *L. plantarum* P743 présente un taux de survie de 63% après séchage (Linders et al. 1997). La déshydratation de Kefir permet également la préservation de près de 90% de la viabilité des souches du produit (Dimitrellou et al. 2009). Enfin, en présence de 5% de saccharose, les souches *L. plantarum* 299v et *L. rhamnosus* R0011 présentent des taux de survie respectifs de 57% et 70% (Champagne et al. 2012).

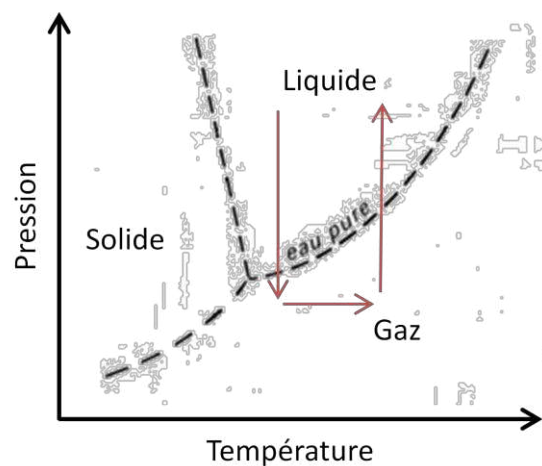
D'autres paramètres, communs entre ces différentes techniques mais moins létaux pour les cellules peuvent également être pris en compte. Ainsi, lors du séchage d'un liquide, la vaporisation de l'eau s'accompagne d'un refroidissement local. De plus, certains auteurs ont montré que le pH de l'eau n'était pas homogène dans une solution et qu'il existait un gradient entre les molécules d'eau dites « de surface » et celles « de la masse ». Pour une solution à pH=7, le pH estimé de la surface est de 4,8. Il semble que cet effet soit dû à la présence de protons  $H_3O^+$  qui, contrairement aux ions  $OH^-$ , affichent une préférence pour les sites de surface (Buch et al. 2007). A l'heure actuelle, aucune étude n'a mis en évidence les conséquences de ce gradient de pH sur les micro-organismes et son évolution lors du séchage d'une suspension liquide. Enfin, la tension de surface air/eau est également un paramètre à prendre en compte dans le cadre d'un séchage. De nombreux travaux ont mis en évidence le lien entre augmentation de la tension de surface et baisse de viabilité (Thompson et al. 1998;

Thompson and Yates 1999; Trouwborst et al. 1974). De plus, la tension de surface est fortement affectée par la présence de solutés. Ainsi, l'ajout de sels dans la solution entraîne une augmentation de la force ionique et de la tension de surface (Petersen and Saykally 2008).

- *Séchage par formation de mousses* : Ce procédé, repris par l'industrie pharmaceutique pour la stabilisation de vaccin, a fait l'objet d'un brevet sur les micro-organismes (Bronshtein 1998). Il se décompose en trois étapes successives (Figure 21) (Abdul-Fattah et al. 2007) :

- La formation d'une mousse mécaniquement stable par ébullition sous vide. L'ébullition démarre lorsque la pression de vapeur à la surface du liquide dépasse la pression ambiante
- L'étape de déshydratation avec une augmentation progressive de la température
- L'augmentation de la pression ( $P_{atm}$ )

La formation de la mousse est très fortement influencée par la nature des additifs utilisés (sucres, acides aminés...) (Pisal et al. 2006). Les principaux avantages de cette technique par rapport à la lyophilisation consistent en l'absence de l'étape de congélation, ce qui engendre moins de dommages pour les cellules, et la rapidité du procédé (Bronshtein 2004).



**Figure 21:** Diagramme d'état de l'eau. Les flèches rouges représentent les étapes de séchage par formation de mousses

A l'heure actuelle, assez peu d'études se sont intéressées aux conséquences de cette technique sur la viabilité et la fonctionnalité des bactéries probiotiques.

### 3.4. Voies d'optimisation de la résistance microbienne au séchage

Plusieurs stratégies sont aujourd'hui possibles pour optimiser la préservation de micro-organismes probiotiques. Ainsi, il est possible de renforcer la résistance des souches bactériennes en agissant sur les conditions de culture (composition du milieu, température...), sur la matrice de séchage (addition de composés protectants) ou sur la bactérie (réalisation de pré-stress, encapsulation).

#### 3.4.1. Modification des conditions de culture

Les cellules en phase stationnaire de croissance sont structurellement, physiologiquement et fonctionnellement différentes de celles en phase exponentielle et résistent mieux au procédé de déshydratation (Corcoran et al. 2004; Meng et al. 2008).

La nature du milieu joue également sur la survie de la bactérie au séchage. Carvalho et al., ont testé l'effet de trois milieux de culture différents (M17, MRS et milieu de Lee) sur la survie à la lyophilisation et au cours du stockage de six souches d'*Ent. faecalis* et deux souches d'*Enterococcus durans* (Carvalho et al. 2003). Ils montrent un impact fort de la nature du milieu sur la survie à l'état sec. D'autres auteurs montrent un effet de la composition du milieu et notamment de la concentration de glucose, sur la survie à la lyophilisation de *L. plantarum* et *L. rhamnosus* GG (Siaterlis et al. 2009). Le pH et la température de fermentation peuvent également modifier la capacité à survivre aux stress du procédé de fabrication (Wang et al. 2005).

#### 3.4.2. Réalisation de pré-stress

Certaines études font état d'une amélioration de la survie des souches au séchage lors de la réalisation de pré-stress. Ainsi, une baisse de pH du milieu de culture de 6 à 5 permet d'augmenter le taux de survie après lyophilisation de 65% à 90% (Palmfeldt and Hahn-Hägerdal 2000). Cependant on observe qu'à pH = 5 le développement des colonies est moins important. En outre, elles sont plus petites (Palmfeldt and Hahn-Hägerdal 2000). Certaines études indiquent qu'une baisse de pH induit des changements protecteurs, notamment au niveau de la composition en acide gras de la membrane plasmique. On assiste également à une production de protéines de stress (Maus and Ingham 2003). Wang et al., montrent qu'un stress acide permet aux cellules de mieux résister à la congélation (Wang et al. 2005). Enfin, des travaux menés au sein de l'UMR PAM montrent qu'un choc osmotique modéré jusqu'à

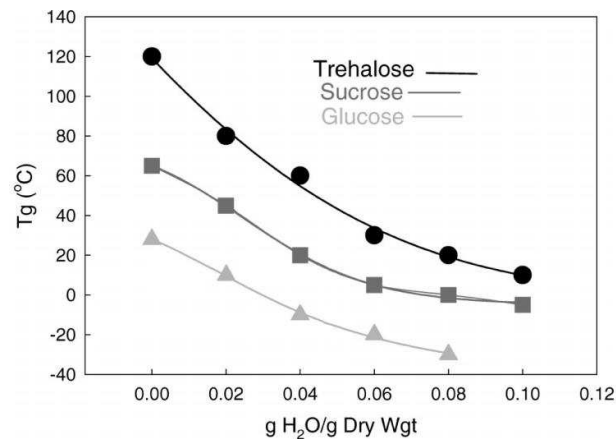


une  $a_w$  de 0,96 avant un séchage en lit fluidisé permet une survie de 100% de la souche *L. plantarum* après séchage. D'autres études ont mis en évidence une thermo-tolérance accrue de souches bactériennes exposées à un pré-stress thermique, un effet bénéfique dans le cas d'une atomisation. Desmond et al., ont montré sur la souche *L. paracasei* NFBC338 une amélioration de la survie à la température (30 min., 60 °C) et à l'atomisation après un pré-stress thermique (15 min., 52 °C) (Desmond et al. 2001). De même, un stress osmotique avec du NaCl (0,3M, 30 min.) améliore également la survie au procédé d'atomisation (33% de survie *vs* 8% pour les cellules non stressées). Ces auteurs ont démontré que de tels pré-stress entraînait la synthèse des protéines chaperonnes GroEL et GroES (Desmond et al. 2004).

### 3.4.3. Addition de composés protectants

Tout d'abord, il est possible d'observer une grande variabilité dans les taux de survie au séchage en fonction des souches microbiennes. Bozoglu et al., en 1987 ont montré que des streptocoques, des petites cellules sphériques, résistaient mieux à la lyophilisation que les lactobacilles, en longs bâtonnets (Bozoglu et al. 1987). Cette hypothèse a été contredite depuis par Palmfeldt et Hägerdal, 2000, qui ont montré que des cellules de *L. reuteri* de même forme pouvaient avoir une viabilité différente après séchage (Palmfeldt and Hahn-Hägerdal 2000; Santivarangkna et al. 2007a). Dans le cas des coques ou de cellules formant des agrégats, il faut tenir compte de la viabilité mais également de la longueur des chaînes ou la taille des agrégats avant et après traitement (Santivarangkna et al. 2007a). Différentes souches diffèrent dans leur capacité à accumuler la glycine bêtaïne en tant que soluté compatible, ce qui est dû à des différences génotypiques. Cette possibilité d'accumulation affecte leur capacité à tolérer la phase de séchage. L'étude de micro-organismes naturellement résistants aux perturbations hydriques comme la levure ou les cyanobactéries confirme ces observations. Ces organismes sont également capables de synthétiser du glycérol et des disaccharides (tréhalose et saccharose). Le glycérol va permettre de limiter la perte d'eau et, par voie de conséquence, la contraction volumique. Les sucres vont pouvoir stabiliser la membrane plasmique et les macromolécules en formant des liaisons hydrogènes. En fait, ces composés remplacent les molécules d'eau autour des macromolécules et limitent ainsi les effets négatifs du séchage (water replacement hypothesis). De plus, ils vont permettre de vitrifier la matrice en diminuant la température de transition vitreuse. Le verre est un état métastable amorphe caractérisé par ralentissement du mouvement à l'état moléculaire. La  $T_g$

de l'eau pure est de  $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$  mais peut être modifiée lors de l'ajout d'adjuvants comme les sucres (Figure 22).



**Figure 22:** Evolution de la  $T_g$  du tréhalose, saccharose et glucose en fonction de l'hydratation (Crowe et al. 2005)

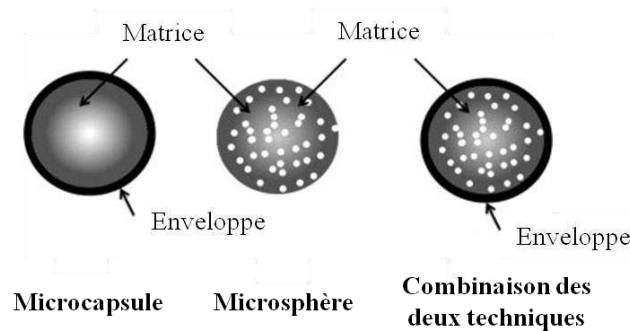
La figure ci-dessus montre que la  $T_g$  est plus élevée pour le tréhalose que pour d'autres sucres comme le saccharose ou le glucose. De plus, le tréhalose peut également avoir un effet positif contre l'oxydation. Ainsi, l'ajout de tréhalose permet une diminution de la peroxydation lipidique et une meilleure survie de la souche *S. cerevisiae* à un stress oxydant (Herdeiro et al. 2006). Prestrelski a montré un fort impact du type de protectant sur le maintien de la structure et de la fonctionnalité enzymatique après lyophilisation (Prestrelski et al. 1993).

L'utilisation de composés au cours du séchage peut également protéger la souche au cours des perturbations ultérieures. Ainsi, Corcoran et al., ont montré un effet positif des sucres sur la survie à l'acidité gastrique de la souche *L. rhamnosus* GG (Corcoran et al. 2005). D'autres ont confirmé un effet positif de la présence de saccharose sur la survie de six souches probiotiques lors du passage de l'estomac (Chen et al. 2012). Le rôle protecteur d'oligosaccharides sur la survie de la souche *L. reuteri* TMW1.106 à la lyophilisation a été corrélée à des interactions directes avec la membrane, notamment une modification de la fluidité (Schwab et al. 2007). Enfin certains ont tenté d'ajouter des prébiotiques (inuline...) avant séchage par atomisation mais l'effet était inférieur à la poudre de lait (Corcoran et al. 2004).

#### 3.4.4. Encapsulation

La micro-encapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active. Ils peuvent se présenter sous forme de microcapsules ou de microsphères

et forment une barrière physique contre les stress de l'environnement (Richard and Benoît 2000).



**Figure 23:** Représentation schématique de deux types de particules, les microcapsules et les microsphères (Burgain et al. 2011)

Cette technologie permet de protéger les cellules fragiles des perturbations de l'environnement (stress oxydant, tractus digestif...) ou de les libérer au niveau de sites spécifiques. L'encapsulation donne une structure à la matrice et permet d'envisager de nouvelles applications aux probiotiques.

Les techniques utilisées pour encapsuler des micro-organismes regroupent l'atomisation, l'encapsulation dans des liposomes, la fluidisation, l'extrusion ou encore la gélification de gouttes. Le procédé de séchage par atomisation est un procédé continu, économique permettant de former des microsphères. L'encapsulation avec des lipides à bas points de fusion est également possible avec cette technique. Le lit fluidisé permet de réaliser un enrobage continu de particules et la formation de microcapsules après séchage. Enfin, dans le cas de la gélification de gouttes, une solution d'alginate est libérée en goutte à goutte dans une solution de chlorure de calcium et se transforme en particules sphériques de gel.

Pour toutes ces techniques, des polymères tels que l'alginate, les carraghénanes, ou la gomme gellane sont le plus souvent utilisés en tant que matériaux enrobant. L'alginate est un dérivé de polysaccharide obtenu à partir d'algues, qui est composé d'acides  $\beta$ -D-mannuronique et  $\alpha$ -L-guluronique (Burgain et al. 2011). Les billes d'alginate sont souvent poreuses et sensibles à l'acidité stomacale. L'encapsulation de la souche *L. acidophilus* CSCC 2400 dans des billes d'alginate de calcium permet de protéger les cellules lors du passage de l'estomac ( $-2,5 \log$  vs  $-5 \log$  pour les cellules non encapsulées), et de l'effet de la bile ( $-0,5 \log$  vs  $-1 \log$  pour les cellules non encapsulées) (Chandramouli et al. 2004). Le  $\kappa$ -carraghénane est un polymère naturel qui nécessite une température comprise entre  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  et  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  et forme des gels assez fragiles. Adhikari et al., ne montrent pas de différences de survie dans le yaourt entre la souche *B. longum* encapsulée avec des  $\kappa$ -carraghénanes et non-encapsulée (Adhikari et al. 2000). D'autres matrices comme la pectine, l'amidon, la gélatine, les protéines de lactosérum

ou les gommés (arabique, xanthane...) peuvent également être utilisées. Ainsi, la souche *L. rhamnosus* GG encapsulée dans des protéines de lactosérum (Doherty et al. 2011) ou la souche *B. adolescentis* dans une matrice mixte protéine de pois-alginate (Klemmer et al. 2011) sont protégées lors de stress représentatifs des perturbations du tractus. Dans cette dernière étude des capsules contenant 2% de protéines de pois (m/m), 0,5% d'alginate (m/m) et 1-3% de fructooligosaccharides protègent la bactérie de l'acidité gastrique (pH=2, 37 °C, 2h) avec une perte de survie de 1 log au bout de 2 heures contre 6 log en 30 minutes pour les bactéries non encapsulées. La micro-encapsulation peut aussi servir à co-encapsuler des prébiotiques et ainsi permettre de délivrer de multiples agents biactifs (Champagne and Fustier 2007). La difficulté principale pour toutes ces techniques d'encapsulation concerne la production à l'échelle industrielle. Par exemple, les techniques d'extrusion (billes d'alginates) sont très faciles à utiliser en laboratoire mais ont des rendements de production faibles et forment des particules de grosse taille (Burgain et al. 2011).

*Ce troisième chapitre de l'analyse bibliographique se focalise sur les techniques de stabilisation des cellules. L'eau est une matrice essentielle à la vie, à l'origine de la structure des cellules et des réactions biochimiques. Ainsi, membranes, protéines et acides nucléiques interagissent fortement avec les molécules d'eau. La stabilisation des cellules sur de longues périodes peut être réalisée soit en figeant la matrice, soit en retirant l'eau (séchage notamment). Le retrait de cette eau est effectué par différentes techniques industrielles (atomisation, lyophilisation, lit fluidisé) ou semi-industrielles (séchage sous vide, séchage sous air, déshydratation par formation de mousses). Cependant, toutes ces méthodes altèrent potentiellement la viabilité et/ou la fonctionnalité des cellules microbiennes. Les facteurs létaux pour les cellules incluent (Fu and Chen 2011):*

- *Une perturbation mécanique/osmotique (sortie d'eau puis entrée d'eau)*
- *Une perturbation thermique (chaud ou froid)*
- *Une perturbation oxydante (présence d'oxygène)*
- *Une perturbation chimique (augmentation du  $pH_{intracellulaire}$  et de la concentration en sels)*

*Les conditions de stockage et de réhydratation sont aussi à l'origine de pertes de viabilité importantes. Pour lutter contre ces effets, plusieurs stratégies peuvent être mises en œuvre comme la modification des conditions de cultures, la réalisation de pré-stress, l'addition de protectants ou encore l'encapsulation.*

#### 4. Conclusion de l'étude bibliographique et axes de recherche de la thèse

Le tractus digestif de l'être humain est un tube segmenté caractérisé par les nombreux échanges existant entre l'hôte et son microbiote. Différentes études se sont intéressées à la composition du microbiote de personnes saines ou malades, et montrent des différences de composition. Ainsi, la consommation de micro-organismes ayant un effet bénéfique sur la santé peut permettre d'améliorer la valeur nutritionnelle des aliments, lutter contre les infections gastro-intestinales ou encore stimuler l'activité du système immunitaire. Dans le tractus, les plaques de Peyer, les cellules épithéliales ou les cellules dendritiques sont capables d'échantillonner le contenu luminal et de déclencher cette réponse immunitaire. Cependant, parmi la quantité colossale de micro-organismes qui nous entoure, quelques souches seulement sont capables d'interagir avec les cellules du système immunitaire. Au niveau réglementaire, pour lutter contre l'apparition de produits aux effets santé non démontrés, l'EFSA a durci les conditions d'acceptation d'une allégation. L'instance européenne demande aujourd'hui des preuves scientifiques d'un effet, notamment la réalisation d'études cliniques randomisées en double aveugle chez l'homme.

Pour être considérées comme probiotiques, les bactéries doivent être vivantes et fonctionnelles au niveau des sites actifs du tractus digestif, ce qui signifie qu'elles ont survécu à la production en fermenteur industriel, au séchage, à la mise en gélule/comprimé, au pH de l'estomac et aux sels biliaires. L'étude bibliographique souligne l'importance des étapes de sélection et de stabilisation des micro-organismes probiotiques avant le démarrage d'études cliniques. Les travaux disponibles proposent de sélectionner les micro-organismes sur leurs propriétés fonctionnelles, leur résistance au procédé ou leur tolérance au stress du tractus mais ne mesurent jamais la résistance des bactéries aux trois tests. L'étude de la survie au séchage de micro-organismes fait l'objet de nombreuses publications scientifiques. La plupart du temps les micro-organismes sont atomisés ou lyophilisés. Cependant, l'étude fondamentale des phénomènes liés au séchage est souvent effectuée en séchant les bactéries sous flux d'air ou sous vide. C'est ce que nous avons également choisi de faire en séchant les micro-organismes sur couche mince. Cette technique est détaillée dans la partie « Matériel et Méthodes ». De plus, peu d'études prennent en compte l'impact du traitement sur la fonctionnalité probiotique des souches.

L'objectif de ce travail de thèse concerne la sélection et l'intégration dans une matrice sèche d'une souche probiotique immuno-stimulante, capable d'être encore fonctionnelle au niveau

des sites actifs du tractus (plaques de Peyer dans l'iléon), soit après le procédé d'industrialisation et le passage dans le tube digestif. La seconde partie de ce document présente le matériel et les méthodes utilisées dans cette étude. La partie « Résultats et Discussions » est divisée en quatre chapitres distincts, les trois premiers concernant plus particulièrement l'aspect recherche du projet tandis que le chapitre 4 détaille la partie industrielle :

- Dans un premier chapitre, l'impact du procédé sur le taux de survie et la fonctionnalité cellulaire ont été étudiés. Dans cette étude, les conséquences de l'atomisation, de la lyophilisation et d'un séchage sur couche mince sur le taux de survie et l'effet immuno-modulateur ont été mesurées. De plus, les mécanismes cellulaires induits par le séchage, à savoir une perturbation mécanique et une perturbation oxydative ont été caractérisés.

- La compréhension de ces phénomènes a permis de développer des outils de criblage du procédé de séchage dans un second chapitre. Les souches bactériennes du projet ont été testées puis analysées par cytométrie en flux, à l'aide de marqueurs fluorescents de la viabilité et de la vitalité des souches. Ainsi, la viabilité et la fonctionnalité des souches ont été mesurées après un cycle de lyophilisation, après un séchage sur couche mince, après un stress osmotique et après un stress oxydant.

- Le troisième chapitre concerne le développement de méthodes innovantes de préservation des bactéries probiotiques. A la vue des résultats obtenus précédemment, plusieurs stratégies visant à ralentir les transferts d'eau et à limiter la contraction des cellules comme l'encapsulation ou le séchage par formation de mousses ont été testées.

- Enfin, et c'est le but ultime de ce projet FUI, les résultats concernant l'optimisation de la production industrielle de la souche *L. plantarum* CNRZ 1997 sont présentés dans un dernier chapitre. En effet, le cahier des charges pour la production industrielle d'un lot clinique est exigeant et nécessite la modification et la validation de nombreux paramètres opératoires.

*DEUXIEME PARTIE : MATERIEL & METHODES*



## MATERIEL & METHODES

### 1. Souches de micro-organismes et conditions de culture

Plusieurs microorganismes ont été étudiés au cours de ces travaux. Tout d'abord, les souches de bactéries *L. bulgaricus*, *B. bifidum* et de levure *S. cerevisiae* sont des modèles d'études issus de la collection du l'UMR PAM. Les souches sélectionnées par l'INRA pour leur potentiel probiotique (effet antioxydant et/ou immunostimulant) sont venues s'ajouter à ces trois micro-organismes.

#### 1.1. Souches de bactéries

##### 1.1.1. Bactéries sélectionnées et souches de référence

Dix souches bactériennes appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* ont été incluses dans cette étude (Tableau 9).

**Tableau 9:** Souches de bactéries utilisées dans cette étude

Souche	Origine	Milieu de croissance	Température	Caractéristiques
<i>L. brevis</i>	Levain	MRS	37 °C	Souche antioxydante
<i>L. bulgaricus</i>	Yaourt	MRS	37 °C	Souche de référence UMR PAM
<i>L. casei</i>	Danone	MRS	37 °C	Souche immunostimulante (PBMC) Modèle industriel
<i>L. curvatus</i>	Choucroute	MRS	37 °C	Souche immunostimulante (PBMC)
<i>L. fermentum</i>	Intestin d'enfants	MRS	37 °C	Souche antioxydante Modèle industriel
<i>L. paracasei</i>	Pulpe de tomate	MRS	37 °C	Souche immunostimulante (PBMC)
<i>L. plantarum</i>	Lait de yack	MRS	37 °C	Souche immunostimulante (PBMC) Efficace sur modèle murin
<i>L. zeae</i>	Maïs	MRS	37 °C	Souche immunostimulante (PBMC) Souche antioxydante
<i>B. bifidum</i>	Fèces de bébé	MRS*	37 °C	Souche de référence UMR PAM
<i>B. longum</i>	Intestin humain	MRS*	37 °C	Souche immunostimulante (PBMC)

\* Milieu modifié (MRS + 0,05% cystéine)

Deux souches de référence présentant des aptitudes différentes au séchage ont été choisies : la souche *L. bulgaricus* et la souche *B. bifidum*. En dehors des ces deux microorganismes, huit souches ont été fournies par l'INRA de Jouy-en-Josas, deux modèles industriels (*L. casei* et *L. fermentum*) déjà présents dans des produits commercialisés, et six souches présentant un potentiel probiotique.

### 1.1.2. Conditions de culture

Les souches de bactéries sont conservées à -80 °C sous formes d'aliquotes contenant 1 mL d'une culture menée en phase stationnaire de croissance, supplémentée avec du glycérol (15%, v/v). Les *Lactobacillus* sontensemencées sur milieu MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), composé de 10 g/L de peptone, 10 g/L d'extraits de viande, 5 g/L d'extraits de levures, 20 g/L de glucose, 2 g/L de phosphate dipotassique, 5 g/L d'acétate de sodium, 2 g/L de citrate d'ammonium, 0,2 g/L de sulfate de magnésium, 0,05 g/L de sulfate de manganèse et 1,08 g/L de tween 80. Avant utilisation, le milieu est autoclavé pendant 20 minutes à 120°C. Les milieux de culture sont utilisés sous forme de bouillons ou de milieux gélosés par addition d'agar à 15 g/L. Les bactéries issues d'une aliquote sontensemencées sur boîtes de Pétri contenant du milieu MRS gélosé puis incubées à 37 °C sous atmosphère anaérobie (Anaerocult® A, Merck) pendant 48 heures. En milieu liquide, une pré-culture est d'abord réalisée. Puis, les bactéries sont mises en culture en injectant 1 mL de la pré-culture dans 9 mL de bouillon MRS stérile et incubées à 37 °C sans agitation. La croissance est menée dans les mêmes conditions que la pré-culture, jusqu'en début de phase stationnaire de croissance. Pour les bifidobactéries, le protocole est identique mais le milieu utilisé est du MRS supplémenté avec 0,05% de cystéine (Sigma Aldrich, France).

Avant d'être soumises à un stress, les cellules en phase stationnaire de croissance sont centrifugées deux fois à 4500 g pendant 5 minutes et re-suspendues dans du tampon phosphate (PBS).

## 1.2. Souches de levures

### 1.2.1. Origine des souches

Deux souches de levure ont été utilisées au cours de cette étude, la souche sauvage *S. cerevisiae* BY4742 et un mutant de la voie de biosynthèse de l'ergostérol *S. cerevisiae*  $\Delta$ erg6.

**Tableau 10:** Souches de levures utilisées dans cette étude

Souche	Origine	Milieu de croissance	Température	Génotype
BY4742	Euroscarf	MW*	25 °C	(Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1 ; leu2 $\Delta$ 0 ; lys2 $\Delta$ 0 ; ura3 $\Delta$ 0
$\Delta$ erg6	Euroscarf	MW*	25 °C	(Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1 ; leu2 $\Delta$ 0 ; lys2 $\Delta$ 0 ; ura3 $\Delta$ 0 ; YML008c::kanMX4

\* Milieu modifié

La souche mutante  $\Delta$ erg6 ne synthétise pas d'ergostérol mais accumule des précurseurs comme le zymostérol et le cholesta-5, 7, 24-triéanol (Dupont et al. 2011).

### 1.2.2. Conditions de culture

Les souches de levures sont conservées à -80 °C sous forme d'aliquotes contenant 1 mL d'une culture menée en phase stationnaire de croissance, supplémentée avec du glycérol (15%, v/v). Les levures sontensemencées sur du milieu MW modifié contenant 51,09 g/L de glycérol, 10 g/L de glucose, 3 g/L d'extrait de levures, 3 g/L de peptone pancréatique et 1,5g/L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Avant utilisation, le milieu est autoclavé pendant 20 minutes à 120°C. Les milieux de culture sont utilisés sous forme de bouillons ou de milieux gélosés par addition d'agar à 15 g/L. Les levures issues d'une aliquote sontensemencées sur boîtes de Pétri contenant du milieu MW modifié gélosé puis incubées à 25 °C pendant 48 heures. En milieu liquide, une pré-culture est réalisée par inoculation d'une colonie de levures dans 100 mL de milieu MW modifié. Les fioles de pré-culture sont agitées à 250 rpm pendant 48 h sur une table d'agitation thermostatée à 25 °C. La culture des levures est ensuite réalisée par inoculation de 100 mL de milieu MW modifié dans des fioles de 250 mL par 1 mL de pré-culture. La croissance est menée dans les mêmes conditions que la pré-culture, jusqu'en début de phase stationnaire de croissance (24 heures).

Avant d'être soumises à un stress, les cellules en phase stationnaire de croissance sont centrifugées deux fois à 4500 g pendant 5 minutes et re-suspendues dans de l'eau-glycérol à une  $a_w$  de 0,99.

## 2. Procédés de stabilisation

Les procédés de déshydratation utilisés au cours de cette étude sont décrits dans cette section. Quatre procédés de séchage sont détaillés, le séchage en couche mince, le séchage par

formation de mousses, la lyophilisation et l'atomisation. La déshydratation en milieu liquide a également été utilisée pour simuler les flux hydriques se déroulant lors du séchage.

## 2.1. Déshydratation en milieu liquide

### 2.1.1. Préparation de solutions à activité de l'eau contrôlée

La déshydratation en milieu liquide est réalisée par addition d'un soluté dépresseur d' $a_w$  à une suspension cellulaire. La masse de soluté à ajouter est calculée à l'aide de l'équation de Norrish (Norrish 1966) :

$$a_w = (1 - X_s) e^{-KX_s^2}$$

où  $K$  est le coefficient de Norrish et  $X_s$  la fraction molaire du soluté utilisé ( $K = 1,16$  pour le glycérol) (Chirife and Fontan 1980). Le lien entre la pression osmotique  $\pi$  (Pa) et l' $a_w$  est :

$$\pi = - \frac{RT \ln a_w}{\bar{V}_w}$$

où  $R$  est la constante des gaz parfaits ( $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$ ),  $T$  la température (K) et  $\bar{V}_w$  le volume molaire partiel de l'eau ( $m^3 \cdot mol^{-1}$ ). Le tableau suivant donne les masses de glycérol et de NaCl correspondant aux activités de l'eau testées. Le glycérol est un soluté perméant qui permet de tester des activités de l'eau très basse.

**Tableau 11:** Masses de glycérol/NaCl correspondant aux  $a_w$  testées au cours de l'étude

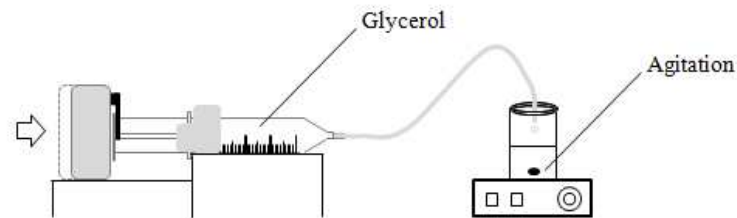
Soluté utilisé	Activité de l'eau	Masse de soluté (g) pour 1000 g d'eau
Glycérol	0,99	51
	0,80	1063
	0,45	3986
	0,30	6654
NaCl	0,99	9
	0,80	350

### 2.1.2. Protocole de déshydratation et de réhydratation

#### 2.1.2.1. Cinétiques lentes (rampes osmotiques)

Pour les déshydratations lentes, 3 mL d'une suspension cellulaire préalablement lavée sont déposés dans un bécher. Une solution de glycérol pur est alors ajoutée jusqu'à l' $a_w$

souhaitée, à un débit de  $0,493 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  à l'aide d'un pousse-seringue. Le bécher contient un barreau aimanté permettant une homogénéisation rapide de la solution. Après une heure de maintien à la pression osmotique souhaitée, les échantillons sont réhydratés progressivement par dilutions décimales dans des solutions d'activité de l'eau croissantes.



**Figure 24:** Schéma de l'installation utilisée pour déshydrater les cellules en rampe

### 2.1.2.2. Cinétiques rapides (chocs osmotiques)

Pour les déshydratations rapides, les cellules préalablement lavées sont centrifugées pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et remplacé par une solution de glycérol ou de NaCl à une  $a_w$  contrôlée (Tableau 11). Le culot est rapidement remis en suspension à l'aide d'un vortex. Après une heure de maintien à l' $a_w$  souhaitée, les échantillons sont centrifugés pendant 5 minutes. Le surnageant contenant le soluté dépresseur est éliminé et remplacé par le même volume de tampon (eau/glycérol pour les levures ou PBS pour les bactéries).

## 2.2. Séchage

### 2.2.1. Séchage sur couches minces

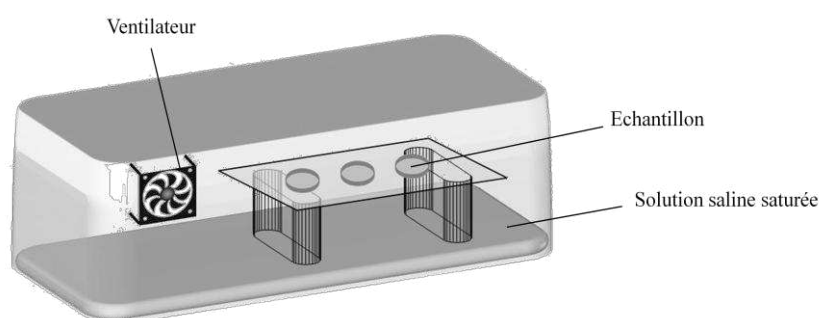
#### 2.2.1.1. Protocole de déshydratation et de réhydratation

Deux techniques ont été utilisées pour sécher les cellules en milieu aérien dans des enceintes contrôlées. Dans le cas des levures, les cellules préalablement lavées ont été filtrées sur Büchner pour obtenir une pâte de levure hydratée. Cette pâte a été étalée finement sur des lames de verre puis ces dernières ont été pesées afin de pouvoir exprimer la viabilité pour une masse d'échantillon donné. Les lames sont alors déposées dans des enceintes de séchage à humidité contrôlée. Après une heure de maintien dans l'enceinte de séchage, les cellules sont réhydratées, soit lentement en déposant la lame dans une enceinte à 100% HR, soit rapidement en plongeant la lame dans une solution contenant du tampon. Enfin, les cellules ont été diluées et déposées sur des boîtes de MW modifié.

Dans le cas des bactéries, les cellules préalablement lavées ont été resuspendues, soit dans du tampon (PBS), soit dans une solution de tréhalose (0,37 g/L), cystéine (0,10 g/L) et/ou glycérol (0,05 g/L). Puis, une goutte de 10  $\mu$ L a été posée au centre d'une coupelle en verre de 2 cm de diamètre. Les coupelles sont alors déposées dans des enceintes de séchage à humidité contrôlée (11%, 23%, 58% et 85%).

### 2.2.1.2. Utilisation d'enceintes de séchage contrôlées

Les enceintes de séchages sont des boîtes hermétiquement closes dont l'humidité relative est contrôlée.



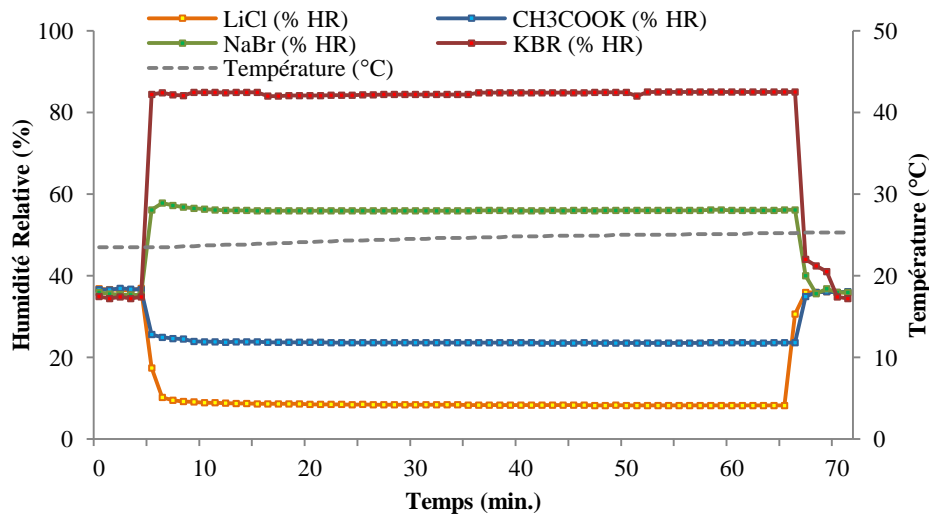
**Figure 25:** Schéma des enceintes de séchage utilisées. Les coupelles sont déposées sur un support plastique au dessus d'une solution saline saturée de LiCl, CH<sub>3</sub>COOK, NaBr ou KBr recouvrant le fond de la boîte. Un ventilateur (ACi 4400 - 2,5 m/s) est également présent dans l'enceinte.

Des solutions salines saturées ont été utilisées pour contrôler l'humidité des boîtes (Tableau 12). Les enceintes ont été maintenues à une température de 25 °C et ventilées (ventilateur ACi 4400, Ebm-papst, Obernai, France) pour augmenter la vitesse des transferts. Les expérimentations menées sous gaz ont été réalisées avec de l'azote ou un mélange azote-hydrogène (96,5%-4,5%). L'activité de l'eau de la solution est vérifiée par un osmomètre (Decagon Devices Inc., USA) tandis que la température et l'humidité relative de l'enceinte sont validées par un enregistreur de température et d'humidité (Voltcraft).

**Tableau 12:** Sels utilisés pour le contrôle de l'humidité relative des enceintes de séchage

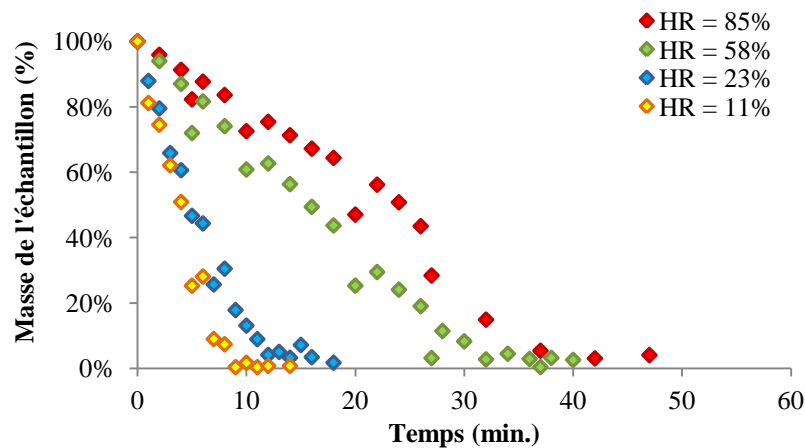
Sels utilisés	Humidité relative dans l'enceinte de séchage
/	100%
KBR	85%
NaBr	58%
CH <sub>3</sub> COOK	23%
LiCl	11%

La figure ci-dessous présente l'évolution de la mesure d'humidité relative dans l'enceinte au cours du temps. Les courbes obtenues montrent un temps d'équilibrage court des enceintes pour les quatre valeurs testées (11%, 23%, 58% et 85%).



**Figure 26:** Evolution de l'humidité relative dans les enceintes de séchage au cours du temps. Un enregistreur de température et d'humidité a été introduit pendant une heure dans une enceinte ventilée (2,5 m/s) et fermée hermétiquement contenant une solution saline saturée de LiCl, CH<sub>3</sub>COOK, NaBr ou KBR.

Le temps de séchage des échantillons a également été mesuré. La Figure 27 montre des temps de séchage des échantillons bactériens de 9, 11, 31 et 42 minutes respectivement dans les enceintes à 11%, 23%, 58% et 85% d'humidité relative.



**Figure 27:** Evolution de la masse des échantillons dans les enceintes de séchage en fonction du temps. Les échantillons étaient constitués d'une solution bactérienne diluée dans du PBS (*L. plantarum* - 10<sup>8</sup> UFC/mL) et les enceintes de séchage étaient ventilées (ACi 4400 - 2,5 m/s).

Après une heure de maintien dans l'enceinte de séchage, les cellules sont réhydratées rapidement en déposant 1 mL de tampon ou de milieu MRS sur l'échantillon sec. Enfin, les cellules ont été diluées et déposées sur des boîtes de MRS.

### 2.2.2. Déshydratation par formation de mousses

Les cellules préalablement lavées sont standardisées à une DO de 1 correspondant à  $10^8$  bactéries/mL. Les bactéries sont centrifugées, puis les culots sont re-suspendus dans une solution de PBS contenant du tréhalose (15% m/m, Sigma Aldrich) ou du saccharose (15% m/m, Sigma Aldrich). 3 mL sont introduits dans des vials de lyophilisation et refroidis dans la glace pendant 20 minutes avant d'être placés dans la chambre de l'évaporateur (Heto PowerDry PL6000, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Puis, le vide est appliqué dans l'enceinte. Le cycle de séchage dure 5 heures et la température du plateau évolue selon 5 paliers d'une heure à 0 °C, 10 °C, 20 °C, 30 °C et 40 °C. La pression est de 0,05 mbar. A la fin du cycle de séchage, les échantillons sont réhydratés à 25 °C dans du PBS.

## 2.3. Procédés industriels de séchage

### 2.3.1. Lyophilisation

Les cellules préalablement lavées sont standardisées à une DO de 1 correspondant à  $10^8$  bactéries/mL. Les bactéries sont centrifugées, puis les culots sont re-suspendus soit dans du PBS, soit dans une solution de PBS contenant du tréhalose (15% m/m, Sigma Aldrich) ou du saccharose (15% m/m, Sigma Aldrich). 3 mL d'échantillons sont introduits dans des vials de lyophilisation et congelés à -80 °C pendant 24 heures. Les tubes sont ensuite placés dans la chambre de l'évaporateur (Heto PowerDry PL6000, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Puis, le vide est appliqué dans l'enceinte. Le cycle de séchage dure 20 heures et la température du plateau évolue selon 5 paliers de quatre heures à -70 °C, 0 °C, 10 °C, 20 °C et 30 °C. La pression est de 0,05 mbar. A la fin du cycle de séchage, les échantillons sont réhydratés à 25 °C dans du PBS.

### 2.3.2. Atomisation

Les échantillons ont été séchés par atomisation à l'aide d'un appareil pilote Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Büchi, Suisse). Les cellules préalablement lavées sont standardisées à une DO de 1 correspondant à  $10^8$  bactéries/mL. La solution de bactérie est ensuite introduite au centre de la buse en mouvement à l'aide d'une pompe péristaltique. Le fluide nébulisé est mis en contact avec de l'air préchauffé dans la chambre de séchage. Un module permettant de déshumidifier l'air a également été installé en entrée de l'appareil. La température d'entrée



du gaz est de 145 °C, la température de sortie est de 70 °C et la pression de 6 bars. La poudre de micro-organismes est collectée dans un mini-cyclone de verre. A la fin du cycle de séchage, les échantillons sont réhydratés à 25 °C dans du PBS. Puis la D.O. est mesurée et les cellules sont comptées sur cellule de Malassez pour valider le taux de récupération.

## 2.4. Test d'oxydation

Les cellules préalablement lavées sont standardisées à une DO de 1 correspondant à  $10^8$  bactéries/mL. Les bactéries sont mises en contact avec 10 mM de ménadione (Sigma Aldrich, France). Après 24h d'incubation, les cellules sont lavées et resuspendues dans du tampon PBS avant d'être analysées par cytométrie en flux.

## 2.5. Encapsulation

### 2.5.1. Procédé d'encapsulation

L'alginate de sodium et les protéines de pois dénaturées ont été extraites respectivement de poudres d'alginate (Sigma-Aldrich) et d'isolats de protéines de pois dégraissés Nutralys® S85M (Roquette SA, Lestrem, France). Les poudres d'alginate et de protéines ont été préparées individuellement dans de l'eau déminéralisée à température ambiante et agitées doucement jusqu'à dissolution complète (pH=7). La solution de protéines a été dialysée avec de l'eau (pH final=7,4±0,15). Les agrégats solubles de protéines de pois ont ensuite été préparés à partir de la solution dessalée en chauffant la solution de 40 °C à 90 °C (4,5 °C/min), suivie d'une phase de maintien à 90 °C pendant 1h, et un refroidissement rapide dans la glace. Les solutions mères de protéines et d'alginate ont été dialysées (24 h, 4 changements) avec un tampon Tris (pH=7,2) contenant 100 mM de NaCl et 10 mM de tris-HCl à 4 °C. Les concentrations finales des solutions de protéines de pois et d'alginate étaient respectivement de 7,8% et 3,2% en masse.

Des gels de 1,5 g ont été préparés en mélangeant les solutions d'alginate (0,8%) et de protéines de pois (4%) dans des tubes fins, puis agités avec un vortex pendant 1 minute. Un volume de 100 µL de suspension bactérienne préalablement lavée, à une concentration de  $10^9$  UFC/mL a été ajouté au mélange. Le volume a été complété avec du tampon Tris. Enfin, 1% de Glucono-δ-lactone (Sigma-Aldrich) et 20 mM de carbonate de calcium (Prolabo RP, Normapur, Nancy, France) ont été additionnés et le mélange agité pendant 30 secondes pour assurer une dispersion homogène de carbonate de calcium.

Après 12 heures de gélification à température ambiante, les échantillons ont été séchés pendant une nuit dans une enceinte de séchage contenant une solution saline saturée de LiCl (HR=11%).

### 3. Mesure de la viabilité et de la fonctionnalité

#### 3.1. Mesure de la viabilité

La viabilité des bactéries réhydratées a été estimée par la méthode des Unités Formant Colonies (UFC) après dilutions décimales et étalement sur boîtes de Pétri. Elle est exprimée en UFC/mL. Pour chaque dilution, trois boîtes de Pétri sontensemencées et les boîtes sont entreposées dans des enceintes anaérobie (Anaerocult® A, Merck) pendant 48 heures à 37 °C. Dans le cas de levures déshydratées sur couches minces, la viabilité est exprimée en UFC/mL/g d'échantillon. Les boîtes sont entreposées pendant 48 heures à 25 °C. Les expériences ont été répétées au minimum trois fois de manière indépendante.

#### 3.2. Analyse des modifications structurales et fonctionnelles des cellules

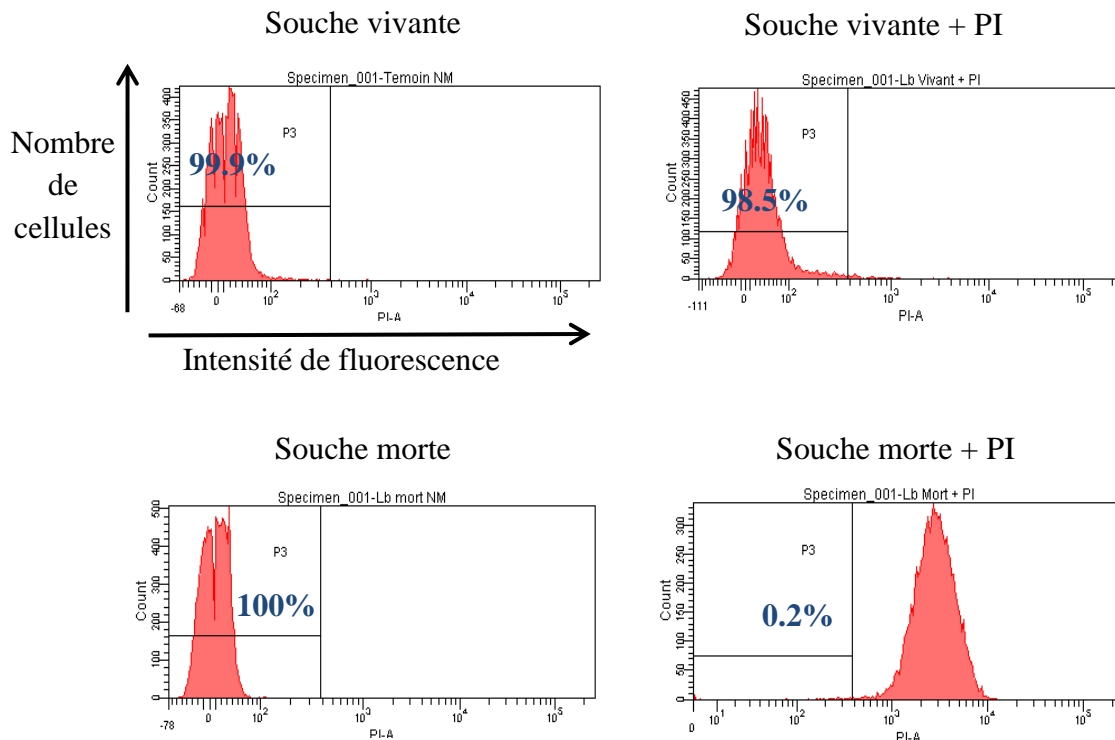
##### 3.2.1. Estimation de l'intégrité membranaire (Cytométrie en flux)

L'intégrité membranaire des cellules a été mesurée par cytométrie en flux en marquant les cellules avec de l'iodure de propidium (IP). L'IP est un agent intercalant de l'ADN, sans spécificité de base, ne traversant que les membranes cytoplasmiques endommagées, un phénomène caractéristique de la nécrose cellulaire. Il permet donc de mettre en évidence la proportion de cellules perméabilisées dans une population. L'IP a une longueur d'onde maximale d'excitation à 535 nm et d'émission à 617 nm.

La cytométrie en flux permet d'analyser l'ensemble des individus d'une population en un temps très court. Les bactéries défilent à grande vitesse dans le faisceau d'un laser et trois paramètres sont ensuite analysés par l'appareil :

- la lumière diffusée dans l'axe du rayon incident (FSC), corrélée à la taille de la bactérie
- la diffusion lumineuse à angle droit (SSC), corrélée à la nature du contenu intracellulaire de la bactérie (granulométrie)
- la fluorescence émise liée à la présence d'un fluorochrome (FL<sub>1</sub>, FL<sub>2</sub>...)

Les analyses ont été réalisées sur un appareil FACS Aria II (Becton Dickinson, San José, Ca, USA) équipé de deux lasers (488 nm, 20 mW et 633 nm, 20 mW).

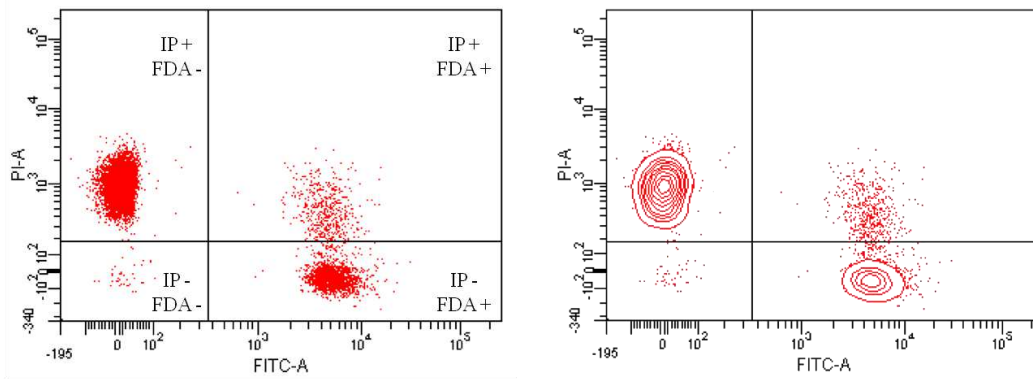


**Figure 28:** Types de réponses obtenues par cytométrie en flux lors du passage de micro-organismes vivants ou morts, marqués et non marqués à l'IP. Le pourcentage figurant en bleu, exprime la part de cellules présentes dans la porte P3, soit non marquées à l'IP.

### 3.2.2. Estimation de l'activité enzymatique (Cytométrie en flux)

La carboxyfluorescéine diacétate (cFDA) permet d'évaluer l'activité enzymatique des cellules par cytométrie en flux. Elle passe facilement la membrane plasmique (transport passif) et est clivée en fluorescéine par les estérases des cellules vivantes. La fluorescéine libre, chargée positivement, sort plus lentement que ne rentre son ester. Elle est donc retenue dans les cellules vivantes.

Dans cette étude les cellules ont été doublement marquées avec de l'IP et de la cFDA (Figure 29). Pour cela les bactéries ont d'abord été incubées avec de la cFDA (10  $\mu$ M) pendant 10 minutes, puis centrifugées et remises en suspension dans du tampon (PBS). Les bactéries ont ensuite été incubées avec de l'IP avant d'être passées en cytométrie. La fluorescence verte correspondant à la cFDA, a été collectée à l'aide d'un filtre passe-bande de 530 ( $\pm$  30) nm. La fluorescence rouge, correspondant à l'IP a été recueillie à l'aide d'un filtre passe-haut de 610 ( $\pm$  30) nm.



**Figure 29:** Type de réponse obtenue par cytométrie en flux lors du passage de micro-organismes marqués avec de l'IP et de la cFDA. Sur le graphique de gauche, chaque évènement est représenté par un point tandis que le graphique de droite exprime une densité de population.

### 3.2.3. Dosage de l'oxydation intracellulaire (Spectrofluorimétrie)

La sonde CM-H<sub>2</sub>DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester) a été utilisée pour doser l'oxydation intracellulaire des cellules bactériennes après séchage à différents niveaux d'*a<sub>w</sub>* et après différents temps de stockage. Les bactéries ont été mises en contact avec la sonde fluorescente pendant 30 minutes à 37 °C. Puis les cellules ont été centrifugées et le surnageant a été remplacé par une solution tampon contenant des protectants (tréhalose + cystéine). Après séchage, les échantillons ont été réhydratés dans du MRS à 37 °C. Les cellules bactériennes vont ensuite subir 5 cycles de casse de 40 secondes avant d'être centrifugées de nouveau. La suspension cellulaire marquée est diluée au centième dans une cuve de spectroscopie. Les mesures ont été effectuées par spectrométrie de fluorescence à la longueur d'onde d'excitation de 504 nm et la longueur d'onde d'émission de 524 nm.

### 3.2.4. Reprise de croissance (Lecteur de plaques)

Le temps de reprise de croissance des bactéries a été mesuré avant et après séchage. Pour cela, les puits d'une micro-plaque sont remplis avec 180 µL de MRS et 20 µL de suspension contenant 10<sup>6</sup> cellules viables. La densité optique (DO) à 600 nm est ensuite mesurée par un lecteur de plaque (PARADIGME, Beckman Coulter) toutes les 30 minutes à 37 °C. Après obtention des courbes de croissances, le temps nécessaire pour atteindre le milieu de la phase exponentielle a été mesuré à l'aide du logiciel Matlab R2011b (fonction `fminsearch`).

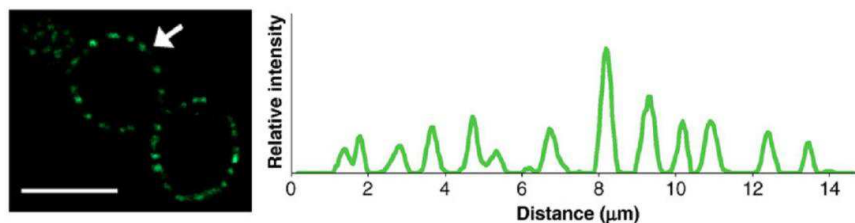
### 3.2.5. Observation de bactéries encapsulées (Microscopie confocale)

La microscopie confocale à balayage laser permet de réaliser des images de très faible profondeur de champ en pratiquant des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé. Le laser est focalisé sur la préparation et seule la zone de focalisation est suffisamment excitée pour émettre de la fluorescence. Les observations ont été effectuées sur un appareil Nikon Eclipse TE 2000 U équipé d'une tête confocale multispectrale D Eclipse C1. Les images fluorescentes et les images en lumière transmises ont été enregistrées et traitées par le logiciel EZ-C1 3.50 (Nikon).

La microscopie confocale a été utilisée pour localiser les bactéries encapsulées dans une matrice alginate-protéine de pois. Avant encapsulation les bactéries préalablement lavées ont été mises en contact avec 0,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  d'une solution de SYTO9 (3,34 mM) à l'obscurité, pendant 20 minutes à température ambiante. Puis les cellules ont été lavées 3 fois et re-suspendues dans du PBS. Dans le même temps, les protéines de pois ont été marquées avec 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  d'une solution de rhodamine B isothiocyanate (RITC, 1 mg/mL), sous agitation et à l'obscurité pendant 1h à 4 °C. Les échantillons ont ensuite été mélangés et mis à gélifier entre lame et lamelle durant 12 heures avant d'être observés.

### 3.2.6. Observation de micro-domaines Sur7-GFP (Microscopie confocale)

La membrane plasmique des levures contient deux sous-compartiments appelés MCC (membrane compartment occupied by Can1) et MCP (membrane compartment occupied by Pma1) (Grossmann et al. 2007). Comme d'autres protéines, la protéine Sur7 est localisée dans les microdomaines MCC riches en ergostérol. La levure *S. cerevisiae* WT a été transformée génétiquement pour greffer une protéine fluorescente (GFP, Green Fluorescent Protein) à la protéine Sur7 (Dupont et al. 2010).



**Figure 30:** Répartition des microdomaines Sur7-GFP chez la levure à l'état physiologique (Dupont et al. 2010). Le profil d'intensité de fluorescence, à droite, a été mesuré sur le périmètre de la cellule marquée d'une flèche. Echelle : 5 $\mu\text{m}$ .

L'utilisation de la microscopie confocale a permis de visualiser la répartition de la protéine Sur7 dans la membrane plasmique des levures (Figure 30).

### 3.3. Mesure de la fonctionnalité probiotique

#### 3.3.1. Mesure des propriétés immuno-modulatrices

Les propriétés immuno-modulatrices des souches bactériennes ont été étudiées sur des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC). Ces dernières sont conservées dans l'azote liquide (-196 °C). Les PBMC sont décongelées dans un bain marie à 37 °C, puis transférées dans du milieu RPMI-1640 (Lonza, Suisse) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de L-glutamine (2mM final) et 0,1% d'un mélange pénicilline/streptavidine (10 U/mL). Enfin, 0,03 mL de DNase (10 mg/mL) sont ajoutés pour éviter l'agglutination.

Les cellules sont centrifugées deux fois à 200 g pendant 15 minutes, remises en suspension puis comptées sur une cellule de Malassez. Les PBMC sont ensuite déposées dans une plaque 24 puits à une concentration de  $10^6$  cellules/puits.  $10^7$  bactéries/puits sont ajoutées dans 20 µL de PBS et le volume est complété à 1 mL (RPMI supplémenté). Les plaques sont alors incubées dans une étuve à CO<sub>2</sub> à 37 °C. Après 24 heures d'incubation, le surnageant est transféré sur des plaques deepwell pour le dosage des concentrations en IL-10 et IL-12p70 par la méthode ELISA (Biolegend, USA). Les échantillons sont testés en double.

#### 3.3.2. Mesure de l'hydrophobicité de surface

La méthode d'adhésion à un solvant a été utilisée pour évaluer le caractère hydrophobe/hydrophile de la surface des cellules avant et après séchage. Le caractère hydrophobe des bactéries a été mesuré après partition des cellules entre une phase aqueuse et une phase apolaire d'hexadécane. Les cultures sont lavées deux fois dans du tampon phosphate (PBS) puis re-suspendues de manière à obtenir une DO de 0,6 à 600 nm (DO 600<sub>initiale</sub>). La suspension bactérienne est alors additionnée de 0,4 mL d'hexadécane puis agitée au vortex pendant 2 minutes. Les tubes sont laissés à reposer à 37 °C pendant 30 minutes. Après séparation des différentes phases, l'absorbance de la phase aqueuse est lue à 600 nm (DO 600<sub>finale</sub>). L'affinité des cellules bactériennes pour les solvants est exprimée en pourcentage d'après la relation suivante :

$$H(\%) = \frac{DO\ 600_{initiale} - DO\ 600_{finale}}{DO\ 600_{initiale}}$$

#### 4. Caractérisation selon les critères de l'EFSA

##### 4.1. Mesure de la Concentration Minimale d'Inhibition (CMI)

La CMI est définie comme la concentration minimale d'inhibiteur empêchant la croissance bactérienne. Cette méthode est utilisée pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques. Dans ce travail, la sensibilité de la souche *L. plantarum* CNRZ 1997 a été déterminée pour la gentamycine, la kanamycine, la streptomycine, la vancomycine, la clindamycine, l'érythromycine, la qinupristine/dalfopristine, l'ampicilline, le chloramphénicol et la tétracycline. La CMI correspond alors à la plus petite concentration pour laquelle la croissance est nulle.

*TROISIEME PARTIE : RESULTATS & DISCUSSION*



## RESULTATS & DISCUSSION

L'objectif principal de ce travail a consisté à sélectionner une bactérie probiotique et à l'intégrer dans un complément alimentaire déshydraté. En amont, l'INRA de Jouy-en-Josas a sélectionné et testé les capacités immuno-modulatrices de 158 souches probiotiques. Les bactéries présentant la meilleure aptitude à moduler la réponse du système immunitaire ont été choisies et transmises à l'UMR PAM.

Au sein de l'UMR PAM, les mécanismes mis en jeu au cours du séchage ont été étudiés et l'impact de ce procédé sur la survie et la fonctionnalité des cellules a été mesuré. La caractérisation de ces phénomènes a donné lieu à la mise en place de tests de screening représentatifs du procédé de fabrication. Ces tests ont permis de cribler les bactéries finales du projet. Pour les souches d'intérêt sensibles au procédé, plusieurs stratégies de protection ont été développées.

Le premier chapitre de cette troisième partie s'intéresse à l'impact du séchage sur la survie et la fonctionnalité de microbes probiotiques. Le deuxième chapitre détaille la mise en place de tests de criblage des bactéries sur leur résistance au procédé de fabrication. Le troisième chapitre présente les voies d'optimisation de la survie et de la fonctionnalité des cellules au séchage à partir des résultats obtenus dans les parties précédentes. Enfin, un dernier chapitre présente les premiers résultats obtenus à l'échelle industrielle avec la souche retenue.

### 1. Compréhension des mécanismes mis en jeu au cours du séchage des bactéries

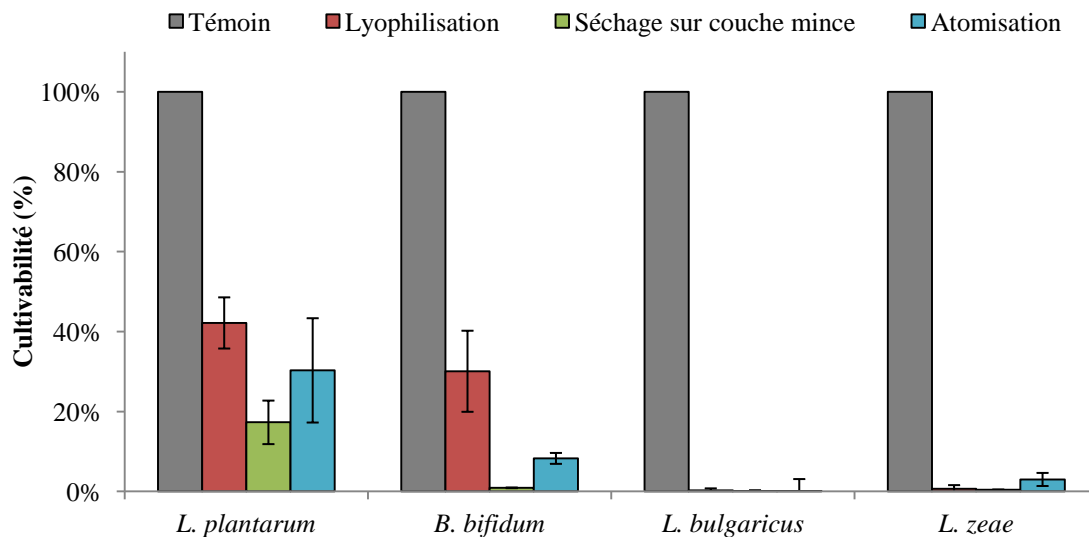
Le séchage est une étape critique du process de fabrication qui peut potentiellement engendrer des altérations de la viabilité et/ou de la fonctionnalité des cellules. Ces deux conséquences directes du procédé de déshydratation sont étudiées successivement dans cette partie.

#### 1.1. Impact du procédé de séchage sur la viabilité cellulaire

Le taux de survie est le paramètre le plus souvent mesuré pour évaluer l'impact d'un stress sur un micro-organisme. L'objectif des expériences présentées dans cette partie est de mieux caractériser les mécanismes mis en jeu au cours du procédé de séchage et de quantifier leur impact sur le taux de survie des cellules.

### 1.1.1. Impact d'un cycle de séchage complet

Le taux de survie des souches, *L. plantarum*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus* et *L. zea*e a été mesuré après deux techniques de séchage utilisées dans l'industrie, la lyophilisation et l'atomisation et une technique à l'étude, le séchage sur couches minces (Figure 31). Pour les souches *L. bulgaricus* et *L. zea*e, les résultats montrent un taux de destruction important quel que soit le procédé de déshydratation utilisé. Ainsi le taux de survie de la souche *L. bulgaricus* est de 0,27%, 0,04% et 0,10%, respectivement après lyophilisation, séchage sur couche mince et atomisation. A contrario, les souches *L. plantarum* et *B. bifidum* sont plus résistantes. La lyophilisation préserve le mieux ces deux bactéries avec des taux de survie respectifs de 42% et 30%.



**Figure 31:** Taux de survie des souches *L. plantarum*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus* et *L. zea*e à un séchage par lyophilisation, sur couche mince ou par atomisation. Les cellules ont été séchées, puis réhydratées rapidement dans du PBS à 25 °C.

Les résultats obtenus montrent d'abord un fort taux de destruction des cellules, quelle que soit la méthode de séchage, lorsqu'elles sont déshydratées sans adjuvants. Dans la plupart des publications, les micro-organismes probiotiques sont séchés en présence de molécules protectrices pour obtenir de meilleurs taux de survie (Meng et al. 2008). Dans la section suivante, nous avons choisi d'étudier plus précisément l'impact de différents adjuvants sur la viabilité lors d'un séchage sur couche mince.

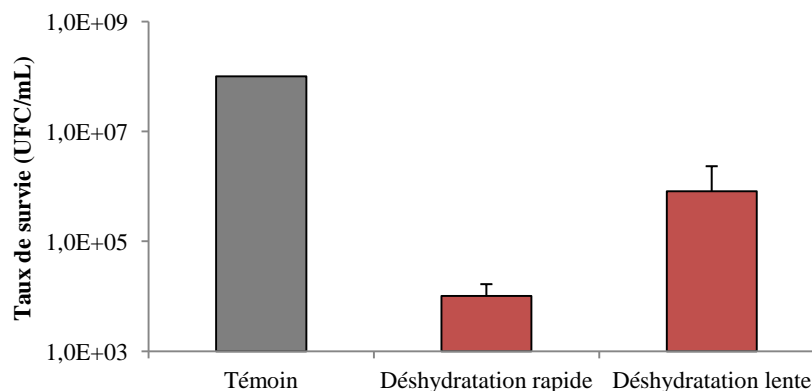
### 1.1.2. Impact de chaque étape du cycle de séchage

Le procédé de séchage peut être divisé en trois étapes successives, la déshydratation, le maintien à l'état sec et la réhydratation. Pour cette partie, nous avons choisi de nous intéresser au comportement de la souche la plus sensible au séchage, *L. bulgaricus*. Les

résultats décrivent l'impact de chacune de ces trois phases sur le taux de survie de la souche *L. bulgaricus*. Trois protectants différents, un sucre (tréhalose), un polyol (glycérol) et un acide aminé (cystéine) ont été utilisés. Le tréhalose est un sucre non réducteur (ne favorisant pas les réactions de Maillard) (Schebor et al. 1999), capable de vitrifier la matrice (Crowe et al. 1998) et de ralentir les réactions d'oxydation. Il est connu pour stabiliser les membranes et les protéines en remplaçant les liaisons avec les molécules d'eau lors de la déshydratation. Le glycérol est un soluté perméant qui va permettre de diminuer la contraction volumique. Enfin, la cystéine est un acide aminé naturel possédant un groupement thiol facilement oxydable ; elle est utilisée comme antioxydant (De Valdez et al. 1983).

#### 1.1.2.1. Etape de déshydratation : Effet de la cinétique et de l'utilisation d'additifs

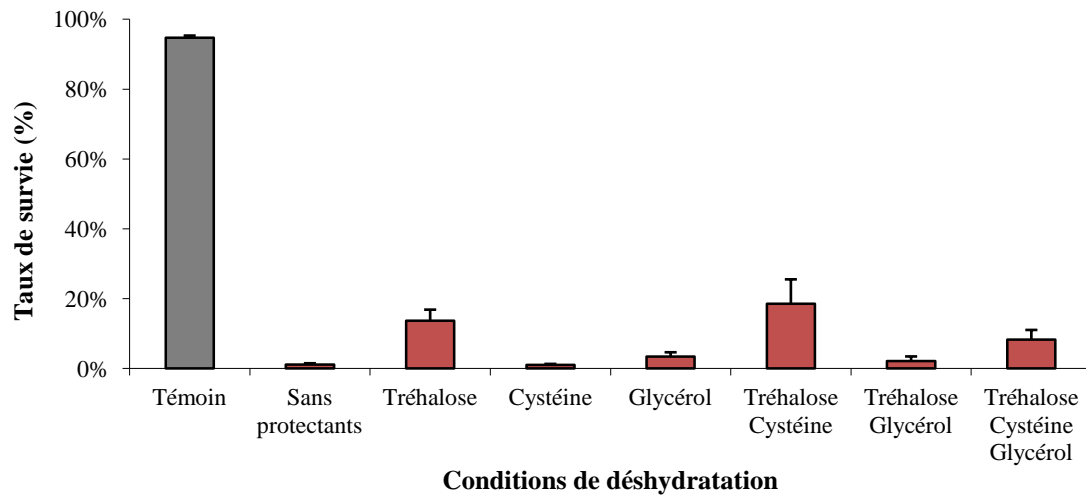
Tout d'abord, deux cinétiques de déshydratation, l'une rapide (< 5 min.), l'autre lente (35 min.) ont été testées (Figure 32). Dans les deux cas, les bactéries ont été réhydratées rapidement. Les résultats montrent un effet important de la cinétique sur le taux de survie de la bactérie *L. bulgaricus*. Dans la bibliographie, l'impact de la cinétique de déshydratation a beaucoup été étudiée en milieu liquide modèle et montre des résultats similaires (Dupont et al. 2010; Gervais et al. 1992).



**Figure 32:** Impact de la cinétique de déshydratation sur le taux de survie de la souche *L. bulgaricus*. La suspension bactérienne a été séchée dans une enceinte contenant une solution saturée de LiCl (11% HR) ventilée (déshydratation rapide) ou non ventilée (déshydratation lente).

Les bactéries ont également été mises en contact avec des protectants (tréhalose, cystéine et/ou glycérol) après l'étape de lavage puis séchées jusqu'à une  $a_w$  de 0,11 et réhydratées à 25 °C. Les résultats de la Figure 33, montrent une forte destruction des cellules au cours du séchage en l'absence d'adjuvants. Sur cette figure les résultats sont exprimés en pourcentage pour mieux visualiser les différences. L'utilisation de protectants au sein de la matrice de séchage tels que le tréhalose, le mélange tréhalose/cystéine ou encore

tréhalose/cystéine/glycérol améliore la survie bactérienne avec des taux de survie respectifs de 14%, 19% et 8%.

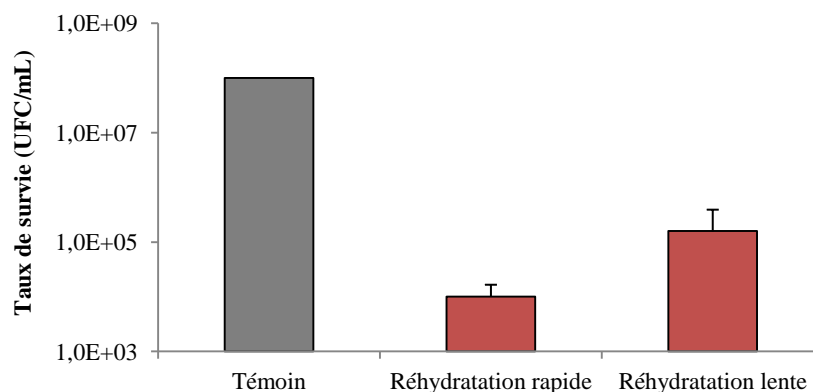


**Figure 33:** Impact des conditions de déshydratation sur la survie de la souche *L. bulgaricus*. Les cellules ont été séchées sur couche mince en présence d'additifs, puis réhydratées rapidement dans du PBS à 25 °C.

La solution de tréhalose et de cystéine donne le meilleur taux de survie. Le glycérol et le tréhalose possèdent un effet bénéfique seuls mais il n'y a pas de synergie lorsqu'ils sont associés. Ce phénomène est dû au fait que le glycérol empêche la vitrification de la matrice.

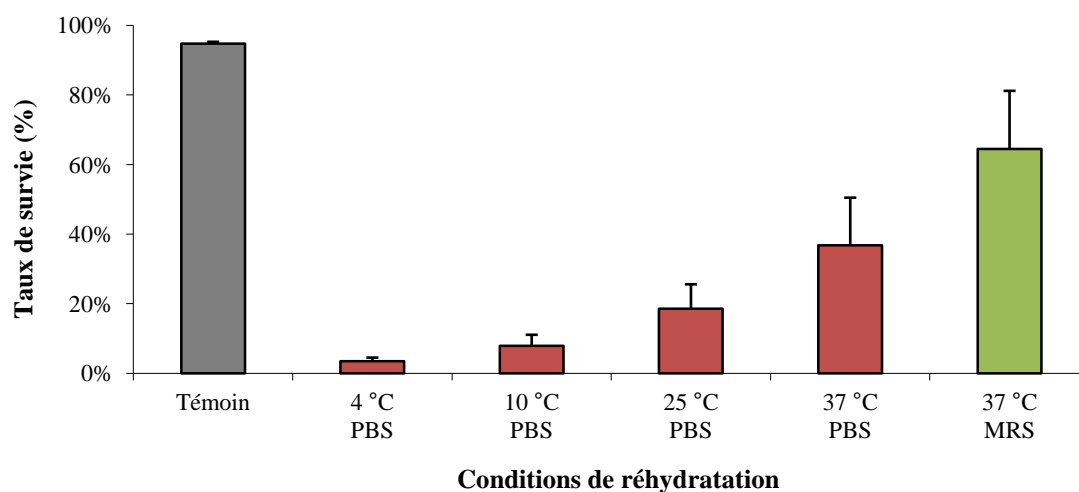
#### 1.1.2.2. Etape de réhydratation : Effet de la cinétique, de la température et de la composition du milieu

Deux cinétiques de réhydratation, l'une rapide, l'autre lente, ont été testées (Figure 34). Dans les deux cas les bactéries ont été déshydratées rapidement. Les résultats montrent un effet significatif de la cinétique sur le taux de survie de la bactérie *L. bulgaricus*.



**Figure 34:** Impact de la cinétique de réhydratation sur le taux de survie de la souche *L. bulgaricus*. La suspension bactérienne a été séchée dans une enceinte ventilée contenant une solution saturée de LiCl (11% HR) puis réhydratée directement avec du PBS ou transférée dans une enceinte saturée en eau (HR=100%) pendant 1h avant d'être réhydratée dans du PBS.

Dans la bibliographie, d'autres études montrent que la cinétique de réhydratation joue sur le taux de survie des micro-organismes (Mille et al. 2003). Différentes températures et matrices de réhydratation ont également été testées afin d'améliorer le taux de survie des cellules au cycle de séchage. A la suite des résultats obtenus précédemment, la souche *L. bulgaricus* a été déshydratée en présence d'un mélange tréhalose/cystéine. Ainsi, après séchage sous air jusqu'à une  $a_w$  de 0,11 les cellules ont été réhydratées dans du tampon à 4 °C, 10 °C, 25 °C et 37 °C ou dans du milieu de culture MRS à 37 °C (Figure 35). Les résultats obtenus montrent une augmentation du taux de survie bactérien avec l'augmentation de la température du milieu de réhydratation. Plus particulièrement, la viabilité passe de 3% à 37% entre 4 °C et 37 °C. La survie augmente également en présence de nutriments dans la matrice de réhydratation à 37 °C, passant de 37% à 64%.

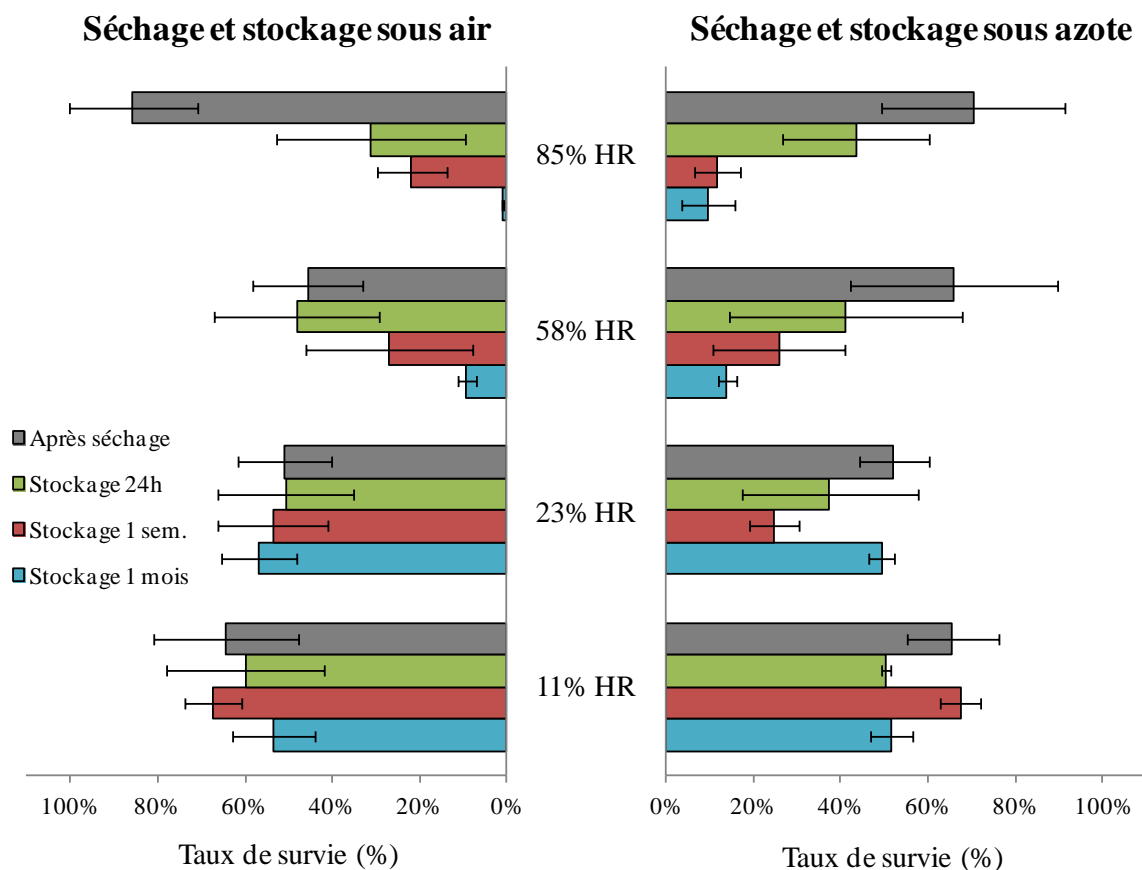


**Figure 35:** Impact de la température et du milieu de réhydratation sur la survie de la souche *L. bulgaricus*. Les cellules ont été séchées sur couche mince en présence d'un mélange tréhalose/cystéine, puis réhydratées rapidement dans du PBS à 4, 10, 25 et 37 °C ou dans du milieu de culture MRS à 37 °C.

D'autres études ont montré qu'une réhydratation à basse température induisait des taux de mortalité importants (Leach and Scott 1959). L'élévation de la température lors de la réhydratation permet d'augmenter la fluidité membranaire, rendant la membrane plus apte à retrouver un état hydraté (Poirier et al. 1999). D'autres travaux sur la souche *L. bulgaricus* montrent une température de réhydratation optimale de 50 °C (Speck and Myers 1946; Teixeira et al. 1995). De plus, la nature du milieu de réhydratation joue également un rôle important dans le maintien de la viabilité. Le MRS contient l'ensemble des composés nutritifs essentiels au développement bactérien, notamment le glucose et l'extrait de levure (Zhao and Zhang 2005).

1.1.2.3. Etape de maintien à l'état sec

En plus des deux étapes transitoires décrites précédemment, les bactéries doivent rester vivantes au cours du stockage à l'état sec. Pour mieux caractériser cette étape, la survie de la souche *L. bulgaricus* a été mesurée à quatre niveaux d'hydratation (85%, 58%, 23%, 11%) pendant un mois. A la suite des résultats décrits précédemment, la souche *L. bulgaricus* a été déshydratée en présence du mélange tréhalose/cystéine et réhydratée dans du MRS à 37 °C. Les résultats obtenus montrent une diminution rapide du taux de survie de la souche *L. bulgaricus* lors de sa conservation, sous air, à une humidité relative de 85% (Figure 36). Ainsi la viabilité passe de 86% après séchage à 31% après 24h et moins de 1% après 1 mois de stockage sous air. A ce niveau d'humidité, l'échantillon n'est pas totalement sec, mais plutôt pateux. Lors du stockage à 58%, le taux de survie diminue également mais de façon un peu plus lente, passant de 46% après séchage à 9% après 1 mois de stockage sous air. Les deux dernières valeurs d'humidité testées (23% et 11% HR sous air) montrent une stabilité de la viabilité des cellules au cours du temps.



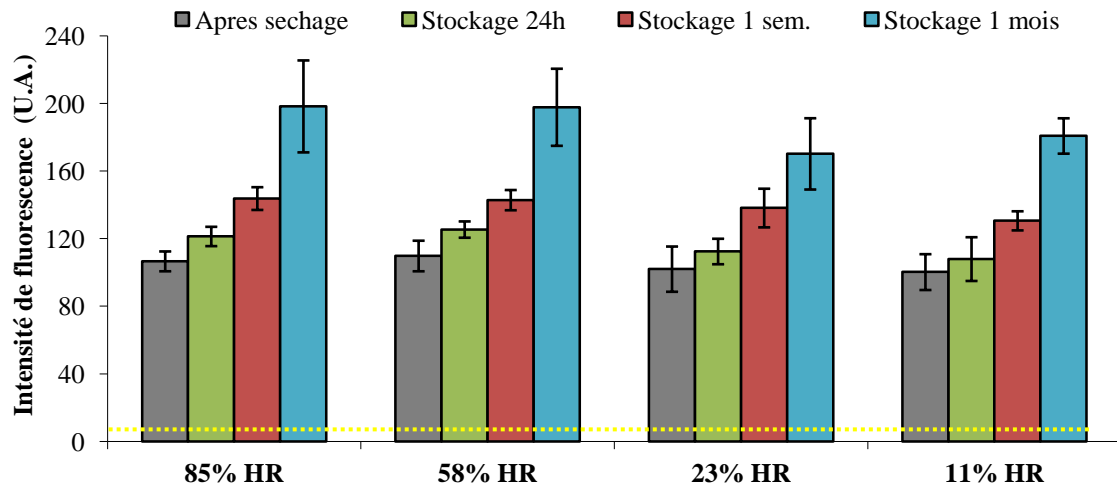
**Figure 36:** Impact des conditions d'hydratation sur le taux de survie de la souche *L. bulgaricus* au cours du stockage. Les cellules ont été séchées pendant 1h puis stockées, sous air ou sous azote, durant 24h, 1 semaine et 1 mois. Les bactéries ont été séchées sur couche mince en présence d'un mélange tréhalose/cystéine et réhydratées dans du milieu de culture MRS à 37 °C.

Les résultats de la Figure 36 soulignent l'importance de l'humidité relative de l'environnement sur la stabilité des cellules sèches. D'autres études ont montré une évolution du taux de survie similaire pour des souches de *L. plantarum* ou *L. bulgaricus* (Castro et al. 1995; Teixeira et al. 1995).

La même expérience a été reproduite sous azote et montre des résultats très proches (Figure 36). Il n'y a pas de différences significatives entre les taux de viabilité des souches séchées sous air et celles séchées sous azote. Les résultats obtenus montrent une diminution rapide du taux de survie de la souche *L. bulgaricus* lors de sa conservation à une humidité relative de 85% et 58%. Les deux dernières valeurs d'humidité testées (23% et 11%) indiquent une stabilité du taux de viabilité des cellules au cours du temps. Il apparaît donc que la présence d'oxygène dans l'environnement ne modifie pas le taux de survie de la souche après séchage et au cours du temps de stockage. Ceci est probablement dû à la présence de tréhalose et de cystéine qui limitent les réactions d'oxydation. Dans la bibliographie, une étude met en évidence une différence d'un demi log entre azote et air après 1 mois de stockage à 0% HR pour une souche de *L. bulgaricus* lyophilisée en présence de poudre de lait écrémé (11% m/v) (Castro et al. 1995). Une autre publication observe que le taux de survie de *L. salivarius* est maximal pour 11% HR alors que la souche meurt rapidement à 0% et 33% HR (Zayed and Roos 2004). La perte de survie aux hautes valeurs d'hydratation est souvent associée à la formation de radicaux libres dans les cellules (Heckly and Dimmick 1968; Kurtmann et al. 2009). La formation de ces radicaux libres peut entraîner l'altération des macromolécules, plus particulièrement les phospholipides de la membrane. D'autres auteurs ont observé une modification du profil lipidique lié à l'oxydation pour de fortes valeurs d'hydratation (Castro et al. 1996). La présence d'azote dans l'enceinte n'empêche pas la formation d'espèces réactives mais ne permet pas la présence d'oxygène singulet. Deux hypothèses peuvent expliquer la perte de viabilité plus importante des cellules aux hautes valeurs d'hydratation :

- un plus grand nombre d'espèces réactives, à l'origine d'une plus grande oxydation
- une même quantité d'espèces réactives mais une plus grande mobilité

Pour comprendre les mécanismes à l'origine de cette baisse de viabilité, des mesures du niveau d'oxydation au cours d'un cycle déshydratation-réhydratation ont été réalisées (Figure 37). Les résultats montrent une quantité de radicaux libres identiques après séchage aux quatre niveaux d'hydratation. De même, cette quantité évolue de manière similaire au cours du temps de stockage. Or, la survie de *L. bulgaricus* chute à 85% HR alors qu'elle reste constante à 11% HR. Les cellules sont donc capables de subir cette apparition de radicaux libres sans que leur taux de viabilité ne soit directement affecté.



**Figure 37:** Dosage de l'oxydation intracellulaire de la souche *L. bulgaricus* après séchage et stockage sous air à 4 niveaux d'hydratation. Les bactéries ont été marquées avec la sonde CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Puis, les cellules ont été séchées sous air en présence d'un mélange tréhalose/cystéine, stockées sous air pendant 1h, 24h, 1 semaine ou 1 mois et réhydratées dans du milieu de culture MRS à 37 °C. L'intensité de fluorescence a ensuite été mesurée par spectrofluorimétrie à 524 nm. La barre jaune représente l'intensité de fluorescence basale (cellules marquées non séchées).

Lors du séchage, le tréhalose va former un verre qui augmente la viscosité de la matrice et réduit la mobilité moléculaire (Crowe et al. 2003). Or la teneur en eau influence fortement la vitrification. Castro et al., ont mesuré l'index d'acide gras insaturé/saturé sur des cellules séchées de *L. bulgaricus* et ont montré une augmentation de l'oxydation lipidique aux fortes valeurs d'hydratation (Castro et al. 1995). Il semble que la mort des cellules à 85% et 58% HR ne soit pas due à la quantité de radicaux libres dans la matrice mais plutôt à leur mobilité. Dans le cas de notre étude, il est possible d'envisager deux origines différentes pour l'apparition de ces radicaux libres :

- la déshydratation, avec l'arrêt du métabolisme et des enzymes
- la réhydratation, avec une perte d'efficacité de la prise en charge du stress oxydant

En effet, nous avons observé précédemment que la présence d'oxygène dans l'enceinte ne diminuait pas le taux de survie cellulaire. De plus, les résultats montrent que la quantité de radicaux libres apparue à 11% HR était déjà présente à 85% HR. Or, la quantité d'eau perdue et le volume des bactéries entre ces deux niveaux d'hydratation sont différents. Il semble donc que l'apparition de ROS lors du séchage se fasse dès les premiers stades de déshydratation et surtout que ce taux reste constant dans la suite du processus de déshydratation. L'augmentation parallèle du niveau d'oxydation au cours du temps pour les quatre niveaux d'hydratation plaide également pour une oxydation au cours de l'étape de réhydratation et une perte d'efficacité de la prise en charge du stress oxydant.

Les valeurs d'intensité de fluorescence mesurée après séchage de la souche *L. bulgaricus* sans adjuvants (non figurées sur le graphique) ne sont pas significativement différentes de celles



obtenues en présence de tréhalose et de cystéine. Par conséquent, les protectants ne semblent pas avoir d'effets sur l'apparition des radicaux libres dans les cellules.

Ainsi, les résultats obtenus mettent en évidence de fortes pertes de viabilité associées :

- au stress mécanique lors des étapes transitoires
- au stress oxydant lors de l'étape de maintien à l'état sec

Ce sont ces deux stress que nous avons choisis d'étudier plus finement dans la section suivante.

### 1.1.3. Impact du stress mécanique et du stress oxydant sur le taux de survie des bactéries

Le stress mécaniques et le stress oxydant sont deux composants du procédé de séchage, potentiellement létales pour les bactéries. Dans cette section nous avons évalué la contribution respective de chaque stress dans le procédé de séchage. Pour étudier le stress mécanique, plusieurs cinétiques et amplitudes de séchage ont été testées. Pour quantifier le stress oxydant, les bactéries ont été séchées sous différentes ambiances gazeuses (air, azote, azote-hydrogène).

#### 1.1.3.1. Etude du stress mécanique induit par le séchage

Cette partie du travail a fait l'objet d'une publication intitulée "*Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival*" dans *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Le procédé de séchage consiste à transférer une cellule de son milieu de croissance liquide à un environnement solide. Si la mesure du taux de survie des micro-organismes après séchage est commune, peu d'études parviennent à mettre en évidence les mécanismes mis en jeu au cours du procédé. Souvent, les conséquences du séchage sont observées par des mesures d'IRTF ou de reprise de croissance sur l'ensemble de la population bactérienne. La compréhension des phénomènes à l'échelle du micro-organisme se révèle très complexe en termes d'imagerie et d'utilisation de marqueurs spécifiques, car la modification locale de l'état solide entraîne l'évolution des propriétés optiques et des coefficients de diffusion. Pour tenter de comprendre les phénomènes se déroulant lors d'un séchage, les mécanismes cellulaires ayant lieu lors d'un cycle déshydratation-réhydratation ont été principalement étudiés en milieu liquide modèle. En effet, l'immersion d'une faible quantité de cellules dans une

solution hyperosmotique a pour conséquence la sortie d'eau intracellulaire et une diminution du volume cellulaire jusqu'à l'équilibre des potentiels hydriques de part et d'autre de la membrane.

L'utilisation d'un milieu liquide pour déshydrater les micro-organismes a permis d'observer les cellules en microscopie à l'état hydraté mais également au cours des étapes transitoires de déshydratation et de réhydratation. Ces observations permettent de proposer un scénario à l'origine de la mort cellulaire lors de perturbations osmotiques :

- L'étape de déshydratation inclut une perturbation physique qui consiste en un transfert d'eau et une diminution du volume cellulaire.
- La membrane plasmique, à l'interface des milieux intra- et extracellulaires est fortement affectée. La cinétique de séchage modifie l'évolution du rapport (s/v) qui affecte la réorganisation de la membrane (transition de phase lipidique) et la dissipation de l'excès de surface (endovésiculation).
- Au moment de la réhydratation, le manque de surface conduit généralement à la perméabilisation et à la mort cellulaire.

Ces travaux ciblent donc la membrane comme étant la structure clef des cellules, dont l'organisation conditionne la survie à la déshydratation.

Dans le cas du séchage, les phénomènes sont relativement similaires lors des premières étapes, qui correspondent au maintien des cellules dans un environnement liquide concentré. Les mécanismes diffèrent ensuite en raison de la solidification de la matrice et du contact avec l'atmosphère gazeuse (présence d'oxygène). Ainsi, on peut se demander si les mécanismes de résistance observables en milieu liquide sont similaires dans le cas d'un séchage aérien ?

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux conséquences mécaniques du séchage sur les cellules en faisant un parallèle avec le milieu liquide. Pour cela, nous avons soumis des micro-organismes à plusieurs perturbations osmotiques et à plusieurs séchages en milieu aérien. Quatre cinétiques et trois niveaux d'hydratation ont été testés pour faire varier l'intensité et la vitesse des transferts d'eau à travers la membrane. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'évolution de l'organisation membranaire au cours des étapes de déshydratation et réhydratation. Dans un premier temps, notre étude s'est focalisée sur la bactérie modèle, *L. bulgaricus*. La taille des bactéries se révélant limitante pour l'observation microscopique, nous avons choisi de reproduire ces perturbations sur un autre micro-organisme modèle, parfaitement caractérisé et connu pour sa résistance aux perturbations hydriques de l'environnement, la levure *S. cerevisiae*.

Les résultats obtenus chez la levure indiquent un comportement comparable en milieu aérien et en milieu liquide avec un effet cinétique, un effet seuil et un effet souche. En effet, que ce soit en milieu liquide ou en milieu aérien, le taux de survie est maximal après des cinétiques de déshydratation et de réhydratation lentes, et minimal après des cinétiques de déshydratation et de réhydratation rapides. De même, le taux de survie diminue similairement en milieu liquide ou en milieu aérien avec l'augmentation du niveau de déshydratation. Ces observations se vérifient pour deux micro-organismes, la souche de levure BY4742 et le mutant *erg6Δ*, une souche osmotiquement fragile qui n'accumule pas d'ergostérol. Enfin, l'observation de la membrane (domaines membranaires riches en ergostérol) par microscopie confocale a permis de mettre en évidence des mécanismes similaires entre déshydratation en milieu liquide et séchage. Les cinétiques lentes, en permettant à la membrane de se désorganiser lors de la déshydratation puis de se réorganiser lors de la réhydratation, favorisent la survie des cellules. A contrario, les cinétiques rapides empêchent les phénomènes de réorganisation et conduisent à la mort des cellules lors de l'étape de réhydratation.

Ces résultats établissent pour la première fois un lien direct entre les mécanismes observés en milieu liquide et ceux supposés lors d'un séchage. Cette étude démontre que la membrane des micro-organismes est une structure clef lors d'un séchage. De plus, les perturbations osmotiques avec du glycérol représentent un environnement propice à l'optimisation du procédé de séchage et pourraient être utilisées comme un outil prédictif simple. Enfin, une nouvelle technique d'observation confocale à l'état sec a été mise en place en déposant les cellules dans une couche d'huile minérale.

## AIR-DRYING KINETICS AFFECT YEAST MEMBRANE ORGANIZATION AND SURVIVAL

Guillaume Lemetais, Sébastien Dupont, Laurent Beney and Patrick Gervais

---

**Abstract:** The plasma membrane (PM) is a key structure for the survival of cells during dehydration. In this study, we focused on the concomitant changes in survival and in the lateral organization of the PM in yeast strains during desiccation, a natural or technological environmental perturbation that involves transition from a liquid to a solid medium. To evaluate the role of the PM in survival during air-drying, a wild-type yeast strain and an osmotically fragile mutant (*erg6Δ*) were used. The lateral organization of the PM (microdomain distribution) was observed using a fluorescent marker related to a specific green fluorescent protein-labeled membrane protein (Sur7-GFP) after progressive or rapid desiccation. We also evaluated yeast behavior during a model dehydration experiment performed in liquid medium (osmotic stress). For both strains, we observed similar behavior after osmotic and desiccation stresses. In particular, the same lethal magnitude of dehydration and the same lethal kinetic effect were found for both dehydration methods. Thus, yeast survival after progressive air-drying was related to PM reorganization, suggesting the positive contribution of passive lateral rearrangements of the membrane components. This study also showed that the use of glycerol solutions is an efficient means to simulate air-drying desiccation.

---

*Cet article a été publié dans Applied Microbiology and Biotechnology*

## Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival

Guillaume Lemetais · Sébastien Dupont ·  
Laurent Beney · Patrick Gervais

Received: 22 November 2011 / Revised: 6 March 2012 / Accepted: 7 March 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** The plasma membrane (PM) is a key structure for the survival of cells during dehydration. In this study, we focused on the concomitant changes in survival and in the lateral organization of the PM in yeast strains during desiccation, a natural or technological environmental perturbation that involves transition from a liquid to a solid medium. To evaluate the role of the PM in survival during air-drying, a wild-type yeast strain and an osmotically fragile mutant (*erg6Δ*) were used. The lateral organization of the PM (microdomain distribution) was observed using a fluorescent marker related to a specific green fluorescent protein-labeled membrane protein (Sur7-GFP) after progressive or rapid desiccation. We also evaluated yeast behavior during a model dehydration experiment performed in liquid medium (osmotic stress). For both strains, we observed similar behavior after osmotic and desiccation stresses. In particular, the same lethal magnitude of dehydration and the same lethal kinetic effect were found for both dehydration methods. Thus, yeast survival after progressive air-drying was related to PM reorganization, suggesting the positive contribution of passive lateral rearrangements of the membrane components. This study also showed that the use of glycerol solutions is an efficient means to simulate air-drying desiccation.

**Keywords** Desiccation · Osmotic dehydration · Cell survival · Plasma membrane · Yeast

### Introduction

Microorganism dispersal allows yeasts to colonize new habitats and reach sites where resources favor growth, and enables their survival (Gorbushina and Broughton 2009; Gunde Cimerman et al. 2000; Quispel 1998). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* occupies and flourishes in numerous habitats such as soil, plants, and rocks (Landry et al. 2006). Therefore, it can be found on surfaces constantly subjected to changes in atmospheric conditions with irregular fluctuations of temperature, humidity, and radiation (Gorbushina 2007). Among these stresses, the cell's capacity to resist dehydration and rehydration has been essential for the efficient colonization of terrestrial environments (Tunnacliffe and Lapinski 2003). Moreover, understanding of cellular mechanisms occurring during air-drying desiccation is essential to improve industrial preservation techniques (e.g., ferment, probiotics) (Beker and Rapoport 1987; Meng et al. 2008).

During moderate hydric perturbations (final  $a_w$  value >0.90), yeast cells actively maintain turgor pressure (Klipp et al. 2005). To adjust to such perturbations of the environment and to prevent the resulting loss of cytoplasmic water, microorganisms accumulate intracellular ions, such as  $K^+$ , or organic solutes to reestablish the cell volume and, at the same time, preserve metabolic activities (Brown 1990; Santos and Da Costa 2002). For higher perturbations, no measurable metabolic activity can be detected anymore and only osmotic rules apply. The study of cell survival mechanisms that occur during desiccation, for instance on plants or soil, is scientifically complex to study and observe because of the change

---

G. Lemetais · S. Dupont · L. Beney (✉) · P. Gervais  
Université de Bourgogne/AGROSUP Dijon, UMR Procédés  
Alimentaires et Microbiologiques,  
1 Esplanade Erasme,  
Dijon, France  
e-mail: lbeney@u-bourgogne.fr

G. Lemetais  
Merck Medication Familiale,  
18C boulevard Winston Churchill,  
Dijon, France



from a liquid to a solid state. Thus, many data connecting the structural and functional changes in cells during dehydration stress are available in liquid media with high concentrations of osmolytes (Dupont et al. 2010; Mille et al. 2002; Simonin et al. 2007; Turk et al. 2007). The main results obtained from these approaches show that cell death caused by extreme dehydration and subsequent rehydration is the result of a sequence of plasma membrane (PM) events (Crowe et al. 1984; Ragoonanan et al. 2008; Scherber et al. 2009; Simonin et al. 2007).

The extensive loss of water causes PM condensation and restructuring, with a lipid phase transition (Crowe et al. 1992) and also an increase of the cell surface-to-volume ratio ( $s/v$ ) (Ragoonanan et al. 2008; Wolfe et al. 1986). After rapid osmotic perturbations, invagination and structural instability promote internalization of the PM into the cell cytoplasm and result in a decrease of the cell's surface area. During rehydration and cell reexpansion, this lack of available surface area leads to PM rupture and further lysis of almost the whole cell population. By contrast, cell survival can be maintained after rehydration following more gentle and progressive osmotic perturbations. Recently, the mechanisms behind such cell survival have been identified as entailing lateral PM reorganization, which does not occur during abrupt perturbations (Dupont et al. 2010).

The occurrence of such mechanisms during yeast desiccation in air, which involves a transition from liquid to solid state, has not been demonstrated and experimental data are still lacking. During desiccation, the early stages correspond to the maintenance of cells in a concentrated liquid medium, as in a condition of osmotic stress. However, the subsequent events are more complex because of matrix solidification and the presence of air and particularly oxygen in direct contact with the yeast. Therefore, understanding how reductions in water availability influence the PM's behavior during air-drying desiccation is of great interest in the field of microbial ecology and exobiology.

This work was intended to determine whether the yeast survival mechanisms extensively studied in liquid medium are similar to those that occur during air-drying desiccation. For this, we examined how water limitation and high osmolarity influenced *S. cerevisiae* survival, respectively. Thus, three amplitudes of dehydration, all below the water activity value of 0.90, and two rates of change (kinetics), one rapid and one slow, were used to mimic the various disturbances of the yeast natural environments. To measure the PM damage induced by both dehydration methods, a wild-type and a mutant strain with an osmotically fragile PM (*erg6* $\Delta$ ) were used. Instead of ergosterol, the mutant accumulates molecular precursors and it has already been shown that this strain exhibits lower PM plasticity with a low resistance to deformation and environmental stress (Abe and Hiraki 2009; Rodriguez-Vargas et al. 2007). Moreover, the yeast

PM contains two non-overlapping subcompartments called MCC (an ergosterol-rich membrane compartment of Can1, arginine/ $H^+$ -symporter) and MCP (a membrane compartment occupied by Pma1,  $H^+$ -ATPase protein) (Grossmann et al. 2007). Several proteins, such as Sur7 proteins, are integrated within the MCC microdomains. Under physiological conditions, when fused to green fluorescent protein (GFP), these proteins form microscopically visible patches in the plasma membrane (Malinska et al. 2004). A recent study showed that yeast survival to osmotic dehydration was accompanied by a lateral rearrangement of membrane components through modification of the distribution of specific proteins (Sur7-GFP) (Dupont et al. 2010). Therefore, to understand the role of the PM in the yeast's air-drying response, we focused on the behavior of these proteins, which constitute permanent fluorescent PM markers during desiccation.

## Materials and methods

### Yeast strains and growth conditions

The *S. cerevisiae* strain BY4742 Wild Type (WT) (*MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0*) and *erg6* $\Delta$  mutant (*MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 YMR008c::kanMX4*) (Euroscarf, Frankfurt, Germany) were used in this study. Cells were grown aerobically at 25 °C in 250-mL conical flasks containing 100 mL of Malt Wickerham (MW) modified medium. The MW medium contained 10 g glucose, 3 g pancreatic peptone, 3 g yeast extract, and 1.5 g  $NaH_2PO_4$  (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in 1 L of water-glycerol, and had an osmotic pressure of 1.4 MPa. This osmotic pressure has been recommended for the optimal growth of *S. cerevisiae* (Anand and Brown 1968). For growth, a subculture (1 mL) was transferred into a conical flask containing MW medium. The cultures were placed on a rotary shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NY, USA) at 250 rpm for 24 h and allowed to grow to the early stationary phase. The final population was nearly  $10^8$  cells  $mL^{-1}$ .

### Yeast transformation

Plasmid amplification was carried out in the *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  host, grown at 37 °C in Luria-Bertani medium supplemented with 100  $\mu$ g/mL ampicillin. The *S. cerevisiae* transformants were selected on Yeast Nitrogen Base casa plates (0.67 % Difco yeast nitrogen base without amino acids, 0.5 %  $NH_4Cl$ , 1 % glucose, 0.1 % Difco Bacto Casamino acids, and 1.8 % agar). The strain BY4742 was transformed with the plasmid YIp211SUR7GFP after linearization using *Eco*52I (*SUR7* gene was inserted as a *Hind*III–*Bam*HI fragment) (Grossmann et al. 2007; Dupont



et al. 2010). Strain transformation of *S. cerevisiae* with the linearized YIp211SUR7GFP plasmid was performed using the LiAc method (Ito et al. 1983).

Preparation of binary water–glycerol solutions of different osmotic pressures

Glycerol (Sigma-Aldrich) was the solute used for the hyperosmotic treatments in all experiments. The mass of solute to be added to 1,000 g of distilled water to obtain the desired water activity ( $a_w$ ) was calculated using the Norrish equation (Norrish 1966):

$$a_w = (1 - X_s)e^{-KX_s^2},$$

where  $X_s$  is the molar fraction of the solute and  $K$  is the Norrish coefficient of the solute used to increase the osmotic pressure. For glycerol,  $K=1.16$  (Chirife and Fontan 1980). Osmotic pressure  $\pi$  (Pa) and water activity are related by the following equation:

$$\pi = \frac{RT \ln(a_w)}{\bar{V}_w},$$

where  $R$  is the universal gas constant ( $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$ ),  $T$  the temperature (K), and  $\bar{V}_w$  the partial molar volume of water ( $m^3 \cdot mol^{-1}$ ). The quantities of glycerol were 51 g, 1,063 g, 3,986 g, and 6,654 g for 1,000 g of water to obtain final  $a_w$  values of 0.99, 0.80, 0.45, and 0.30, respectively. Cell suspensions and rehydration solutions were kept in an air-conditioned room at 25 °C. The  $a_w$  values of the solutions and the samples were checked using a dew-point osmometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA).

Osmotic treatments

Three osmotic treatments were used: moderate ( $a_w=0.80$ ), which is slightly higher than that allowing osmoregulation, and two levels of severe ( $a_w=0.45$  and  $a_w=0.30$ ). Culture samples (20 mL) were centrifuged (5 min,  $2,200 \times g$ ), washed twice in the binary water–glycerol mixture ( $a_w=0.99$ ), and the pellets were resuspended in 10 mL of water–glycerol mixture. Growth of cells in the presence of glycerol leads to its uptake into the cytoplasm. Therefore, during osmotic treatments, rapid cell water outflow allows the equilibration of internal and external osmotic pressures and changes in cell volume (Dupont et al. 2011). The level of volume contraction reached after this one-step response remains constant as long as cells are not permeabilized (for at least 1 h after hyperosmotic shock). Thus, by preventing glycerol uptake during glycerol perturbations, the amount of water transfer and the volume contraction reached after dehydration in liquid and gaseous environments were similar. For rapid perturbations (osmotic shock,

$166 \text{ MPa} \cdot s^{-1}$ ), 1-mL aliquots of this suspension were placed in microsample tubes, which were then centrifuged (10 min,  $5,100 \times g$ ) and the supernatant was removed. Hyperosmotic shock was induced by quickly introducing 1 mL of a binary water–glycerol solution (final  $a_w$  values of 0.80, 0.45, and 0.30) to the pellets. For progressive perturbations (osmotic slope,  $0.086 \text{ MPa} \cdot s^{-1}$ ), the external osmotic pressure was increased linearly by slowly adding pure glycerol to an agitated conical flask containing the initial cell suspension at  $a_w=0.99$ ; the glycerol solution was injected using a syringe pump (KD Scientific, Boston, MA, USA). The cells were maintained under hyperosmotic conditions for 1 h before rehydration. For rapid rehydration, the hyperosmotic solution was removed from the microsample tube after centrifugation (10 min,  $5,100 \times g$ ) and 1 mL of the binary water–glycerol solution ( $a_w=0.99$ ) was added abruptly to the cell pellet. Progressive rehydration was performed using successive dilutions in solutions with increasing osmotic pressure to reach  $a_w=0.99$ .

Desiccation

The desiccation chamber consisted of an airtight plastic box with controlled relative humidity (RH). Saturated salt solutions were used to control the average RH inside the box (Greenspan 1977). Samples were placed on a rack above the salt solutions and the area of exposure was kept as large as possible in order to allow free diffusion of water. The chambers were maintained at a temperature of 25 °C and ventilated to increase mass transfer. Three saturated salt solutions ( $CH_3COOK$ ,  $K_2CO_3$ , or  $NaCl$ ) were used to control the water activities to dry samples to obtain  $a_w$  values of 0.30, 0.45, and 0.75. Saturation was assured by mixing a large excess (50 %) of each salt with deionized water. Culture samples (40 mL) were centrifuged for 5 min at  $2,200 \times g$ , washed twice with a  $NaCl$  solution (9 g/L), and the pellets were then resuspended in 10 mL of the binary  $NaCl$  solution ( $a_w=0.99$ ). For the fast treatment (shock), the cultures were harvested by filtration using a Buchner funnel. A thin layer was then deposited on a glass microscope slide and placed in the drying chamber for 1 h. For the progressive treatment (slope), the cultures were also harvested by filtration but they were extruded using a syringe ( $\phi 200 \mu m$ ) forming small filaments, as in industrial processes, and placed in the drying chambers for 1 h. For rapid rehydration, yeast cells were plunged directly into water. Progressive rehydration was performed by placing the glass microscope slides in specific chambers (RH=100 %).

Measurement of yeast viability

Yeast viability was estimated in triplicate using the colony-forming unit (CFU) method. After osmotic dehydration or

air-drying, fully rehydrated cells were serially diluted and the appropriate dilutions were plated on MW medium with 15 g.L<sup>-1</sup> of agar. Colonies were counted after incubation for 36 h at 25 °C and recorded as CFU/mL (liquid medium) or CFU/mL per gram of hydrated paste (gaseous environment).

Microscopy

WT yeast strains expressing Sur7-GFP were observed using a Nikon Eclipse TE 2000 U microscope with a multispectral confocal head (D Eclipse C1). Excitation was performed at 488 nm, and the emission signal was measured between 500 and 545 nm. Images were acquired with a 100× (NA=1.4) Plan Apo oil-immersion objective (Nikon) and collected using EZ-C1 software 3.50 (Nikon). Cells dehydrated in liquid medium were observed as described (Dupont et al. 2010). Dried yeast cells were harvested by filtration, and a thin layer was then deposited on a glass microscope slide and dried progressively (slope) or within a few milliseconds (shock). After dehydration, a drop of mineral oil was placed on the dried yeast, which was covered with a glass slide and subjected to microscopy.

Results

Impact of osmotic and desiccation stress on yeast viability

This study compared cell survival of two yeast strains dehydrated using two different techniques (osmotic dehydration and air-drying desiccation). The kinetics of the dehydration/rehydration phases and the dehydration amplitude were compared between the WT strain, which accumulates

ergosterol in its PM, and the *erg6Δ* mutant, which is a membrane-sensitive strain.

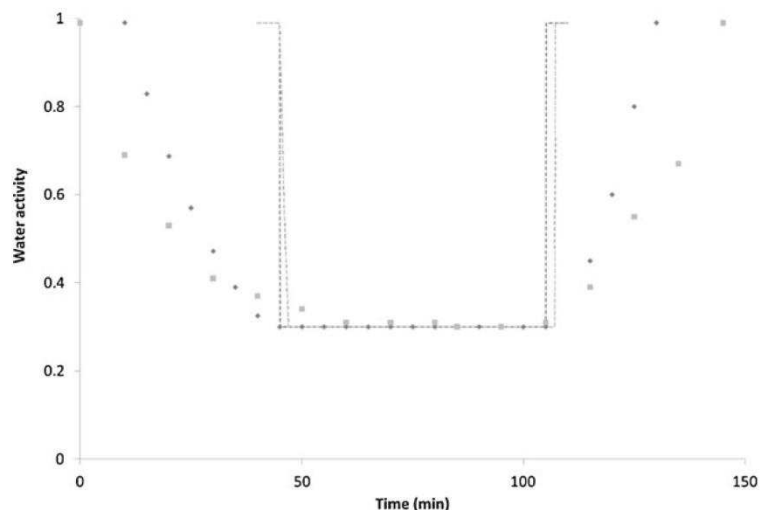
Dehydration and rehydration kinetics

The kinetics of dehydration and rehydration in liquid and gaseous environments are presented in Fig. 1. Very similar values of cell water activity were observed between the two environments, during the dehydration and rehydration steps. The time delay during rehydration in a gaseous environment is due to the gain in moisture of the sample which depends on the transfer of water from the liquid to the air and from the air to the yeast. The results presented in Fig. 2a compare the viability of the WT strain after dehydration and rehydration cycles in liquid and gaseous environments. Progressive or rapid dehydration and progressive or rapid rehydration were tested, generating four possible combinations.

First, for osmotic dehydration and air-drying desiccation, the lowest survival rates were observed when the dehydration and rehydration steps were performed rapidly (0.35 % and 2.80 % survival, respectively, after osmotic and air-drying treatments), whereas the highest survival rates were observed with both techniques after progressive dehydration followed by progressive rehydration (78.7 % and 42.3 %, respectively). The two other treatments that combined a rapid and a progressive step showed intermediate cell survival rates: 19.2 % and 21.6 %, respectively, during osmotic and air-drying treatments after shock–slope cycles, and 42.6 % and 27.5 %, respectively, after slope–shock cycles.

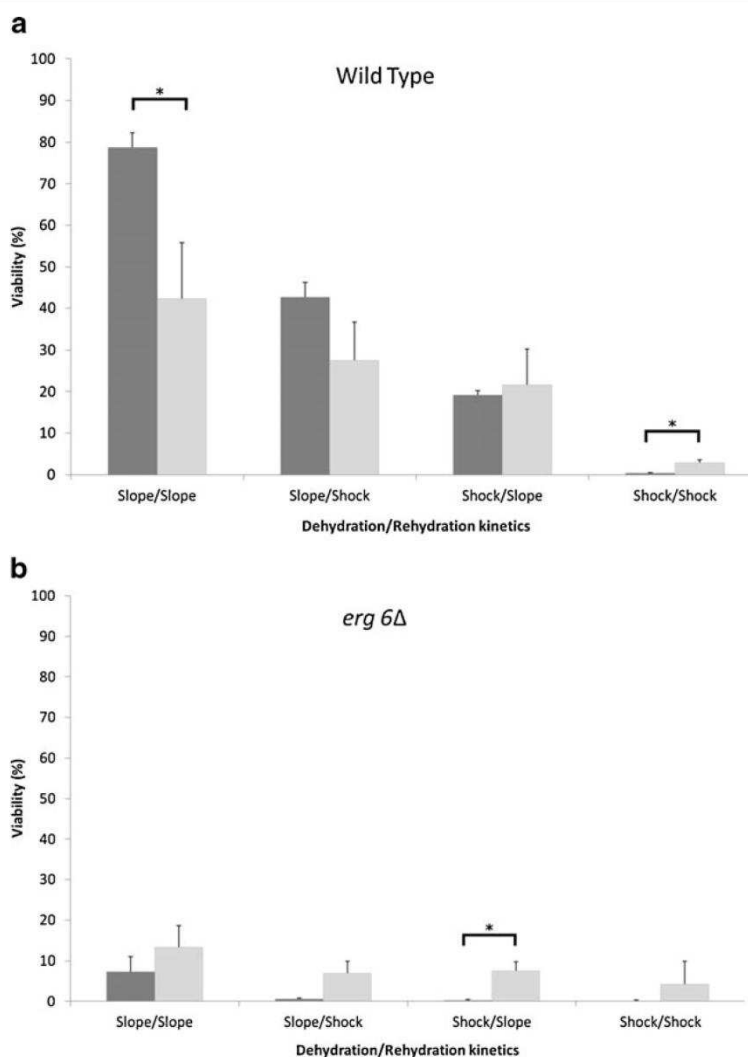
The *erg6Δ* mutant yeast cells were subjected to the same four combinations (Fig. 2b). The viability measures of this strain after treatments in liquid and gaseous environments were, respectively, 3.65 % and 13.2 % after slope–slope,

**Fig. 1** Dehydration and rehydration kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 from 1.4 to 166 MPa during air-drying and osmotic dehydration. Shock (broken lines) or slope (gray squares) air-dried cells and shock (broken lines) or slope (gray diamonds) osmotic dehydration in liquid medium. Temperature and relative humidity were checked with a thermocouple and a humidity data logger





**Fig. 2** Impact of different dehydration and rehydration kinetics on yeast viability. Survival of wild type strain (a) and *erg6Δ* mutant (b) were measured after osmotic treatments in water/glycerol solutions (dark gray bars) or air-drying (light gray bars). In both cases, viability was evaluated using the CFU method. Error bars correspond to the SD calculated from three repeated experiments. Asterisks denote statistical significance (\* $P < 0.05$ )



0.26 % and 6.92 % after slope–shock, 0.16 % and 7.58 % after shock–slope, and 0.30 % and 4.27 % after shock–shock cycles. These results confirm that this strain has a fragile PM that makes it particularly sensitive to osmotic dehydration and air-drying desiccation.

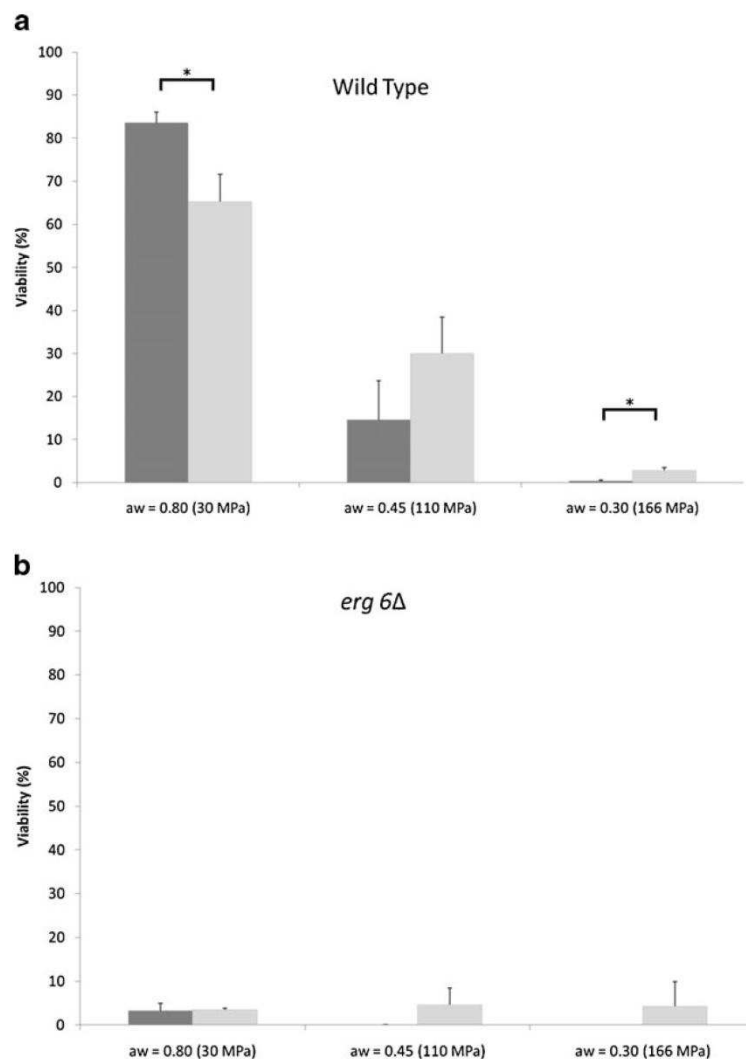
Magnitude of dehydration

For both strains, cells were treated with a shock–shock cycle (water activity of 0.80, 0.45, or 0.30) for 60 min and then rehydrated. Figure 3a presents cell viability of the WT strain after dehydration in liquid medium or in drying chambers. With these treatments, higher viability ratios were observed at  $a_w$  values of 0.80 with 82.5 % and 65.3 % in liquid and gaseous environments, respectively. The viability was, respectively, 12.5 % and 0.35 % after dehydration in liquid

medium and 30.1 % and 2.80 % after air-drying treatments at  $a_w$  values of 0.45 and 0.30. For the WT strain, dehydration in liquid medium or by air-drying led to similar behavior. Moreover, for both techniques, cell viability clearly decreased with decreasing water activity.

Figure 3b shows the cell viability of the *erg6Δ* mutant strain after the same dehydration–rehydration cycles. In this case, the threshold was lower, i.e., there was a stronger impact of the osmotic level on *erg6Δ* destruction than on the WT strain. For the three osmotic pressures tested, viability was between 3.29 % and 0.01 % after shock–shock cycles in liquid medium and between 3.50 % and 4.57 % in a gaseous environment. These results showed that dehydration, in liquid medium or by air-drying, led to low and very low survival rates, respectively. Thus, for *erg6Δ*, all cellular damage preventing cultivability and colonization occurred

**Fig. 3** Impact of different dehydration and rehydration amplitudes (shock–shock cycle) on yeast viability. Survival of wild-type strain (a) and *erg6Δ* mutant (b) were measured after osmotic treatments in water/glycerol (dark gray bars) or air-drying (light gray bars) using the CFU method. Error bars correspond to the SD calculated from three repeated experiments. Asterisks denote statistical significance (\* $P < 0.05$ )



between  $a_w$  values of 0.99 and 0.80. As previously observed with the kinetic effect, the level of dehydration appeared to have no impact on survival rates of this strain.

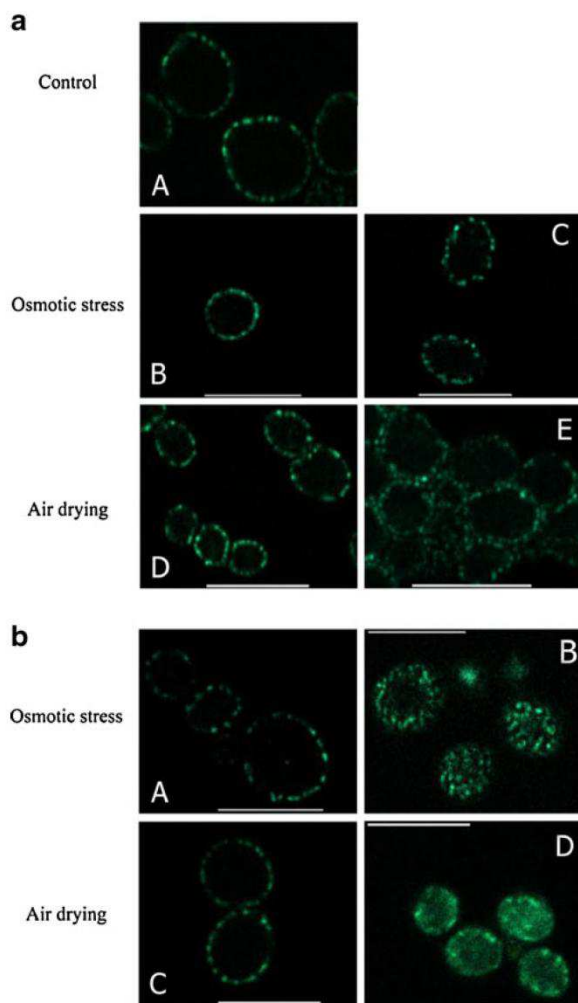
Impact of osmotic and desiccation stress on PM organization

In addition to yeast survival, the PM organization of the WT strain was studied in order to observe whether the mechanisms of cell death/cell survival were the same in liquid and gaseous environments. Thus, the kinetic effect on the lateral organization of the PM through Sur7-GFP localization was studied for each technique, after dehydration and rehydration. The impacts of drying kinetics and the magnitude of dehydration in liquid and gaseous environments were also tested with the transformed WT strain and the results

obtained were similar to those obtained with the non-transformed strain (data not shown).

Lateral PM organization after dehydration

The results presented in Fig. 4a show the lateral organization of the PM after dehydration in liquid and gaseous environments. In the control cells, which were totally hydrated ( $a_w = 0.99$ ), Sur7-GFP proteins were concentrated in discrete patches (Fig. 4a, A). According to the literature, it is possible to observe around 15 GFP areas evenly distributed throughout the PM in yeasts (Dupont et al. 2010; Grossmann et al. 2007). After shock osmotic dehydration (Fig. 4a, C), the distribution of Sur7-GFP microdomains remained in distinct patches as in the control cells, whereas progressive dehydration in liquid medium (Fig. 4a, B) led to



**Fig. 4** Impact of dehydration (a) and rehydration (b) kinetics on Sur7-GFP microdomain distribution in the plasma membrane of transformed WT. Images (a) show control cells (A), cells in liquid medium after progressive (B) or rapid dehydration (C), and cells after progressive (D) or rapid air-drying (E). Images (b) show cells dehydrated in liquid medium after progressive (A) or rapid (B) rehydration and cells dehydrated in gaseous environment after progressive (C) or rapid rehydration (D). Median optical cross-sections of the cells are shown. Scale bar=5 μm

lateral redistribution of Sur7-GFP proteins. In the latter case, there were fewer but larger patches than in the control, suggesting PM reorganization.

After shock air-drying (Fig. 4a, E), the microdomains were still evenly distributed. These results were similar for the control and the yeast shock-dehydrated in liquid medium. After progressive dehydration in a gaseous environment (Fig. 4a, D), several distribution profiles were observed. Few cells showed evenly distributed microdomains, as seen in the controls. Nevertheless, most cells showed more

diffuse Sur7 areas, fewer but larger than in the controls. However, these domains were slightly different, being less extensive from those obtained in liquid medium (Dupont et al. 2010). This might have arisen from the observation technique under oil. Thus, microdomains stayed concentrated in discrete patches after rapid dehydration with both dehydration techniques, whereas the patches were larger and fewer after progressive dehydration suggesting kinetics-dependent PM reorganization.

Lateral PM organization after rehydration

Figure 4b shows lateral organization of the PM after rehydration visualized by Sur7-GFP localization. The effect of rehydration was studied by observation of the cells after dehydration (final  $a_w$  of 0.30) followed by rehydration ( $a_w$  of 0.99). While Sur7-GFP was still mainly confined in the PM after rapid dehydration in liquid or gaseous environments, after a shock–shock cycle, it was localized in the cell cytoplasm and was not observed in the PM either in liquid medium (Fig. 4b, B) or through air-drying (Fig. 4b, D). For both techniques, rapid rehydration resulted in the presence of the protein throughout the cell. This observation could be related to membrane rupture and disorganization of the cytoplasm during rehydration. After slope–slope cycles (Fig. 4b, C), numerous patches of Sur7-GFP were distributed in the PM. After rehydration, the reorganization of the PM in cells dehydrated in liquid medium or by air-drying was similar to the profiles of the control cells.

Discussion

This study was conducted to help understand the role of PM in the yeast survival mechanisms in response to hydric perturbations. For this, the resistance of two yeasts (WT and a membrane sensitive strain) to dehydration in a liquid medium (osmotic stress) or a gaseous environment (osmotic and matric stress) was measured. The effect of the dehydration technique on the lateral organization of the PM through Sur7-GFP localization was then studied. Our main conclusion is that there was similar behavior in liquid and gaseous environments for both yeast strains. Similarities were also found with PM modifications after observation using confocal microscopy. Finally, our results emphasize the major role of kinetics for optimal preservation of yeast cells during air-drying desiccation.

Similar yeast survival during osmotic dehydration and air-drying desiccation

For the WT strain, viability depended on the lowering rate of water activity with both methods of dehydration (Fig. 2a). A



comparison of yeast viability after shock–slope and slope–shock cycles showed the importance of controlling dehydration and rehydration kinetics to enhance yeast survival (Rodríguez-Porrata et al. 2008). As in liquid medium, the choice of optimal drying kinetics (progressive dehydration and rehydration) improved cell preservation. The largest difference between osmotic dehydration and air-drying desiccation (78.7 % and 42.3 %, respectively) was observed after the slope–slope cycle and can be explained by the more complex phenomena occurring during air-drying desiccation (Fig. 2a). Indeed, authors have reported in *S. cerevisiae* that drying leads to an increase in the intracellular level of malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation (Pereira et al. 2003). It has also recently been shown that cell oxidation levels increase significantly during air-drying desiccation (Garre et al. 2010). Therefore, the difference in yeast resistance between air-drying and osmotic dehydration might be associated with cell oxidation during the transition to an aerobic phase (França et al. 2007; Teixeira et al. 1996). Nevertheless, although the survival rates are slightly different, the general behavior of the strains is the same after osmotic dehydration and air-drying desiccation. Indeed, we can observe the same kinetic behavior (Fig. 2a) and the same decrease in viability with increasing osmotic magnitude (Fig. 3a), showing the importance of the mechanical component. Consequently, both effects (mechanical constraint and oxidative stress) exist but with different impacts on the yeast survival rate. Thus, oxidative stress has a minor effect compared to mechanical stress, certainly because the yeast *S. cerevisiae* can activate a broad response involving several defense mechanisms (enzymes, low molecular mass antioxidants) (Estruch 2000; Herdeiro et al. 2006; Landolfo et al. 2010).

After dehydration with moderate shock, cell survival remained relatively high in liquid and gaseous environments (82.5 % and 65.3 %, respectively), showing a limited kinetic effect at high water activity values (Fig. 3a). At an  $a_w$  of 0.80, cell growth and metabolism stopped but the viability was mainly preserved, whereas dehydration attaining water activities of 0.45 or 0.30 resulted in important cell destruction in both liquid and gaseous environments. This may be because of the membrane lipid phase transition from liquid crystalline to gel during dehydration and from gel to liquid during rehydration, which occurs between  $a_w$  values of 0.80 and 0.45 (Beker and Rapoport 1987). Authors showed in dry pollen that the transition from gel to liquid crystalline in membrane phospholipids that accompanies rehydration is the main cause of permeabilization and cell leakage (Crowe et al. 1989). A more recent study, conducted in liquid medium, showed that inappropriate kinetics or high levels of stress can cause cell death (Dupont et al. 2010). Indeed, rapid dehydration causes contraction of the yeast PM with progressive internalization leading to a reduction

of the PM surface area during dehydration and lysis of the cells because of a lack of surface area during shock rehydration. Conversely, if the PM has time to reorganize, the yeast's survival is better. This might be associated with the slowness of lyotropic chain-disordering phenomena (Milhaud 2004). Indeed, the redistribution of water molecules between the different parts of the sample could be a question of time. Moreover, the use of slow kinetics could allow the synthesis of protectants in the early stages of air-drying (Ratnakumar et al. 2011). However, the results obtained with the mutant strain suggest that the maintenance of PM integrity is the main parameter determining survival during air-drying desiccation. Indeed, the dehydration and rehydration kinetics had no impact on *erg6Δ* cell viability after osmotic and desiccation stress (Fig. 2b). The magnitude of dehydration also had no impact (Fig. 3b). It has already been shown that this strain, with a deleted *ERG6* gene, is very sensitive to osmotic disturbances due to changes of PM mechanical properties (Dupont et al. 2011). Indeed, the nature of the membrane sterols governs the mechanical behavior of the PM during osmotic perturbation. These results also underline the importance of the mechanical constraint during air-drying desiccation. Thus, volume contraction resulting from the release of water—similar in liquid and gaseous environments—completely destabilizes the cells and determines their death at all the magnitudes and rates of dehydration tested (Simonin et al. 2007). Finally, the use of *erg6Δ* underlines how the yeast's PM composition, in particular the sterol composition, is essential for the survival of *S. cerevisiae* at the solid–liquid interface, where hydration is often subjected to instability.

#### Implication of the PM in yeast drying tolerance

To understand desiccation survival mechanisms at the atmosphere–lithosphere interface, the lateral organization of the PM through Sur7-GFP localization was studied for both dehydration methods on the WT strain. A microscopy technique under oil was used to maintain the effects of air-drying desiccation during observation. A redistribution of Sur7-GFP was observed after progressive disturbance in liquid and gaseous environments (Fig. 4a, B, D). These observations were accompanied by significant yeast survival (Fig. 2a) and might be linked with PM rearrangement during the lipid phase transition. The mechanisms responsible for cell resistance were perhaps not exactly identical but in both cases, they resulted in yeast survival (Figs. 2a and 4b, A, C). Observation of the Sur7-GFP distribution after shock–shock cycles revealed similar behavior after dehydration (Fig. 4a, C, E) and after rehydration (Fig. 4b, B, D) in both liquid and gaseous environments. Patches were distributed as in the controls on quickly dried cells, revealing that these proteins were not internalized during the first phase of



drying. After rehydration, cells showed a single cluster of Sur7-GFP, indicative of a cell bursting during rehydration, as obtained in liquid medium.

Whether in the case of cell death or survival, these results suggest similar mechanisms during desiccation to those already observed during dehydration in liquid medium, with similar PM behavior. During air-drying, the PM is a key structure in cell survival. Moreover, the cells had the same volume before dehydration and the yeast response was similar when the osmotic gradient was obtained in liquid or gaseous environments. Therefore, both dehydration strategies induced an accumulation of intracellular glycerol. Results from the WT and *erg6*Δ mutant strains showed that the mechanical component was the main stress experienced by the yeasts during hydric perturbations of their environment. For adapted microorganisms, such as the WT strain, slow kinetics seem to be essential in permitting partial disorganization of the PM, then survival and colonization.

In conclusion, for each of the two tested strains, survival rates were closed for air-drying desiccation and osmotic dehydration. There were similar patterns of PM disorganization and reorganization during progressive kinetics and preservation of the Sur7-GFP distribution and cell death after rapid kinetics. Therefore, the PM appears to be the main target of dehydration treatments and its slow lateral reorganization allows cell survival. Moreover, observation of dried cells under oil immersion optics is an interesting approach that could be used to stain other cellular structures and allow them to be studied in poorly hydrated conditions. The dehydration techniques used in this study, by addition of a solute (osmotic stress) and by elimination of water (osmotic and matric stress), were different in terms of molecular diffusion, matrix solidification, and cellular environment. Indeed, in the first case, cells were constantly surrounded by liquid and protected from the harmful effects of activated oxygen molecules. In the second case, as water flowed out, the different cellular structures were gradually exposed to air. Thus, if free radical production caused by hydric perturbation exists in liquid and gaseous environments (Petrovic 2006), yeasts are more exposed to oxidative stress associated with gaseous oxygen (singlet oxygen) during air-drying desiccation (Piette 1991). Although we observed a greater destructive effect in the case of air-drying desiccation, yeast survival, depending on the kinetics or amplitude, changed in parallel for both types of dehydration (glycerol and air-drying). Therefore, these results could be explained by the predominance of the mechanical dehydration component and modification of the PM surface area for both strains of yeast. This work allows proposing a hypothesis on the similar cellular behavior during dehydration in liquid medium and during air-drying desiccation. Thus, dehydration in liquid medium represents a convenient method for studying yeast survival mechanisms during air-drying

caused by natural fluctuations in the level of hydration. We plan to test other yeast mutants more sensitive to oxidative stress.

**Acknowledgments** We are grateful to W. Tanner and G. Grossmann (University of Regensburg, Cell Biology and Plant Physiology, Regensburg, Germany) for providing the plasmid YIp211SUR7GFP. We thank the personnel of the Plateau Technique "Imagerie Spectroscopique" IFR 92 (Université de Bourgogne, Dijon, France). This work was supported by French Ministry of Research, the Regional Council of Burgundy, Merck MF (Dijon, France), and the "FUI Probiotique" program supported by Vitagora (Dijon, France).

## References

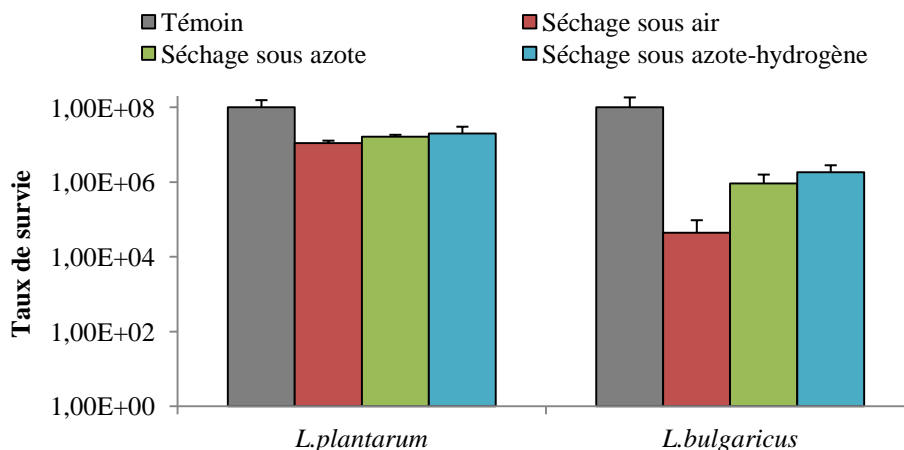
- Abe F, Hiraki T (2009) Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1788:743–752
- Anand JC, Brown AD (1968) Growth rate patterns of the so-called osmophilic and non-osmophilic yeasts in solutions of polyethylene glycol. *Microbiology* 52:205
- Beker M, Rapoport A (1987) Conservation of yeasts by dehydration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 35:127–171
- Brown A (1990) Microbial water stress physiology. Principles and perspectives. Wiley, New York
- Chirife J, Fontan CF (1980) A study of the water activity lowering behavior of polyethylene glycols in the intermediate moisture range. *J Food Sci* 45:1717–1719
- Crowe JH, Crowe LM, Chapman D (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223:701–703
- Crowe J, Hoekstra F, Crowe L (1989) Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in dry pollen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:520
- Crowe J, Hoekstra F, Crowe L (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54:579–599
- Dupont S, Beney L, Ritt JF, Lherminier J, Gervais P (2010) Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim Biophys Acta* 1798:975–985
- Dupont S, Beney L, Ferreira T, Gervais P (2011) Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim Biophys Acta* 1808:1520–1528
- Estruch F (2000) Stress controlled transcription factors, stress induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 24:469–486
- França MB, Panek AD, Eleutherio ECA (2007) Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp Biochem Physiol A* 146:621–631
- Garre E, Raginel F, Palacios A, Julien A, Matallana E (2010) Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. *Int J Food Microbiol* 136:295–303
- Gorbushina AA (2007) Life on the rocks. *Environ Microbiol* 9:1613–1631
- Gorbushina AA, Broughton WJ (2009) Microbiology of the atmosphere–rock interface: how biological interactions and physical stresses modulate a sophisticated microbial ecosystem. *Annu Rev Microbiol* 63:431–450
- Greenspan L (1977) Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J Res Natl Bur Stand* 81a:89–96
- Grossmann G, Opekarová M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W (2007) Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J* 26:1–8

- Gunde Cimerman N, Zalar P, Hoog S, Plemenitaš A (2000) Hypersaline waters in salters–natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol Ecol* 32:235–240
- Herdeiro R, Pereira M, Panek A, Eleutherio E (2006) Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1760:340–346
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153:163–168
- Klipp E, Nordlander B, Krüger R, Gennemark P, Hohmann S (2005) Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nat Biotechnol* 23:975–982
- Landolfo S, Zara G, Zara S, Budroni M, Ciani M, Mannazzu I (2010) Oleic acid and ergosterol supplementation mitigates oxidative stress in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* 141:229–235
- Landry CR, Townsend JP, Hartl DL, Cavalieri D (2006) Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Ecol* 15:575–591
- Malinska K, Malinsky J, Opekarova M, Tanner W (2004) Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *J Cell Sci* 117:6031–6041
- Meng XC, Stanton C, Fitzgerald GF, Daly C, Ross RP (2008) Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem* 106:1406–1416
- Milhaud J (2004) New insights into water–phospholipid model membrane interactions. *Biochim Biophys Acta* 1663:19–51
- Mille Y, Beney L, Gervais P (2002) Viability of *Escherichia coli* after combined osmotic and thermal treatment: a plasma membrane implication. *Biochim Biophys Acta* 1567:41–48
- Norrish RS (1966) An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionery syrups. *Int J Food Sci Technol* 1:25–39
- Pereira E, Panek AD, Eleutherio ECA (2003) Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress Chaperones* 8:120–124
- Petrovic U (2006) Role of oxidative stress in the extremely salt-tolerant yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Yeast Res* 6:816–822
- Piette J (1991) New trends in photobiology: biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. *J Photochem Photobiol B Biol* 11:241–260
- Quispel A (1998) Lourens GM Baas Becking (1895–1963). Inspirator for many (micro) biologists. *Int Microbiol* 1:69–72
- Ragoonanan V, Malsam J, Bond DR, Aksan A (2008) Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*. *Biochim Biophys Acta* 1778:2283–2290
- Ratnakumar S, Hesketh A, Gkargkas K, Wilson M, Rash BM, Hayes A, Tunnacliffe A, Oliver SG (2011) Phenomic and transcriptomic analyses reveal that autophagy plays a major role in desiccation tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biosyst* 7:139–149
- Rodriguez-Porrata B, Novo M, Guillamón J, Rozes N, Mas A, Otero RC (2008) Vitality enhancement of the rehydrated active dry wine yeast. *Int J Food Microbiol* 126:116–122
- Rodriguez-Vargas S, Sanchez-Garcia A, Martinez-Rivas J, Prieto J, Randez-Gil F (2007) Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Appl Environ Microbiol* 73:110–116
- Santos H, Da Costa MS (2002) Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ Microbiol* 4:501–509
- Scherber C, Schottel J, Aksan A (2009) Membrane phase behavior of *Escherichia coli* during desiccation, rehydration, and growth recovery. *Biochim Biophys Acta* 1788:2427–2435
- Simonin H, Beney L, Gervais P (2007) Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: mechanisms of cell death. *Biochim Biophys Acta* 1768:1600–1610
- Teixeira P, Castro H, Kirby R (1996) Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Lett Appl Microbiol* 22:34–38
- Tunnacliffe A, Lapinski J (2003) Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Phil Trans R Soc Lond* 358:1755–1771
- Turk M, Abramovi Z, Plemenitaš A, Gunde Cimerman N (2007) Salt stress and plasma membrane fluidity in selected extremophilic yeasts and yeast like fungi. *FEMS Yeast Res* 7:550–557
- Wolfe J, Dowgert MF, Steponkus PL (1986) Mechanical study of the deformation and rupture of the plasma membranes of protoplasts during osmotic expansions. *J Membr Biol* 93:63–74



### 1.1.3.2. Etude du stress oxydant induit lors du séchage

Le second stress engendré par le séchage est le stress oxydant. A l'heure actuelle, plusieurs équipes s'intéressent à l'oxydation induite par le séchage mais les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore totalement élucidés (França et al. 2007). Dans cette étude, nous avons d'abord mesuré le taux de survie des bactéries *L. plantarum* et *L. bulgaricus* à un séchage dans une enceinte contenant de l'air, de l'azote ou un mélange gazeux d'azote-hydrogène (95,5%-4,5%). En présence d'une source d'énergie, l'oxygène dans l'enceinte de séchage pouvait former de l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), une molécule particulièrement létale pour les cellules (Piette 1991). Sans énergie ou en présence d'azote, la formation l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) est limitée mais les cellules peuvent toujours s'oxyder s'il y a formation d'espèces réactives par gain d'électrons. Enfin, l'azote-hydrogène est un mélange gazeux réducteur qui empêche la formation des radicaux libres. La Figure 38 présente le taux de survie des souches *L. plantarum* et *L. bulgaricus* à un séchage sous différentes ambiances gazeuses.



**Figure 38:** Taux de survie des souches *L. plantarum* et *L. bulgaricus* après séchage. Les cellules ont été séchées sur couche mince, dans des enceintes de séchage ventilées contenant une solution saline saturée (HR = 23%) stockées pendant 1h et réhydratées dans du PBS. Trois gaz ont été utilisés pour sécher les cellules, de l'air (■), de l'azote (■) ou un mélange azote-hydrogène (■).

Pour la souche *L. plantarum*, les résultats montrent peu de différences entre les différents séchages. Le taux de survie passe ainsi de  $1,1 \cdot 10^7$  lors d'un séchage sous air à  $2,0 \cdot 10^7$  lors d'un séchage sous  $\text{H}_2\text{-N}_2$ . Ces résultats peuvent s'expliquer par la bonne résistance de *L. plantarum* au stress oxydant. Pour cette bactérie, le stress oxydant a un impact faible sur le taux de survie et la mort des cellules a pour origine l'effet mécanique. Pour la souche *L. bulgaricus*, on observe un taux de survie faible lors du séchage sous air ( $4,4 \cdot 10^4$ ), une viabilité intermédiaire lors d'un séchage sous azote ( $9,3 \cdot 10^5$ ) et un meilleur taux de survie

lors d'un séchage sous  $H_2N_2$  ( $1,9 \times 10^6$ ). Pour cette bactérie, le stress mécanique est majoritaire mais le stress oxydant est également létale pour les cellules puisque le taux de survie augmente de près de 2 log lors d'un séchage sous  $H_2N_2$ . Cependant, en quantité de cellules, le nombre de bactéries touchées par le stress oxydant du séchage est moins important pour *L. bulgaricus*. La différence de viabilité observée entre un séchage sous azote et un séchage sous azote-hydrogène démontre que malgré l'absence d'oxygène dans l'enceinte les cellules peuvent toujours s'oxyder. Cela laisse supposer une oxydation interne des cellules.

Les résultats en présence de gaz réducteur indiquent que le stress oxydant du séchage possède un impact sur le taux de survie, même s'il est inférieur à l'effet mécanique.

#### 1.1.4. Discussion

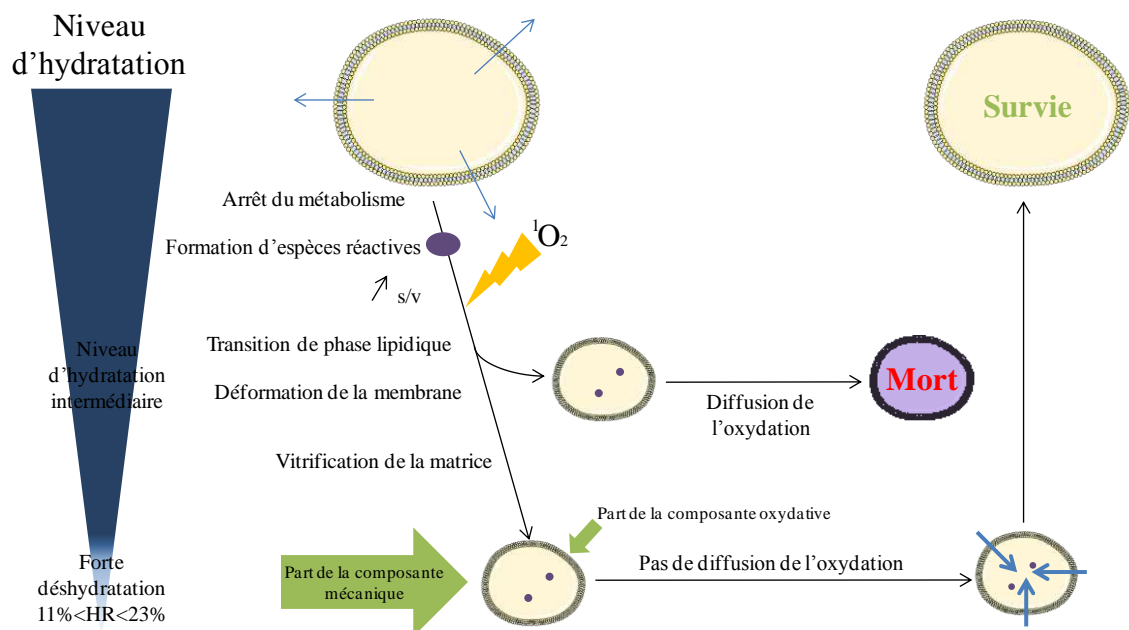
Dans cette étude, nous avons observé que le séchage induisait simultanément un stress mécanique et un stress oxydant pour les cellules.

Concernant le stress mécanique, cette étude montre un effet de la cinétique et de l'intensité du séchage sur le taux de survie. Nous avons observé chez la levure que le comportement observé lors du séchage était similaire à celui observé en milieu liquide, avec un rôle prépondérant de la membrane dans la survie. D'autres auteurs avaient déjà montré un impact fort de la cinétique sur la survie des cellules à une déshydratation en milieu liquide (Dupont et al. 2010; Poirier et al. 1997). Les résultats obtenus mettent en évidence que la cinétique joue sur le taux de survie en affectant les phénomènes de réorganisation membranaire. L'utilisation d'adjuvants de séchage comme le tréhalose permet d'améliorer la survie en stabilisant la membrane et les autres structures cellulaires. L'efficacité du tréhalose est reliée à sa haute température de transition vitreuse (Crowe et al. 1996) mais aussi à une diminution de la température de transition de phase lipidique et une stabilisation des protéines à l'état sec (Leslie et al. 1995). Pour la première fois, nous avons établi ici un parallèle entre une déshydratation en milieu liquide et un séchage en milieu aérien.

Concernant le stress oxydant, le séchage entraîne une accumulation de radicaux libres dès les premières étapes de déshydratation, peut-être à cause de l'arrêt du métabolisme cellulaire (França et al. 2007). Si la mort des cellules a pour origine majoritaire l'effet mécanique (90%-99%), une partie des cellules est altérée par le stress oxydant. Pour la première fois, nous mettons en évidence qu'il existe une cause externe et une cause interne à l'oxydation des cellules lors du séchage. L'oxydation possède une origine externe due à la présence d'oxygène dans l'environnement qui peut former l'oxygène singulet (Piette 1991) et une



origine interne due à la formation de radicaux libres (Chang et al. 2009). Ces radicaux libres apparaissent tôt et leur nombre reste constant. Une étude récente a observé une induction des gènes *TRR1* et *GRX5*, codant pour des systèmes de défenses antioxydants, lors du séchage de levures en lit fluidisé (Garre et al. 2010). Les résultats semblent indiquer une apparition rapide du stress oxydant, à un niveau d' $a_w$  où le métabolisme existe encore. De plus, ce stress va avoir pour conséquence une augmentation du niveau de MDA, un produit de la peroxydation lipidique. Ces résultats appuient par d'autres études (Pereira et al. 2003). Ainsi, les radicaux libres vont détruire une partie des cellules mais aussi rester présents dans les cellules revivifiables. Lors du stockage à de trop hautes valeurs d'hydratation, l'oxydation peut diffuser et altérer une grande quantité de cellules. Teixeira et al., montrent une diminution parallèle du taux de survie et du ratio lipidiques insaturé/saturé (Teixeira et al. 1996). A contrario, de faibles valeurs d'hydratation (11%-23%) maintiennent un taux de survie constant dans le temps. Il faudrait réaliser une estimation du niveau de peroxydation lipidique et du niveau d'oxydation protéique pour mieux comprendre les structures directement affectées par cette oxydation.



**Figure 39:** Représentation schématique des mécanismes mis en jeu lors du séchage

On observe également un meilleur taux de survie lorsque les bactéries sont réhydratées à 37 °C en présence de milieu de culture. Dans notre cas, l'ajout de composé nutritif dans la matrice du complément alimentaire permettrait d'améliorer la survie lors de la réhydratation dans le tractus digestif.

## 1.2. Effet du procédé de séchage sur la fonctionnalité cellulaire

Selon la définition actuellement reconnue, une bactérie probiotique doit être consommée vivante. Cependant, si la notion de viabilité est importante, il est indispensable que les micro-organismes arrivent fonctionnels dans l'organisme. Le séchage est un procédé qui peut potentiellement altérer la viabilité et la fonctionnalité des cellules. A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées aux conséquences du séchage sur la fonctionnalité. Une des plus récente montre que toutes les formes commercialisées de la souche *L. rhamnosus* GG n'expriment pas la même fonctionnalité (Grzeskowiak et al. 2011).

### 1.2.1. Impact d'un cycle de séchage complet

Cette partie du travail a fait l'objet d'une publication intitulée "*Dehydration strongly impacts the probiotic functionality*". Cette publication est actuellement en cours de soumission.

L'objectif de cette étude est de déterminer l'impact réel du procédé de séchage sur la viabilité et la fonctionnalité microbienne. Pour cela, trois micro-organismes probiotiques ont été sélectionnés (*L. plantarum*, *L. zaeae* et *B. bifidum*) et séchés par lyophilisation, par atomisation et sur couche mince. Le taux de survie des souches a été mesuré par cultivabilité sur milieu gélosé. Les caractéristiques fonctionnelles (intégrité membranaire, activité enzymatique et capacité de division) ainsi que le potentiel probiotique (adhésion, effet immuno-modulateur) ont également été évalués avant et après séchage.

Les résultats montrent un effet important du séchage sur la fonctionnalité des cellules. L'impact du procédé est dépendant de la souche et n'est pas directement lié au taux de survie des cellules. Ainsi, le taux de survie de la souche *B. bifidum* à la lyophilisation, au séchage sur couche mince et à l'atomisation est respectivement de 30%, 1% et 8% et le potentiel immuno-modulateur est modifié de la même façon pour les trois traitements (ratio IL-12/IL-10 divisé par 6). A contrario, la viabilité de souche *L. zaeae* est fortement altérée après séchage (respectivement 0,6%, 0,4% et 3% après lyophilisation, séchage sur couche mince et atomisation) mais la fonctionnalité est préservée après lyophilisation et séchage sur couche mince. Les résultats montrent également une modification de l'hydrophobicité de surface lors du séchage, et même une augmentation lors d'un séchage sur couche mince. Ce travail met en évidence le fait qu'il existe des conditions de déshydratation spécifiquement adaptées pour maintenir, ou améliorer, la fonctionnalité des bactéries probiotiques.

## Dehydration strongly affects probiotic functionality

Guillaume Lemetais, Noura Kechaou, Florian Chain, Philippe Langella, Patrick Gervais and Laurent Beney

---

**Abstract:** We investigated whether cell preservation strategies, namely freeze-drying, air-drying, and spray-drying, can modify the functionalities of three probiotic strains, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus zaeae*, and *Bifidobacterium bifidum*. In addition to their survival rates, we compared the capacities of these bacteria to interact with other cells (immunomodulatory effect), adhere (hydrophobicity), and colonize new environments (growth recovery) before and after drying–rewetting. Their membrane integrity and enzymatic activity were determined using fluorescent probes. Our results show that the cell properties were strongly modified by manufacturing processes and that these variations were not directly related to survival. The viability of the *L. plantarum* and *B. bifidum* strains was better preserved by freeze-drying, whereas *L. zaeae* was sensitive to all dehydration techniques. Bacterial incubation with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) displayed important differences in PBMC cytokine expression after the freeze-drying, air-drying, or spray-drying of *B. bifidum* or after the spray-drying of *L. zaeae*. Cell functionalities, such as enzymatic activity and growth recovery, were also strongly affected by air-drying, whereas spray-drying altered cell adherence. The finding that air-drying improved cell adherence indicates that processing can also positively modify bacterial properties. Our findings demonstrate that manufacturing processes strongly affect bacterial cell functionalities and can be used to enhance or abolish some probiotic properties. Therefore, the appropriateness of each processing technique appears to depend on the subsequent use of the strain.

---

## Introduction

The human microbiota has come to be recognized as a complex ecosystem that includes a wide variety of microbial strains (Backhed et al. 2005; Rajilić-Stojanović et al. 2007). These microorganisms can influence the host physiology, such as the digestion of food and the development and regulation of the immune system. The development of the probiotic concept has led to the selection of microorganisms that have a positive effect on health (Ebel et al. 2012; FAO/WHO 2002). Currently, although the mechanisms of action of probiotic bacteria remain unclear, it seems that these microorganisms can interact with host cells through microbe-associated molecular patterns located on the cell surface (Fernandez et al. 2011; Lebeer et al. 2012; Lebeer et al. 2010) and in the bacterial DNA (Hemmi et al. 2000; Wagner 2002) or by synthesizing specific solutes (Gilad et al. 2011; Sokol et al. 2008). The adhesion properties of probiotic strains to intestinal epithelial cells are also linked to the bacterial surface properties (e.g., hydrophobicity and surface potential) (Deepika et al. 2009).

The use of probiotics in clinical trials, for the production of the functional ingredients of food, or in pharmaceutical applications requires stabilization strategies (Jankovic et al. 2010). However, industrial manufacturing processes can significantly alter the structural and functional properties of microorganisms (Meng et al. 2008). Probiotic bacteria are usually stabilized by freeze-drying. Preservation by drying involves the transition from a liquid to a solid medium, in which the cellular reactions are significantly slowed.

Part of the water in cells interacts directly with macromolecules and maintains the structural stability of lipids, proteins, and DNA (Ball 2008). However, the dehydration process removes a large quantity of intracellular water, which can alter these cellular structures and induce cell death. If bacterial survival is always measured after dehydration stress, the cell functionality is rarely considered. However, the survival of probiotic strains does not necessarily imply the presence of beneficial effects and cells that cannot be cultured do not necessarily lack positive activities (van Baarlen et al. 2009). In some cases, probiotic bacteria must be alive to exert their beneficial effects. Kaila et al. (1995) showed that viable *Lactobacillus rhamnosus* GG enhanced the immunoglobulin A antibody response to rotavirus more than heat-inactivated cells did. In other cases, nonculturable and even nonviable cells can be functional. Therefore, some microorganisms can withstand stress and retain

the properties of viable bacteria, but lose their ability to grow on solid medium (Lahtinen et al. 2008; Trevors 2012). Other authors have shown that strain *L. rhamnosus* GG, heat-inactivated (Zhang et al. 2005) or killed with UV irradiation (Lopez et al. 2008), had similar immunomodulatory effects to live cells. Therefore, it is reasonable to investigate the real impact of the drying process on cell functionalities.

Cellular structures at the origin of probiotic functionality are also those affected by drying process. Thus, the membrane has often been described as the main target of cell injury during hydric perturbation (Crowe and Crowe 1984; Leslie et al. 1995; Ragoonanan et al. 2008). The extensive loss of water causes an increase in the cell surface-to-volume ratio (s/v), leading to membrane deformation, such as invagination. Studies of yeast have shown that the kinetics of rapid dehydration and rehydration involve membrane permeabilization and cell death (Dupont et al. 2010; Lemetais et al. 2012). Moreover, a reduction in water activity is characterized by the lyotropic transition from the liquid crystalline phase to the gel phase (Milhaud 2004). Water removal can also induce protein denaturation or aggregation, with a loss of biological activity upon rehydration (Prestrelski et al. 1993; Roy and Gupta 2004). The dehydration process reduces the hydrogen bonds between proteins and water molecules, which can lead to structural transitions in proteins (Chang and Pikal 2009; Dong et al. 1995). The cell envelope is also a site of damage in bacteria during drying (Santivarangkna et al. 2007b). Finally, dehydration stress induces the intracellular accumulation of reactive oxygen species (França et al. 2007), leading to the damage of cell proteins, lipids, RNA, and DNA (Imlay 2003).

At the functional level, drying is associated with an increase in the lag time and a change in the zeta potential (Tymczyzszyn et al. 2007a). Fourier transform infrared spectroscopy experiments have shown modifications to the cell membrane, DNA/RNA, and the cell wall during drying (Santivarangkna et al. 2007b). A recent paper compared the probiotic properties of seven strains of *L. rhamnosus* GG isolated from dried commercial products (Grzeskowiak et al. 2011). The results showed that different isolates of the same strain can have dissimilar probiotic properties. The manufacturing process induces significant changes in the probiotic inhibition or competition with pathogenic bacteria for adhesion to the colonic mucus.

In this study, we investigated the impact of freeze-drying, air-drying, and spray-drying on the cell functionalities of three bacterial species (*Lactobacillus*

*plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, and *Lactobacillus zeae*). The study was performed without additives in an attempt to understand the mechanisms involved during drying. In addition to survival, we evaluated the effects of drying on the cells' immunomodulatory effects, bacterial surface properties, and ability to colonize new habitats. Flow cytometry was used to investigate the changes in cell membrane permeability and enzymatic activity induced by the stabilization processes.

## Materials and methods

**Microorganisms and culture conditions.** The strains *L. plantarum* CNRZ 1997 and *L. zeae* CNRZ 2268 were obtained from the INRA collection, and *B. bifidum* CIP 56.7 from the Pasteur Institute Collection (CIP, Paris, France). Stock cultures were prepared and subsequently stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cells from the thawed stock cultures were inoculated into 10 mL of de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth medium (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) for *L. plantarum* and *L. zeae* or into 10 mL of mMRS broth medium (MRS supplemented with 0.05% cysteine [wt/vol]) for *B. bifidum*. The cultures were incubated overnight and used to inoculate 100 mL of their respective media. The flasks were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  under static conditions and the optical density at 600 nm was monitored with a Jasco V530 fluorescence spectrophotometer (Jasco Corporation, Tokyo, Japan). The cell suspensions were washed twice by centrifugation and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) to an optical density ( $\text{OD}_{600}$ ) of 1.0.

**Spray-drying.** Cells were spray-dried in a pilot-scale apparatus (Mini Spray Dryer B-290, Buchi, Switzerland) with a dehumidifier for inlet air conditioning. The outlet air temperature was  $70^{\circ}\text{C}$ , the inlet air temperature was  $145^{\circ}\text{C}$ , and the atomizing air pressure was 6 bar. The powder was then collected in a single cyclone separator.

**Freeze-drying.** Microorganisms were freeze-dried for 20 h in a single-chamber freeze-drier (Heto PowerDry PL6000, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) at a condenser temperature of  $-55^{\circ}\text{C}$  and a chamber pressure of 0.05 mbar.

**Air-drying.** Cells were air-dried in an environmental drying chamber. A saturated salt solution of  $\text{MgCl}_2$  was used to control the average relative humidity inside the box (Greenspan 1977). Drops (10  $\mu\text{L}$ ) of the samples were deposited into glass cups on a rack above the salt solution and the area of exposure was kept as large as possible to allow the free diffusion of water. The chambers were maintained at  $25^{\circ}\text{C}$  and ventilated to increase the mass transfer.

All the dried samples were rapidly rehydrated with PBS at  $25^{\circ}\text{C}$ . The final water activity of the dried microorganisms was checked with a dew-point osmometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA).

**Bacterial enumeration.** *B. bifidum*, *L. plantarum*, and *L. zeae* were serially diluted in PBS buffer and spiroplated using an Eddy Jet (IUL Instruments, Barcelona, Spain) on mMRS agar (*B. bifidum*) or MRS agar (*L. plantarum* and *L. zeae*). The plates were then incubated under anaerobic conditions (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Germany) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 48 h. The colonies were counted with a CounterMat Flash colony counter (IUL Instruments).

**Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation and stimulation.** PBMCs were isolated from the peripheral blood of healthy donors, as described previously (Foligne et al. 2007).

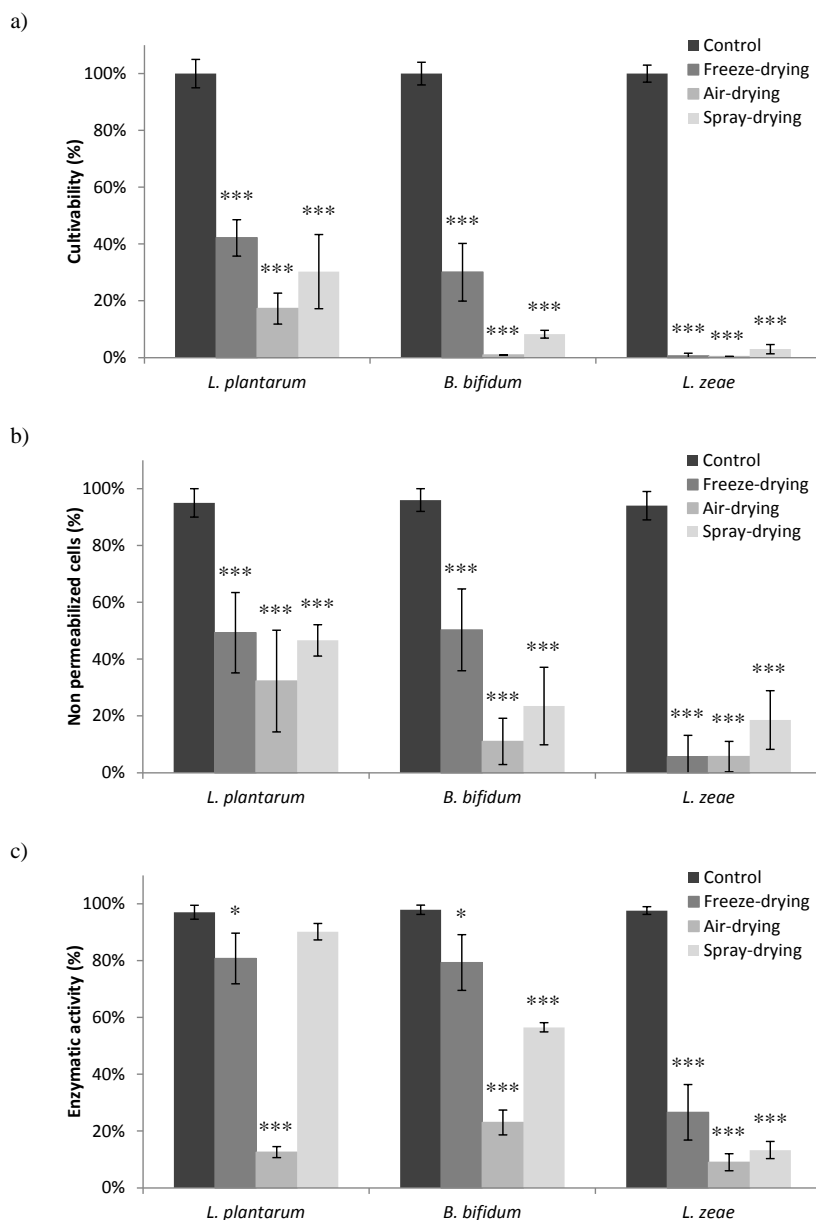
**Adherence to hexadecane.** Relative bacterial hydrophobicity was measured as described previously (Rosenberg et al. 1980).

**Cell damage evaluation.** The sensitivity of the three bacteria to the manufacturing processes was determined by measuring their enzymatic activity and membrane integrity before and after they were stressed. Esterase activity and cell permeabilization were determined by flow cytometry (BD FACSAria, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) with the fluorescent probes carboxyfluorescein diacetate (cFDA) and propidium iodide (PI), respectively. 1 mL of cell suspension at  $\text{DO}=1$  was supplemented with 0.5  $\mu\text{L}$  of cFDA (20 mM) and incubated for 10 min. Then, the suspension was harvested by centrifugation and cell pellet was resuspended in PBS. Finally, 0.5  $\mu\text{L}$  of PI (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France) was added.

The bacterial growth kinetics after the manufacturing processes were measured for each strain. The bacterial cells were analyzed by flow cytometry and the nonpermeabilized cells were sorted and serially diluted. A 20  $\mu\text{L}$  aliquot of the fresh or rehydrated microorganisms was then transferred to 180  $\mu\text{L}$  of growth medium previously equilibrated to  $37^{\circ}\text{C}$ , and introduced into an absorbance microplate reader (Paradigm, Beckman Coulter, USA). Optical density was measured at 600 nm every 60 min.

## Results

**Impact of the manufacturing processes on cell viability and integrity.** The results presented in Figure 1a show the cell culturability of *L. plantarum*, *B. bifidum*, and *L. zeae* after freeze-drying, air-drying, and spray-drying. For the *L. plantarum* strain, the freeze-drying and spray-drying treatments preserved



**Figure 1.** Impact of manufacturing processes on cell viability and integrity. Culturability (a), membrane permeabilization (b), and enzymatic activity (c) were measured in fresh cultures (■) or after freeze-drying (▣), air-drying (▢), or spray-drying (▧) in three bacterial strains (*L. plantarum*, *B. bifidum*, *L. zeae*). The number of asterisks (\*) indicates the level of significant difference (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001).

the cells relatively well (42.2% and 37.9%, respectively), whereas air-drying caused significant cell destruction (17.3%). The survival rates of *B. bifidum* were 30.1%, 0.9%, and 8.3% after freeze-drying, air-drying, and spray-drying, respectively. For the *L. zeae* strain, all the dehydration methods tested caused significant reductions in viability (to 0.6%, 0.4%, and 3.0% after freeze-drying, air-drying, and spray-drying, respectively).

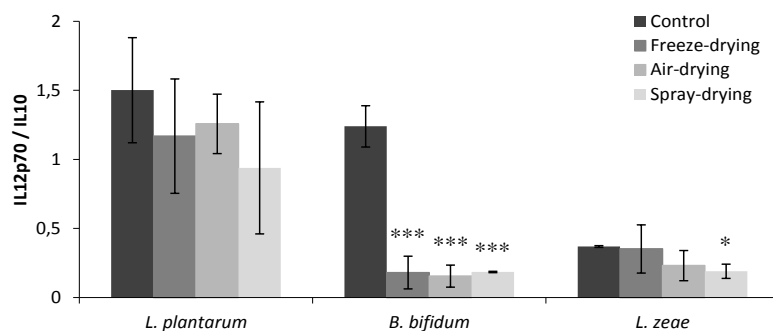
Cell integrity was measured by flow cytometry using two probes: PI for membrane integrity and cFDA for esterase activity. The proportions of nonpermeabilized cells were 49.3%, 32.3%, and 46.6% for *L. plantarum*; 50.3%, 11.0%, and 23.5% for *B. bifidum*; and 5.6%, 5.7%, and 18.6% for *L. zeae* after freeze-drying, air-drying, and spray-drying, respectively (Figure 1b). These results were slightly higher than the cell

culturability values, indicating that not all nonpermeabilized cells were culturable. The results in Figure 1c show the impact of the dehydration treatments on bacterial esterase activity. The enzyme activity measurements were higher than the cell viabilities in all cases for *B. bifidum* and *L. zeae* or after freeze-drying and spray-drying for *L. plantarum*. The percentages of esterase activity retained after freeze-drying, air-drying, and spray-drying were 80.7%, 12.6%, and 91.6%, respectively, for *L. plantarum*; 79.3%, 23.0%, and 56.5%, respectively, for *B. bifidum*; and 26.6%, 9.0%, and 13.3%, respectively, for *L. zeae*.

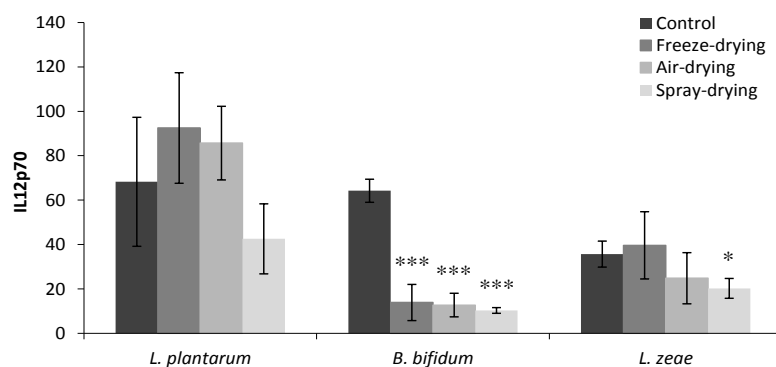
**Impact of the manufacturing processes on probiotic properties.** It has been reported in the literature that a strong correlation exists between the profiles of the cytokines released by PBMCs *in vitro*

and immunomodulatory potential *in vivo* (Foligne et al. 2007). The results presented in Figure 2 compare the profiles of the proinflammatory (interleukin 12p70 [IL12p70]) and anti-inflammatory (IL10) cytokines released by PBMCs after incubation with fresh or dehydrated microorganisms.

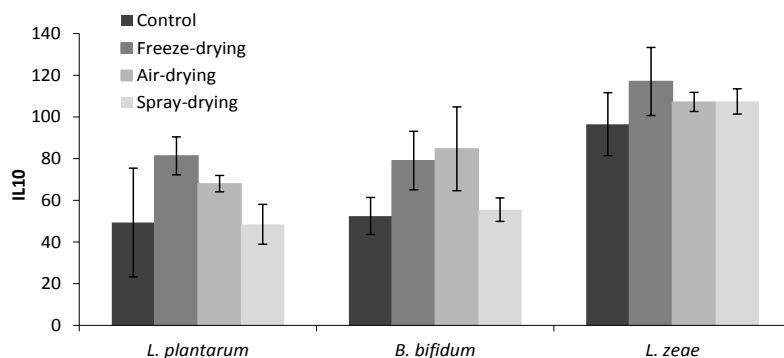
a)



b)



c)



**Figure 2.** Impact of manufacturing processes on the immunomodulatory potential of bacteria. IL12p70/IL10 ratio (a), IL12p70 (b), and IL10 (c) responses of human PBMCs to bacterial stimulation were measured for fresh cultures (■) or after freeze-drying (▣), air-drying (▢), or spray-drying (▧). The values are expressed as means ± SEM in pg/mL for cytokines and in percentages for IL12/IL10 ratios for the three bacterial strains (*L. plantarum*, *B. bifidum*, *L. zeae*). The number of asterisks (\*) indicates the level of significant difference (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001).

The IL12p70/IL10 ratios indicate that the three strains were not affected similarly by the drying processes (Figure 2a). For the *L. plantarum* strain, the proinflammatory/anti-inflammatory ratio was relatively well preserved after freeze-drying, air-drying, and spray-drying (1.5 for the control vs 1.2, 1.3, and 0.9, respectively); in all cases, the differences were not significant. This ratio was reversed in all cases for *B. bifidum* (1.2 for the control vs 0.2, 0.1, and 0.2 after freeze-drying, air-drying, and spray-drying, respectively); thus, the strain lost its proinflammatory capacity and became highly anti-

inflammatory. Finally, for the *L. zeae* strain, the ratio was well preserved after freeze-drying and air-drying (0.4 for the control vs 0.4 and 0.3, respectively), but differed significantly after spray-drying (0.2). Thus, the drying processes tended to reduce the IL12p70/IL10 ratio.

Probiotic dehydration had a different effect on the production of proinflammatory cytokines by PBMCs for each strain (Figure 2b). For *L. plantarum*, IL12p70 production remained relatively constant (nonsignificantly different) with all treatments tested: 68 pg/mL for the control vs 95, 85, and 43 pg/mL after freeze-drying, air-drying, and spray-drying, respectively. In contrast, for the *B. bifidum* strain, a significant reduction in its proinflammatory properties was observed after all treatments (64 pg/mL for the control vs 14, 13, and 10 pg/mL after freeze-drying, air-drying, and spray-drying, respectively). For *L.*

*zeae*, IL12p70 production was maintained after freeze-drying and air-drying (40 and 25 pg/mL, respectively vs 36 pg/mL for the control), but was significantly reduced after spray-drying (20 pg/mL).

The anti-inflammatory properties of the three bacterial strains tended to increase slightly with all three treatments tested (Figure 2c). For *L. plantarum*, IL10 production was maintained after freeze-drying, air-drying, and spray-drying (49 pg/mL for the control vs 81, 68, and 48 pg/mL, respectively). For the *B. bifidum* strain, cytokine production was also slightly enhanced after freeze-drying and air-drying (52 pg/mL for the control vs 79 and 84 pg/mL, respectively). Finally, IL10 production remained relatively constant (nonsignificantly different) for *L. zeae*, with 96 pg/mL for the control vs 117, 107, and 107 pg/mL after freeze-drying, air-drying, and spray-drying, respectively. For all three bacteria, the amount of IL10 production was altered least by the spray-drying process.

In conclusion, the manufacturing processes had a strong impact on the immunostimulatory capacities of the probiotic bacteria and tended to reduce their proinflammatory activities. All the significant differences observed in the IL12p70/IL10 ratio were attributable to a reduction in IL12 production.

**Impact of the manufacturing processes on bacterial hydrophobicity.** Bacterial adherence to hexadecane was measured before and after the drying processes for all these strains (Figure 3). The results show nonsignificant differences for the *L. plantarum* strain after freeze-drying and spray-drying (42% for the control vs 59% and 38%, respectively). Conversely, cell hydrophobicity was significantly enhanced after air-drying (62%).

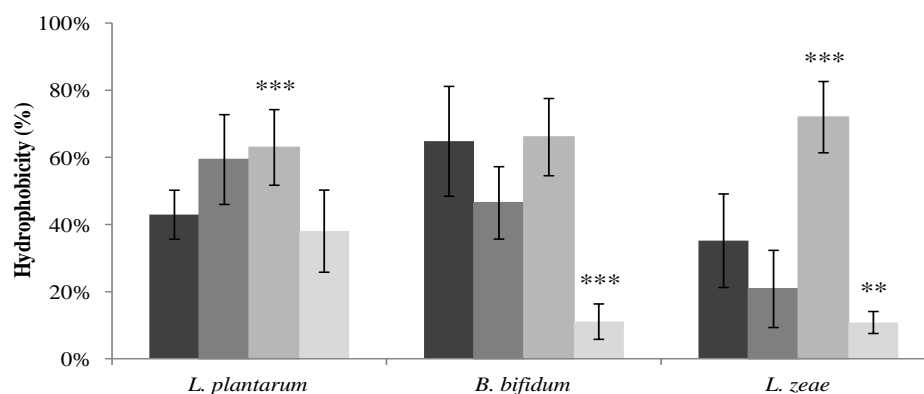
The results were very similar between the other two strains, with increases in surface hydrophobicity after air-drying vs the control (66% vs 64% for *B. bifidum*; 72% vs 35% for *L. zeae*). In contrast, cell hydrophobicity decreased after freeze-drying and spray-drying (46% and 11% for *B. bifidum*, respectively; and 20% and 10% for *L. zeae*, respectively).

**Impact of the manufacturing processes on bacterial growth recovery.** Table 1 shows the time required to reach the mid-log phase of growth for the fresh and processed cultures. The growth recovery time was 12.0, 17.8, and 9.9 h for the fresh cultures of *L. plantarum*, *B. bifidum*, and *L. zeae*, respectively. After freeze-drying, air-drying, and spray-drying, the times required to reach the mid-log phase of growth were 17.2, 14.0 and 12.8 h, respectively, for *L. plantarum*; 24.6, 21.6, and 20.6 h, respectively, for *B. bifidum*; and 15.8, 15.1, and 11.8 h, respectively, for *L. zeae*. The values for the growth recovery time that most closely matched the control value were obtained after spray-drying for the three strains. Moreover, in all cases, the highest growth time was obtained after freeze-drying.

### Discussion

This study was conducted to characterize the impact of drying processes on bacterial viability and functionality. Our results show that dehydration strongly affects probiotic properties.

According to the definition, probiotic microorganisms must be alive when consumed. However, stabilization without protectants does not allow the entire bacterial population to survive (Figure 1a). Freeze-drying better preserved the *L. plantarum* and *B. bifidum* strains, whereas *L. zeae* was sensitive to all drying techniques. All the preservation strategies used in this study induced high electrolyte concentrations and similar mechanical constraints (the same final water activities). If we compare these three techniques in terms of the amount of energy required to withdraw water, they show very similar values. However, the time required for water removal is technique dependent, e.g., the power used during spray-drying is at least 10,000 times greater than that during freeze-drying. Thus, manufacturing processes can inactivate bacterial cells by thermal, cryo-, mechanical, and/or oxidative injury. The high temperature used during spray-drying can induce protein denaturation and membrane permeabilization (Teixeira et al. 1995),



**Figure 3.** Impact of manufacturing processes on bacterial hydrophobicity. The values were measured for fresh cultures (■) or after freeze-drying (■), air-drying (■), or spray-drying (■) in three bacterial strains (*L. plantarum*, *B. bifidum*, *L. zeae*). The number of asterisks (\*) indicates the level of significant difference (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001).



whereas air-drying desiccation promotes oxidation reactions. Free radicals appear at intermediate water activities and react preferentially with amino acids and lipids (Castro et al. 1995; Farhatziz and Ross 1977). Our results show no direct link between the reduction in viability and the modification of the probiotic properties (Figure 1a, 2a). Indeed, after freeze-drying and air-drying, the *L. plantarum* strain showed differences in its viability but not in its functionality. However, it is impossible to know whether nonculturable cells retain their probiotic properties or if the remaining living cells become more effective. A comparison of the control and freeze-dried cells of *L. zeaе* showed that when 99.4% of the bacteria were dead, they had similar functionality to that of 100% living cells. Therefore, it seems likely that the dead cells had similar effects to those of the viable cells. Other studies have shown similar effects for inactivated and cultured probiotics (Generoso et al. 2011; Zhang et al. 2005). After drying, the *B. bifidum* strain showed a significant reduction in its immunomodulatory potential, associated with an IL12p70/IL10 ratio inversion. Thus, its probiotic effect was modified by all treatments and is not linked to its viability. For all three bacterial strains, modification of their immunomodulatory properties did not depend on their survival rates after drying. Each strain showed a specific sensitivity to drying, presumably because of its specific mode of action. Other studies have shown that the modification of cell functionality is dependent on the microorganism and on the inactivation method applied (Kataria et al. 2009; van Baarlen et al. 2009; Wong and Ustunol 2006). We also observed that live and killed (inactivated by high pressure) cells of *B. bifidum* can have similar probiotic properties (data not shown). Therefore, the relevant question is not whether the bacteria are dead or alive, but rather how they died.

proinflammatory activity (Liu et al. 2011; Sánchez et al. 2008). Conversely, IL10 production tended to increase after drying. These modifications may result from the synthesis of molecules during the early stages of drying. Indeed, it has already been shown that microorganisms establish protective mechanisms when their environments change, including the synthesis of stress proteins (De Angelis and Gobbetti 2004). However, some heat-shock proteins produced by microorganisms during environmental perturbation can inhibit or stimulate the inflammatory response (Henderson et al. 2006). Some of these proteins are also used at the bacterial cell surface as adhesins. Among the stabilization treatments tested, spray-drying was the only technique that caused no increase in IL10 production, no reduction in IL12 production, and a reduced adhesion capacity in all three bacterial strains (Figures 2, 3). However, spray-drying is the fastest technique, which means that fewer stress proteins are synthesized. Other surface compounds may underlie the probiotic effects (Fernandez et al. 2011; Liu et al. 2011). Among them, teichoic acids are highly charged cell-wall polymers, implicated in cell-surface hydrophobicity (Gross et al. 2001; Miorner et al. 1983) and the immunomodulatory properties of bacteria (Grangette et al. 2005). It has been demonstrated previously that drying processes affect the cell walls of lactobacilli (Santivarangkna et al. 2007b; Teixeira et al. 1995). The bacterial adhesion capacity decreases after spray-drying, but increases after air-drying and is fairly well preserved after freeze-drying. This observation was confirmed for all three probiotic strains tested. It has already been shown that manufacturing processes can modify bacterial adherence properties, and especially pathogen exclusion by competition (Grzeskowiak et al. 2011). A recent study also showed a significant loss of adhesion capacity in strain *L. kefir* 8348 after

	Control	Freeze-drying	Air-drying	Spray-drying
<i>L. plantarum</i>	12.0 (±0.1)	17.2 (±1.4) <sup>***</sup>	14.0 (±1.0) <sup>***</sup>	12.8 (±1.6)
<i>B. bifidum</i>	17.8 (±1.4)	24.6 (±0.2) <sup>***</sup>	21.6 (±1.8) <sup>*</sup>	20.6 (±1,5) <sup>*</sup>
<i>L. zeaе</i>	9.9 (±0.2)	15.8 (±0.8) <sup>***</sup>	16.2 (±1.8) <sup>***</sup>	12.4 (±0.2) <sup>***</sup>

**Table 1.** Impact of manufacturing processes on bacterial growth recovery. Mid-log phases of *L. plantarum*, *B. bifidum*, and *L. zeaе* were measured for fresh cultures or after freeze-drying, air-drying, or spray-drying. The number of asterisks (\*) indicates the level of significant difference (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001).

Changes in their immunostimulatory potential were caused by a significant reduction in IL12 production (Figure 2b). For all the strains tested, the production of IL12 tended to decrease after the drying processes (Figure 1b). This may be attributable to an alteration in a bacterial structure known to have

spray-drying but not in two other strains tested (Golowczyk et al. 2011a). However, in that case, the preservation of hydrophobicity may have been attributable to the presence of protectants (skim milk powder). It has already been shown that reconstituted skim milk powder improves cell survival and

membrane integrity after spray-drying and during storage (Ananta et al. 2005; Lian et al. 2002). Other studies have found no significant differences with control cells in acid or bile tolerance (Madhu et al. 2011) or pathogen inhibition (Bolla et al. 2011) after drying processes with this additive.

The other parameters tested give an overview of the effects of drying processes on the main cellular structures: the membrane, enzymes, and nucleic acids. In our study, the numbers of nonpermeabilized cells were close to the numbers of culturable cells (Figures 1a, 1c). However, a proportion of the nonpermeabilized cells were not culturable after exposure to the three dehydration methods. For each strain, freeze-drying, air-drying, and spray-drying affected membrane permeabilization quite similarly. The mechanical constraint of drying, which affects the s/v ratio and membrane integrity, did not seem to be the cause of functionality loss. The *L. plantarum* and *B. bifidum* strains showed important residual esterase activity after freeze-drying and spray-drying (Figure 1c). For *B. bifidum*, this enzyme activity was maintained, but its probiotic effect was altered. Low residual esterase activity was observed in *L. zae* after exposure to each of the three stresses, but only after air-drying in *L. plantarum* and *B. bifidum*. In all three strains, the maintenance of enzyme activity was not associated with probiotic functionality. Finally, spray-drying and freeze-drying induced the lowest and highest growth retardation, respectively, in all three strains (Table 1). Indeed, although freeze-drying better protects cells in terms of all other parameters, it is a highly inappropriate technique for the production of a dehydrated starter culture. It has already been shown that freeze-drying and spray-drying treatments affect the lag phase (or mid-log phase) relative to that of control cells (Golowcyc et al. 2011b; Teixeira et al. 1995). Thus, it seems that for each microbe, there exists a special stabilization technique that best maintains its viability and functionality.

## Conclusion

In this study, we investigated the effects of desiccation on the physiological states of bacterial populations and on their probiotic effects. Our results show that the manufacturing process strongly affects probiotic properties. The effects of dehydration treatments on cell functionality are not directly linked to survival, and each bacterial strain has a specific sensitivity to each stabilization methods. The processes can positively or negatively modify bacterial properties. Thus, freeze-drying better preserved bacterial culturability, membrane properties, enzymatic activity, and immunomodulatory effects, but induced an

important growth delay. Spray-drying may be a good strategy to produce strains that induce a proinflammatory response, whereas air-drying is best adapted for adherent probiotic microorganisms. It will be interesting to determine whether the functionality of daughter cells is also affected in terms of their adhesion and growth in the digestive tract. In summary, the validation of bacterial functionality after different manufacturing processes seems to be an essential procedure, especially in clinical trials.

## Bibliography:

- Ananta E, Volkert M, Knorr D. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal* 15(4):399-409.
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307(5717):1915-1920.
- Ball P. 2008. Water as an active constituent in cell biology. *Chemical Reviews* 108(1):74-108.
- Bolla PA, de los Angeles Serradell M, De Urraza PJ, De Antoni GL. 2011. Effect of freeze-drying on viability and *in vitro* probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *Journal of Dairy Research* 78(1):15-22.
- Castro HP, Teixeira P, Kirby R. 1995. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44(1):172-176.
- Chang LL, Pikal MJ. 2009. Mechanisms of protein stabilization in the solid state. *Journal of pharmaceutical sciences* 98(9):2886-2908.
- Crowe J, Crowe L. 1984. Effects of dehydration on membranes and membrane stabilization at low water activities. *Biological membranes* 5:57-103.
- De Angelis M, Gobbetti M. 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics* 4(1):106-122.
- Deepika G, Green RJ, Frazier RA, Charalampopoulos D. 2009. Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Applied Microbiology* 107(4):1230-1240.
- Dong A, Prestrelski SJ, Allison SD, Carpenter JF. 1995. Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation. *Journal of pharmaceutical sciences* 84(4):415-424.
- Dupont S, Beney L, Ritt JF, Lherminier J, Gervais P. 2010. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1798(5):975-985.
- Ebel B, Lemetals G, Beney L, Cachon R, Sokol H, Langella P, Gervais P. 2012. Could probiotics prevent cardiovascular diseases? A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* DOI: 10.1080/10408398.2011.579361.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada.
- Farhatziz T, Ross AB. 1977. In: Selected specific rates of reactions of transients in water and aqueous media III. Hydroxyl radical and their radical ions. National Standard Reference Data Service, p59.
- Fernandez EM, Valenti V, Rockel C, Hermann C, Pot B, Boneca IG, 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(8):1050-1059.
- Foligne B, Nutten S, Grangette C, Dennin V, Goudercourt D, Poirat S, Dewulf J, Brassart D, Mercenier A, Pot B. 2007. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology* 13(2):236-243.
- França M, Panek A, Eleutherio E. 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146(4):621-631.
- Generoso SV, Viana ML, Santos RG, Arantes RME, Martins FS, Nicolli JR, Machado JAN, Correia MITD, Cardoso VN. 2011. Protection

- against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. *European Journal of Nutrition* 50(4):261-269.
- Gilad O, Svensson B, Viborg AH, Stuer-Lauridsen B, Jacobsen S. 2011. The extracellular proteome of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 reveals proteins with putative roles in probiotic effects. *Proteomics* 11(11):2503-2514.
- Golowczyk MA, Silva J, Teixeira P, De Antoni GL, Abraham AG. 2011a. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International journal of food microbiology* 144:556-560.
- Golowczyk MA, Silva J, Teixeira P, De Antoni GL, Abraham AG. 2011b. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International Journal of Food Microbiology* 144(3):556-560.
- Grangette C, Nutten S, Palumbo E, Morath S, Hermann C, Dewulf J, Pot B, Hartung T, Hols P, Mercenier A. 2005. Enhanced anti-inflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(29):10321-10326.
- Greenspan L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solution. *Journal of research of the National Bureau of Standards* 81A:89-96.
- Gross M, Cramton SE, Gotz F, Peschel A. 2001. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infection and immunity* 69(5):3423-3426.
- Grzeskowiak L, Isolauri E, Salminen S, Gueimonde M. 2011. Manufacturing process influences properties of probiotic bacteria. *British Journal of Nutrition* 105(6):887-894.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408(6813):740-745.
- Henderson B, Allan E, Coates ARM. 2006. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. *Infection and immunity* 74(7):3693-3706.
- Imlay JA. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology* 57(1):395-418.
- Jankovic I, Sybesma W, Phothirath P, Ananta E, Mercenier A. 2010. Application of probiotics in food products--challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology* 21(2):175-181.
- Kataria J, Li N, Wynn JL, Neu J. 2009. Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial? *Nutrition reviews* 67(9):546-550.
- Lahtinen SJ, Ahokoski H, Reinikainen JP, Gueimonde M, Nurmi J, Ouwehand AC, Salminen SJ. 2008. Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria. *Letters in applied microbiology* 46(6):693-698.
- Lebeer S, Claes IJ, Vanderleyden J. 2012. Anti-inflammatory potential of probiotics: lipoteichoic acid makes a difference. *Trends in Microbiology* 20(1):5-10.
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 8(3):171-184.
- Lemetais G, Dupont S, Beney L, Gervais P. 2012. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Applied microbiology and biotechnology*:DOI: 10.1007/s00253-012-4014-3.
- Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology* 61(10):3592-3597.
- Lian WC, Hsiao HC, Chou CC. 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International journal of food microbiology* 74(1-2):79-86.
- Liu CF, Tseng KC, Chiang SS, Lee BH, Hsu WH, Pan TM. 2011. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(12):2284-2291.
- Lopez M, Li N, Kataria J, Russell M, Neu J. 2008. Live and ultraviolet-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease flagellin-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition* 138(11):2264-2268.
- Madhu AN, Awasthi SP, Reddy KBPK, Prapulla SG. 2011. Impact of freeze and spray drying on the retention of probiotic properties of *Lactobacillus fermentum*: An in vitro evaluation model. *International journal of microbiological research* 2(3):243-251.
- Meng XC, Stanton C, Fitzgerald G, Daly C, Ross R. 2008. Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry* 106(4):1406-1416.
- Milhaud J. 2004. New insights into water-phospholipid model membrane interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1663(1-2):19-51.
- Miorner H, Johansson G, Kronvall G. 1983. Lipoteichoic acid is the major cell wall component responsible for surface hydrophobicity of group A streptococci. *Infection and immunity* 39(1):336-343.
- Prestrelski SJ, Tedeschi N, Arakawa T, Carpenter JF. 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal* 65(2):661-671.
- Ragoonanan V, Malsam J, Bond DR, Aksan A. 2008. Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778(10):2283-2290.
- Rajilić-Stojanović M, Smidt H, De Vos WM. 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental Microbiology* 9(9):2125-2136.
- Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9(1):29-33.
- Roy I, Gupta MN. 2004. Freeze drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 39(2):165-177.
- Sánchez B, Bressollier P, Urdaci MC. 2008. Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 54(1):1-17.
- Santivarangkna C, Wenning M, Foerst P, Kulozik U. 2007. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Journal of Applied Microbiology* 102(3):748-756.
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G and others. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(43):16731-16736.
- Teixeira P, Castro H, Kirby R. 1995. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology* 78(4):456-462.
- Trevors J. 2012. Can dead bacterial cells be defined and are genes expressed after cell death? *Journal of Microbiological Methods* 90(1):25-28.
- Tymoczyszyn E, del Rosario Diaz M, Gómez Zavaglia A, Disalvo E. 2007. Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *Journal of Applied Microbiology* 103(6):2410-2419.
- van Baarlen P, Troost FJ, Van Hemert S, Van Der Meer C, De Vos WM, De Groot PJ, Hooiveld GJEJ, Brummer RJM, Kleerebezem M. 2009. Differential NF- $\kappa$ B pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(7):2371-2376.
- Wagner H. 2002. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Current opinion in microbiology* 5(1):62-69.
- Wong C, Ustunol Z. 2006. Mode of inactivation of probiotic bacteria affects interleukin 6 and interleukin 8 production in human intestinal epithelial-like Caco-2 cells. *Journal of Food Protection* 69(9):2285-2288.
- Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. 2005. Live and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced Interleukin-8 production in Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition* 135(7):1752-1756.

### 1.2.2. Impact du stress mécanique et du stress oxydant sur la fonctionnalité des bactéries

L'impact de ces deux perturbations sur la fonctionnalité des cellules a été mesuré en réalisant un choc osmotique et un choc oxydant sur une culture bactérienne. Le choc osmotique a été réalisé en déposant 1 mL d'un mélange eau-glycérol ( $a_w = 0,23 - 1h$ ) sur un culot bactérien. Cette opération a été réalisée sous atmosphère réductrice (bullage de la solution osmotique avec un gaz réducteur – manipulation en boîte à gant) pour ne mesurer que l'action du stress mécanique. Le choc oxydant a été réalisé en stressant les cellules avec du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ , 30 mM – 1h). La perturbation osmotique entraîne un fort taux de mortalité (survie < 1%) une perméabilisation de la membrane et une altération des structures cellulaires. Le stress oxydant induit également un taux de destruction important (survie < 1%) mais pas de perméabilisation de la membrane.

Les résultats obtenus traduisent une forte altération de la production de cytokines pro-inflammatoires pour les deux stress (Tableau 13). A contrario, la composante anti-inflammatoire reste non significativement différente du témoin après un stress osmotique ou un stress oxydant. Comme précédemment, ces résultats montrent plutôt une diminution de la composante pro-inflammatoire et un maintien de la composante anti-inflammatoire lorsque les cellules sont stressées.

**Tableau 13:** Evolution de la composante pro-inflammatoire (IL-12p70) et anti-inflammatoire (IL-10) de la souche *L. bulgaricus* lors d'un stress oxydant et d'un stress osmotique

	<b>IL-10</b>	<b>IL-12p70</b>	<b>Ratio IL-10/IL-12</b>
Témoin <i>L. bulgaricus</i>	255 ( $\pm$ 71)	55 ( $\pm$ 8)	5,8 ( $\pm$ 5)
Après un stress oxydant	328 ( $\pm$ 24)	< 1 <sup>***</sup>	>328 <sup>***</sup>
Après un stress osmotique	189 ( $\pm$ 58)	< 1 <sup>***</sup>	>189 <sup>***</sup>

Ainsi, les deux composantes du séchage, le stress mécanique et le stress oxydant induisent des modifications de la fonctionnalité probiotique, conduisant à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires.

### 1.2.3. Discussion

La définition actuelle des probiotiques impose la viabilité des bactéries mais n'évoque pas la notion de fonctionnalité. Nous avons démontré que les procédés de déshydratation influencent fortement la fonctionnalité des bactéries. Ainsi, le potentiel immuno-stimulant de la souche *B. bifidum* est modifié par les trois techniques de séchage. De façon globale, la lyophilisation, le séchage sur couche mince ou l'atomisation induisent une diminution de la production d'IL-12 et un maintien, voire une augmentation, de la production d'IL-10. Dans la bibliographie, d'autres auteurs observent une variation de la fonctionnalité après séchage. Ainsi, Grzeskowiak et al., montrent que le procédé industriel modifie les propriétés de la souche *L. rhamnosus* GG (Grzeskowiak et al. 2011). De même, une étude récente précise que la souche *L. rhamnosus* Lcr35 provenant de différentes préparations commerciales possède des propriétés différentes, notamment en ce qui concerne l'exclusion de pathogènes (Nivoliez et al. 2012). Cependant, l'impact du traitement sur la fonctionnalité semble souche dépendant. En effet, les souches *L. plantarum* et *L. zeae* ne sont pas affectées par le séchage, quelque soit le taux de survie correspondant. D'autres auteurs relèvent une préservation de l'effet probiotique (inhibition de croissance de *Shigella sonnei*) sur un mélange de souches (*L. kefir*, *L. plantarum*, *Lc. lactis*, *S. cerevisiae* et *Kluyveromyces marxianus*) après lyophilisation (Bolla et al. 2011). L'impact du traitement sur la fonctionnalité dépend vraisemblablement des structures impliquées dans la fonction probiotique. La modification de la fonctionnalité peut provenir du stress mécanique et ou du stress oxydant. En effet, ces deux composantes ont la capacité, en altérant les structures cellulaires, de modifier la fonctionnalité probiotique. Dans les deux cas, c'est la composante pro-inflammatoire qui est affectée.

De même, les procédés de séchage modifient l'hydrophobicité de surface des bactéries : l'atomisation entraînant une réduction de cette hydrophobicité et le séchage sur couche mince une augmentation. Dans la bibliographie, une étude démontre une perte de la capacité d'adhésion sur cellules Caco-2 de la souche *L. kefir* 8348 de 56% après atomisation (Golowczyc et al. 2011b). Ainsi, chaque technique de déshydratation possède ses propres caractéristiques et doit être adaptée en fonction des propriétés fonctionnelles de la bactérie à sécher.

*Le séchage est un procédé qui peut potentiellement altérer la viabilité et la fonctionnalité des bactéries probiotiques. Deux stress, l'un mécanique et l'autre oxydant sont à l'origine de ces perturbations.*

*Le stress mécanique cible plus particulièrement la membrane et est à l'origine d'un fort taux de destruction des cellules. De même, la fonctionnalité, vraisemblablement portée par des structures cellulaires de surface est altérée.*

*Le stress oxydant est à l'origine de l'apparition d'espèces réactives, dès les premiers stades du séchage. Si l'impact direct de ces espèces réactives sur la viabilité est assez faible, elles semblent pouvoir jouer sur la fonctionnalité probioque des bactéries. De plus, un maintien des cellules à de trop hautes valeurs d'humidité favorise leurs mobilités, ce qui conduit à l'oxydation et à la mort des cellules.*

*Pour lutter contre ces deux perturbations, plusieurs stratégies peuvent être mises en œuvre :*

- *Une déshydratation lente en présence de sucre et d'acide aminé*
- *Un maintien à l'état sec à faible humidité relative ( $11\% < HR < 23\%$ )*
- *Une réhydratation lente en présence de nutriments à 37 °C*

## 2. Mise en place d'outils de sélection de souches probiotiques

### 2.1. Production de micro-organismes frais

La facilité de production des micro-organismes a été mesurée en comparant leur vitesse de croissance dans du milieu de culture MRS. Pour cela, des courbes de croissances des micro-organismes retenus ont été réalisées en lecteur de plaques. Le tableau suivant présente la productivité obtenue après inoculation du milieu par la même quantité de micro-organisme. Une seule bactérie, *B. bifidum*, possède une productivité largement inférieure aux autres souches. On peut noter assez peu de différences entre les autres bactéries du projet puisque 9 souches ont une productivité comprise entre 5,7 et 8,3 x10<sup>10</sup> UFC.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. La souche possédant la vitesse de croissance la plus élevée est la souche *L. bulgaricus*. Les souches immunostimulantes possédant la plus forte productivité sont *L. zaeae* CNRZ 2268 et *L. plantarum* CNRZ 1997.

**Tableau 14:** Productivité des différentes souches du projet. Les souches ont été standardisées à une concentration de 10<sup>8</sup> UFC/mL, diluées en cascade et un volume de 200 µL a été introduit dans les puits d'une plaque 96 puits. L'évolution de la DO a été mesurée en lecteur de plaques.

Souche	Productivité (x10 <sup>10</sup> UFC.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<i>L. bulgaricus</i>	8,28
<i>L. zaeae</i>	7,71
<i>L. plantarum</i>	6,46
<i>L. curvatus</i>	6,33
<i>L. fermentum</i>	6,33
<i>L. paracasei</i>	5,80
<i>L. casei</i>	5,73
<i>L. brevis</i>	5,68
<i>B. longum</i>	5,68
<i>B. bifidum</i>	1,90

### 2.2. Criblage du procédé de fabrication

L'objectif de cette étude est de développer des tests de criblage pour caractériser et comparer la résistance des souches du projet aux perturbations du procédé de fabrication.

Différents tests ont été mis en place pour permettre la sélection d'une bactérie probiotique fonctionnelle et résistante :

- Stress représentatifs du procédé de fabrication :
  - Cycle de congélation - décongélation
  - Stress osmotique (NaCl, glycérol)
  - Stress oxydant (Ménadione, 4NQO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
  - Séchage (séchage sur couche mince)
- Stress du tractus gastro-intestinal :
  - Estomac
  - Sels biliaires
  - Colon

Dans cette partie, seuls les résultats des tests de criblage du procédé de fabrication sont détaillés. L'objectif de ce travail est de comparer la résistance des souches à des procédés industriels de conservation tels que la lyophilisation et la congélation. Les bactéries ont donc été soumises à ces perturbations. Puis, la viabilité (cellules non perméabilisées) et la vitalité (activité enzymatique) des souches ont été mesurées par cytométrie de flux à l'aide de sondes fluorescentes. De plus, afin de caractériser plus efficacement la résistance de souches probiotiques à la lyophilisation, des tests rapides ont été développés.

### 2.2.1. Cycle de congélation-décongélation

Afin de déterminer la résistance des souches à la congélation, les souches ont été soumise à un cycle de congélation ( $\sim 8 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) – décongélation ( $\sim 24 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ). L'étape de congélation correspond à la première phase d'un séchage par lyophilisation. Les résultats obtenus montrent que la majorité des souches résiste assez bien au procédé de congélation, avec des taux de survie supérieurs à 50%. Le 3<sup>ème</sup> quartile est la valeur du caractère à partir de laquelle la fréquence cumulée atteint ou dépasse 0,75. Les souches au dessus de ce troisième quartile, *L. bulgaricus*, *L. zeae* et *B. bifidum*, possèdent des taux de viabilité respectifs de 87%, 86% et 84%. A contrario, les souches *B. longum*, *L. paracasei* et *L. curvatus* sont fortement altérées par la congélation avec respectivement 22%, 28% et 31% de cellules non perméabilisées. Au niveau de l'activité enzymatique, seules les souches *L. paracasei*, *B. longum* et *L. breve* sont altérées par la congélation avec respectivement des valeurs de 38%, 51% et 68%.



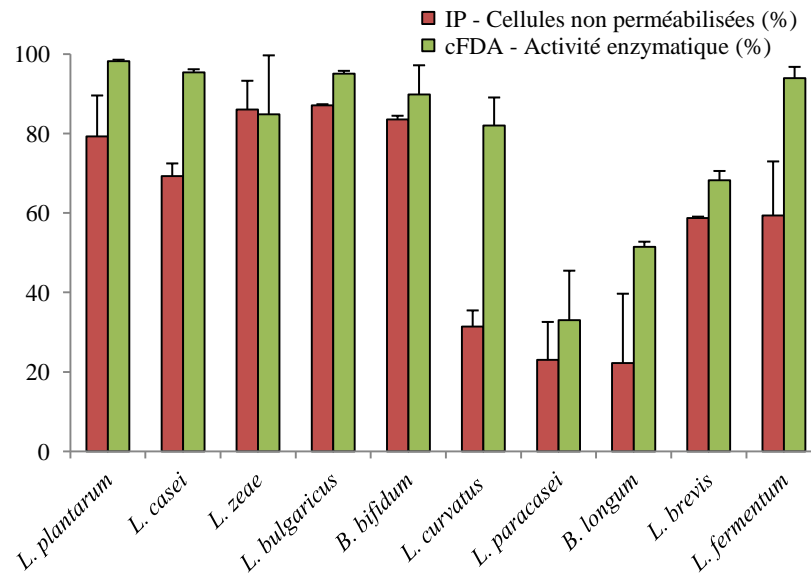


Figure 40: Pourcentage de cellules non perméabilisées et d'activité enzymatique après congélation

### 2.2.2. Cycle de séchage-réhydratation

Tout d'abord, les souches ont été déshydratées par lyophilisation. Sans adjuvants, les bactéries sont altérées par le traitement de séchage. Ainsi, les souches *L. paracasei*, *L. curvatus* et *L. plantarum* possèdent la meilleure résistance à la lyophilisation avec des taux de survie respectifs de 55%, 42%, 36%.

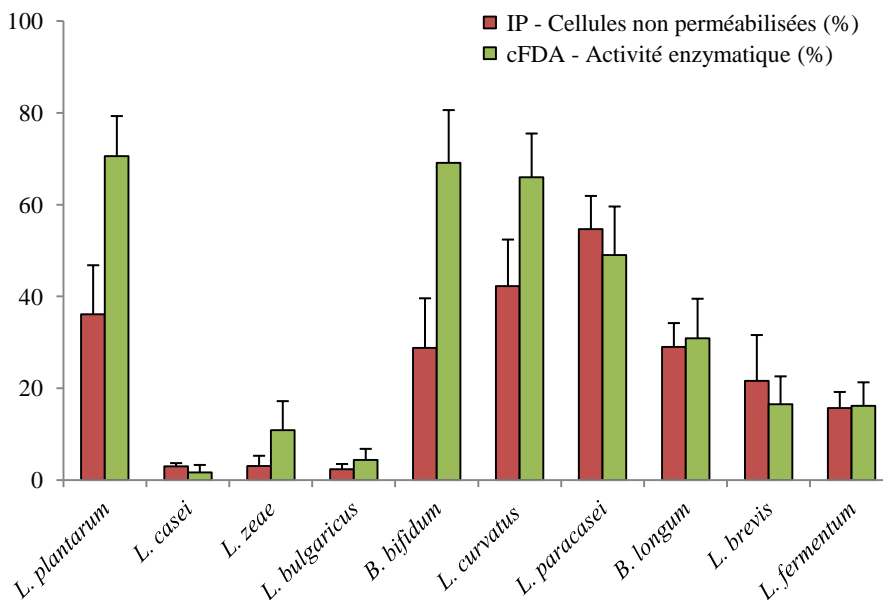
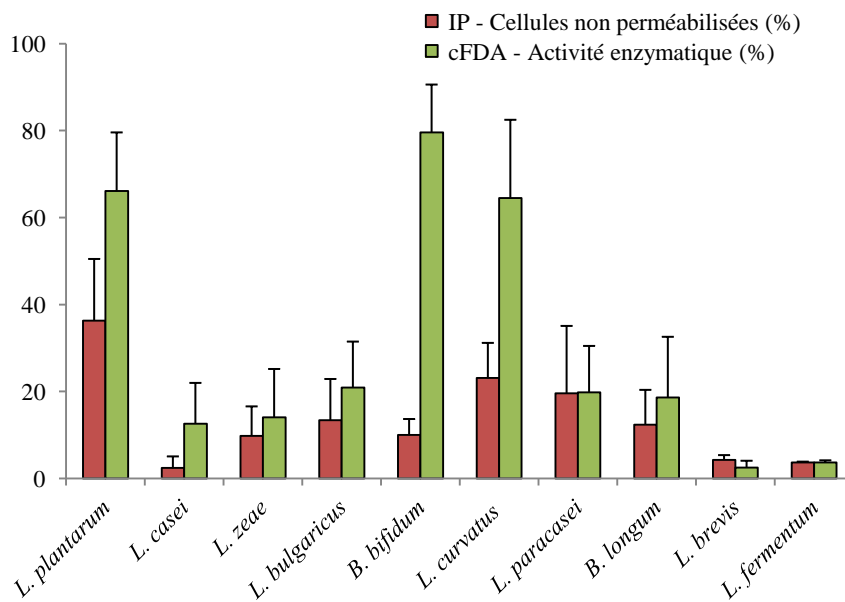


Figure 41: Pourcentage de cellules non perméabilisées et d'activité enzymatique après lyophilisation

Les bactéries *L. casei*, *L. bulgaricus* et *L. zeae* sont très sensibles au procédé de lyophilisation avec des taux de survie inférieurs à 5%. Concernant la fonctionnalité bactérienne, les résultats sont très proches de ceux obtenus avec l'IP. Les trois souches présentant la meilleure activité

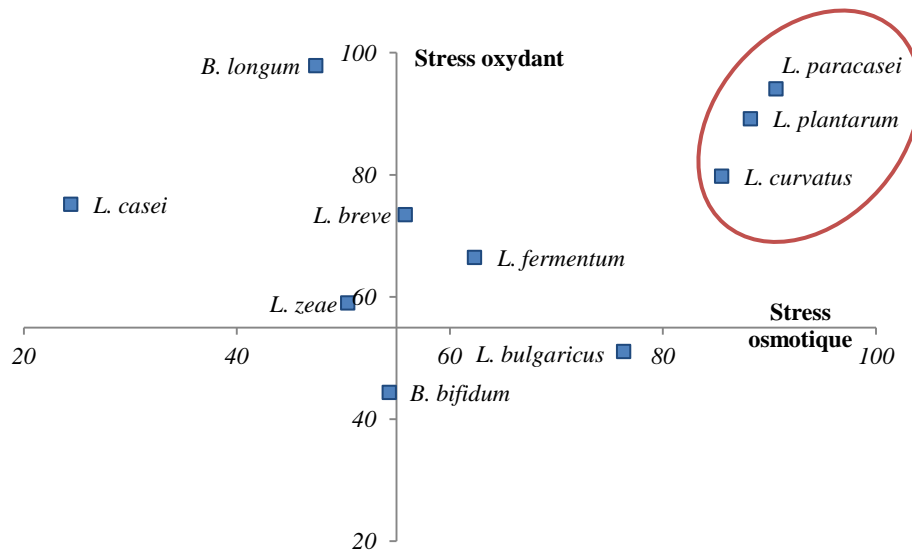
enzymatique après lyophilisation sont *L. plantarum*, *B. bifidum* et *L. curvatus* avec des pourcentages respectifs de 71%, 69% et 66%. De même, les micro-organismes ont été déshydratés sur couche mince dans une enceinte de séchage à 50% HR, maintenues 1h puis réhydratées rapidement dans du PBS. Les résultats obtenus indiquent d'abord une forte altération des cellules. Les bactéries présentant le meilleur taux de viabilité sont *L. plantarum*, *L. curvatus* et *L. paracasei* avec respectivement 36%, 23% et 19%. Au niveau de l'activité enzymatique, les souches *B. bifidum*, *L. plantarum* et *L. curvatus* résistent le mieux à la déshydratation avec des pourcentages d'activité enzymatique respectifs de 80%, 66% et 65%.



**Figure 42:** Pourcentage de cellules non perméabilisées et d'activité enzymatique après séchage sur couche mince

Les résultats obtenus sont similaires avec ceux de lyophilisation, tant au niveau de l'intégrité cellulaire que de l'activité enzymatique. Nous avons décomposé le procédé de séchage en deux composantes, l'une mécanique en réalisant un stress osmotique à 0,80 avec du NaCl et l'autre, oxydative, en réalisant un stress oxydant avec de la ménadione. La Figure 43 exprime les taux de viabilité des souches après ces deux perturbations. Les trois bactéries présentant la meilleure aptitude combinée sont les souches *L. paracasei*, *L. plantarum* et *L. curvatus*.

Les micro-organismes sélectionnés à l'aide de ce test rapide sont également les plus résistants à la lyophilisation et au séchage sur couche mince. De même, une des bactéries les plus faibles comme la souche *L. casei* se retrouve également mal placée sur le diagramme.



**Figure 43:** Pourcentage de cellules non perméabilisées après un stress osmotique et un stress oxydant. Le stress osmotique a été réalisé avec du NaCl et le stress oxydant avec de la ménadione.

Cependant, pour les souches intermédiaires, le lien entre les tests de criblage « NaCl-Ménadione » et les résultats obtenus par lyophilisation est moins évident. Ce diagramme nécessite des améliorations mais permet déjà de déterminer le type de protectant à utiliser pour améliorer la survie au séchage d'une souche en fonction de sa sensibilité au stress osmotique et/ou au stress oxydant.

**Tableau 15:** Pourcentage de viabilité (IP) des souches du projet après différentes perturbations représentatives du procédé de fabrication ou du tractus digestif

Souches	Stress osmotique	Congélation / décongélation	Lyophilisation	Séchage en couche mince	Fluide gastrique	Fluide intestinal	Sels biliaires	Stress oxydant
<i>L. plantarum</i>	88,2 <sup>a</sup>	79,3 <sup>a</sup>	36,1 <sup>b</sup>	36,3 <sup>a</sup>	75,9 <sup>c</sup>	74,1 <sup>a, b</sup>	82,8 <sup>b</sup>	89,2 <sup>a, b, c</sup>
<i>L. casei</i>	24,4 <sup>d</sup>	69,3 <sup>a</sup>	3,0 <sup>d</sup>	2,4 <sup>c</sup>	64,5 <sup>d</sup>	37,2 <sup>c</sup>	58,8 <sup>c, d, e</sup>	75,2 <sup>c, d, e</sup>
<i>L. zeae</i>	50,4 <sup>c</sup>	86 <sup>a</sup>	3,1 <sup>d</sup>	9,8 <sup>b, c</sup>	95,5 <sup>a</sup>	93,4 <sup>a</sup>	93,2 <sup>a</sup>	59,1 <sup>e, f</sup>
<i>L. bulgaricus</i>	76,3 <sup>a, b</sup>	87,1 <sup>a</sup>	2,4 <sup>d</sup>	13,4 <sup>b, c</sup>	2,1 <sup>g</sup>	66,2 <sup>b</sup>	ND	51,1 <sup>f</sup>
<i>B. bifidum</i>	54,3 <sup>c</sup>	83,5 <sup>a</sup>	28,8 <sup>b, c</sup>	10,0 <sup>b, c</sup>	30,3 <sup>e</sup>	40,8 <sup>c</sup>	54,3 <sup>d, e</sup>	44,4 <sup>f</sup>
<i>L. curvatus</i>	85,5 <sup>a</sup>	31,4 <sup>b</sup>	42,3 <sup>b</sup>	23,1 <sup>b</sup>	9,4 <sup>f</sup>	82,9 <sup>a, b</sup>	56,0 <sup>d, e</sup>	79,8 <sup>b, c, d</sup>
<i>L. paracasei</i>	90,6 <sup>a</sup>	23,0 <sup>b</sup>	54,7 <sup>a</sup>	19,6 <sup>b, c</sup>	86,2 <sup>b</sup>	91,9 <sup>a</sup>	95,2 <sup>a</sup>	94,1 <sup>a, b</sup>
<i>B. longum</i>	47,4 <sup>c</sup>	22,2 <sup>b</sup>	29,0 <sup>b, c</sup>	12,4 <sup>b, c</sup>	75,5 <sup>c</sup>	75,1 <sup>a, b</sup>	96,2 <sup>a</sup>	97,9 <sup>a</sup>
<i>L. breve</i>	55,8 <sup>c</sup>	58,7 <sup>a</sup>	21,6 <sup>c</sup>	4,3 <sup>b, c</sup>	86,9 <sup>b</sup>	80,3 <sup>a, b</sup>	68,8 <sup>c</sup>	73,5 <sup>c, d, e</sup>
<i>L. fermentum</i>	62,3 <sup>b, c</sup>	59,4 <sup>a</sup>	15,7 <sup>c</sup>	3,7 <sup>b, c</sup>	95,3 <sup>a</sup>	88,4 <sup>a, b</sup>	50,6 <sup>e</sup>	66,5 <sup>d, e</sup>

<sup>a, b, c, d, e, f, g</sup> : Résultat d'un test de Student-Newman-Keuls (SNK) à 5%. Les valeurs dans une colonne donnée avec une même lettre ne sont pas statistiquement différentes

**Tableau 16:** Pourcentage d'activité enzymatique (cFDA) des souches du projet après différentes perturbations représentatives du procédé de fabrication ou du tractus digestif

Souches	Stress osmotique	Congélation / décongélation	Lyophilisation	Séchage en couche mince	Fluide gastrique	Fluide intestinal	Sels biliaires	Stress oxydant
<i>L. plantarum</i>	56,4 <sup>d</sup>	98,2 <sup>a</sup>	70,6 <sup>a</sup>	66,1 <sup>a</sup>	35,1 <sup>b</sup>	97,2 <sup>a, b</sup>	94,6 <sup>b</sup>	98,8 <sup>a</sup>
<i>L. casei</i>	92,8 <sup>a</sup>	95,4 <sup>a</sup>	1,7 <sup>d</sup>	12,6 <sup>b</sup>	25,0 <sup>b</sup>	87,8 <sup>c</sup>	83,1 <sup>d</sup>	64,8 <sup>b, c</sup>
<i>L. zeae</i>	95,3 <sup>a</sup>	84,8 <sup>a, b</sup>	10,9 <sup>d</sup>	14,1 <sup>b</sup>	78,9 <sup>a</sup>	97,6 <sup>a, b</sup>	98,4 <sup>a</sup>	85,0 <sup>a, b</sup>
<i>L. bulgaricus</i>	96,9 <sup>a</sup>	95,1 <sup>a</sup>	4,4 <sup>d</sup>	20,9 <sup>b</sup>	ND	98 <sup>a</sup>	90 <sup>c</sup>	84,8 <sup>a, b</sup>
<i>B. bifidum</i>	99,8 <sup>a</sup>	89,8 <sup>a</sup>	69,1 <sup>a</sup>	79,6 <sup>a</sup>	89,2 <sup>a</sup>	84,5 <sup>c, d</sup>	96,6 <sup>a, b</sup>	95,5 <sup>a</sup>
<i>L. curvatus</i>	77,1 <sup>c</sup>	82 <sup>a, b</sup>	66 <sup>a</sup>	64,5 <sup>a</sup>	4,2 <sup>c</sup>	92,8 <sup>b</sup>	94,8 <sup>b</sup>	94,9 <sup>a</sup>
<i>L. paracasei</i>	85,2 <sup>b</sup>	33 <sup>d</sup>	49 <sup>b</sup>	19,8 <sup>b</sup>	77,6 <sup>a</sup>	80,9 <sup>d</sup>	98,7 <sup>a</sup>	95,6 <sup>a</sup>
<i>B. longum</i>	31,8 <sup>e</sup>	51,5 <sup>c</sup>	30,9 <sup>c</sup>	18,6 <sup>b</sup>	94,0 <sup>a</sup>	82,2 <sup>d</sup>	99,5 <sup>a</sup>	96,5 <sup>a</sup>
<i>L. breve</i>	85,1 <sup>b</sup>	68,2 <sup>b</sup>	16,5 <sup>d</sup>	2,5 <sup>b</sup>	68,1 <sup>a</sup>	56,1 <sup>e</sup>	90,2 <sup>c</sup>	60,1 <sup>c</sup>
<i>L. fermentum</i>	96 <sup>a</sup>	93,9 <sup>a</sup>	16,2 <sup>d</sup>	3,7 <sup>b</sup>	42,9 <sup>b</sup>	96,7 <sup>a, b</sup>	97,6 <sup>a, b</sup>	84,9 <sup>a, b</sup>

<sup>a, b, c, d, e, f</sup> : Résultat d'un test de Student-Newman-Keuls (SNK) à 5%. Les valeurs dans une colonne donnée avec une même lettre ne sont pas statistiquement différentes

### 2.2.3. Discussion

Nous avons développé des tests de criblage rapides qui, grâce à l'utilisation de la cytométrie en flux, permettent de comparer un grand nombre de souches en termes de viabilité et de vitalité. De plus, la détermination des structures à l'origine de l'effet probiotique ainsi que le développement de sondes fluorescentes spécifiques devrait permettre rapidement d'être encore plus précis dans la caractérisation des souches.

Le séchage sur couche mince permet de sélectionner les souches les plus résistantes au séchage. Cette technique a été améliorée en séchant les micro-organismes dans des plaques 24 puits et en mesurant la reprise d'activité par suivi de la DO. Si les résultats du séchage en plaques donnent également *L. paracasei*, *L. plantarum* et *L. curvatus* comme étant les 3 souches les plus résistantes à la déshydratation, la suite du classement est différente de celui obtenu par lyophilisation et séchage sur couche mince. Ceci est peut être dû à la sensibilité de la méthode. En effet, il est difficile de voir des différences inférieures à un demi log de destruction avec cette méthode.

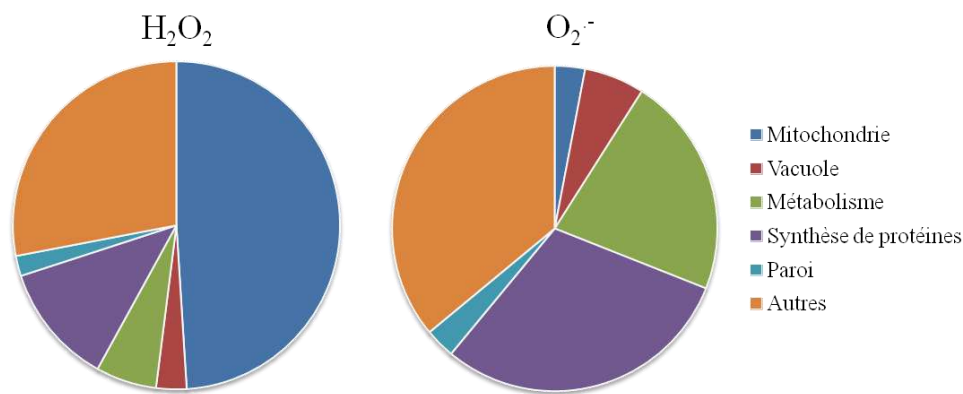
**Tableau 17:** Classement de la résistance des souches du projet selon le type de séchage. La souche classée en n°1 étant considérée comme la plus résistante au séchage. Ce classement ne tient pas compte du % de viabilité.

	Classement lyophilisation	Classement couche mince	Classement couche mince (plaques 24 puits)
1	<i>L. paracasei</i> CNRZ 1328	<i>L. plantarum</i> CNRZ 1997	<i>L. curvatus</i> CNRZ 2243
2	<i>L. curvatus</i> CNRZ 2243	<i>L. curvatus</i> CNRZ 2243	<i>L. paracasei</i> CNRZ 1328
3	<i>L. plantarum</i> CNRZ 1997	<i>L. paracasei</i> CNRZ 1328	<i>L. plantarum</i> CNRZ 1997
4	<i>B. longum</i> ATCC 15707	<i>L. bulgaricus</i> CIP 104	<i>B. bifidum</i> CIP 56.7
5	<i>B. bifidum</i> CIP 56.7	<i>B. longum</i> ATCC 15707	<i>L. casei</i> DN 114-001
6	<i>L. brevis</i> LBR01	<i>B. bifidum</i> CIP 56.7	<i>L. bulgaricus</i> CIP 104
7	<i>L. fermentum</i> ME-3	<i>L. zae</i> CNRZ 2268	<i>L. fermentum</i> ME-3
8	<i>L. zae</i> CNRZ 2268	<i>L. brevis</i> LBR01	<i>L. zae</i> CNRZ 2268
9	<i>L. casei</i> DN 114-001	<i>L. fermentum</i> ME-3	<i>B. longum</i> ATCC 15707
10	<i>L. bulgaricus</i> CIP 104	<i>L. casei</i> DN 114-001	<i>L. brevis</i> LBR01

La mesure de la résistance des souches à un stress osmotique et un stress oxydant a permis la réalisation d'un diagramme. Ce dernier est assez bien corrélé avec les résultats obtenus en lyophilisation. Il permet nettement de discriminer les souches résistantes et les souches

fragiles. De plus, il permet de comparer la sensibilité de chaque souche aux perturbations osmotiques et oxydantes. A partir de ces résultats, il est possible de protéger spécifiquement la bactérie sélectionnée. Cependant, si cette technique permet déjà de déterminer les souches les plus facilement industrialisables, des améliorations devront être apportées aux tests :

- Pour les deux composantes, la détermination de leur poids respectif
- Pour le stress oxydant, il est nécessaire de faire correspondre l'intensité du stress au niveau d'oxydation lors d'un séchage. En effet, la ménadione est un agent générateur de l'anion superoxide. Or, il paraît assez probable que cette espèce réactive ne soit pas la seule présente lors d'un séchage. Une étude de 2004 montre que la réponse au stress des microorganismes est différente en fonction de l'oxydant et qu'une seule molécule ne peut être représentative d'un stress oxydant (Thorpe et al. 2004). La Figure 44 détaille le type de mutant de levure affecté par un stress oxydant avec  $H_2O_2$  ou  $O_2^{\cdot-}$ .



**Figure 44:** Types de mutants de *S. cerevisiae* affectés par un stress oxydant effectué avec du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou de la ménadione ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Thorpe et al. 2004)

Ces résultats soulignent que les conséquences du peroxyde d'hydrogène et de l'anion superoxide sont différentes pour les cellules. Ils suggèrent d'utiliser plusieurs oxydants. De plus, la présence simultanée du peroxyde d'hydrogène et de l'anion superoxide catalyse la production du radical hydroxyle (réaction de Fenton), une molécule particulièrement létale.

- Pour le stress mécanique, la réalisation d'un stress mécanique d'intensité comparable à celui d'un séchage nécessite l'utilisation de glycérol. Or, ce soluté est perméant et très visqueux. Cette dernière caractéristique ne facilite pas l'étape d'analyse en cytométrie en flux. L'utilisation de NaCl oblige à réaliser des stress osmotique d'intensité modérée ( $a_w > 0,75$ ). Or, il semble que certaines souches peuvent relativement bien résister jusqu'à des  $a_w$  de 0,80 et être plus sensibles à des  $a_w$  inférieures. D'autre part, certains auteurs ont montré que le stress oxydant était présent lors de perturbations avec du NaCl. Il faudrait donc réaliser des tests avec du NaCl dégazé.

*Plusieurs tests de criblage de la résistance des souches au procédé de fabrication et aux perturbations du tractus ont été mis en place. Pour chaque test, l'intégrité structurale (IP) et fonctionnelle (cFDA) sont mesurés par cytométrie en flux.*

*Parmi l'ensemble des souches testées, les bactéries *L. plantarum*, *L. curvatus* et *L. paracasei* présentent le meilleur taux de survie au séchage. Les résultats des tests de criblage du tractus gastro-intestinal révèlent une meilleure résistance de *L. plantarum* et *L. paracasei*. Enfin, la souche *L. plantarum* possède le taux de productivité le plus élevé.*

*En conclusion, les tests de criblage procédé/tractus montrent que la souche *L. plantarum* CNRZ 1997 possède la plus forte résistance combinée.*

### 3. Essais de stratégies de protection innovantes

Lorsqu'il est nécessaire d'industrialiser et de sécher une souche sensible à la déshydratation, plusieurs stratégies de préservation sont possibles. Nous avons choisi d'en développer plus particulièrement trois, en tentant toujours d'adapter le procédé à la sensibilité de la souche :

- Pour limiter les phénomènes mécaniques, des adjuvants de séchage (tréhalose et saccharose) ont été utilisés en lyophilisation et lors d'un séchage par formation de mousses.
- Pour protéger les probiotiques lors du séchage et du passage de l'estomac, les bactéries ont été encapsulées au sein d'une matrice alginate-protéines de pois.
- Pour diminuer l'impact du stress oxydant, une bactérie fragile a été séchée par co-séchage avec une bactérie réductrice.

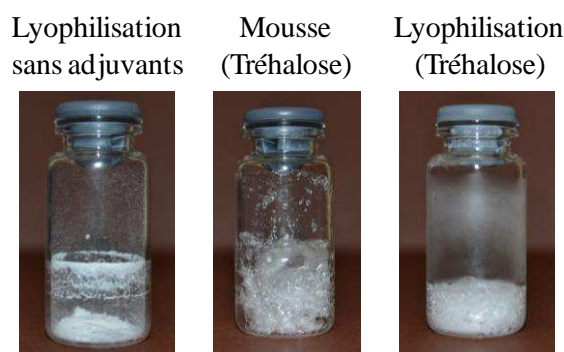
#### 3.1. Séchage par formation de mousses

Tout d'abord, l'impact de l'addition de tréhalose ou de saccharose lors du procédé de lyophilisation a été mesuré sur la viabilité de trois souches probiotiques. Puis, l'effet sur les caractéristiques fonctionnelles des souches a été estimé. Enfin, le procédé de lyophilisation a été comparé à une autre technique nécessitant également des adjuvants, la déshydratation par formation de mousses.

##### 3.1.1. Impact des adjuvants de séchage sur le taux de survie

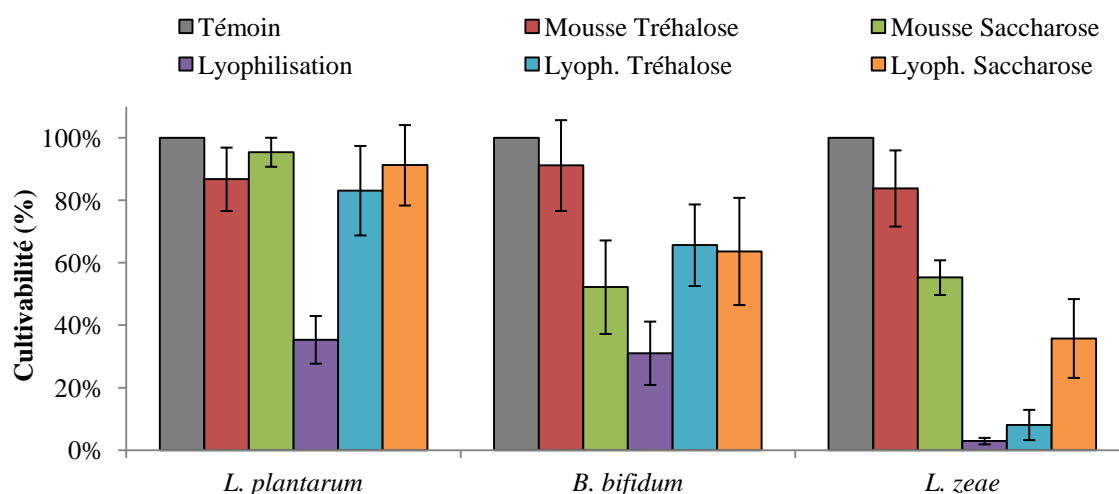
L'objectif des expérimentations présentées ici est de mesurer l'impact de deux adjuvants de séchage, le tréhalose et le saccharose, sur la survie microbienne lors d'un séchage en lyophilisation ou par formation de mousse. La Figure 45 permet de visualiser la structure à l'état sec après lyophilisation sans adjuvants, lyophilisation en présence de tréhalose ou séchage par formation de mousse en présence de tréhalose. La structure est différente, plus aérée, dans le cas d'un séchage en mousse. Sur la photo, le volume occupé par la poudre lyophilisée est largement inférieur à celui séché en présence de sucre. Le volume sec occupé lors d'une déshydratation par formation de mousse est le plus important.





**Figure 45 :** Photo des flacons après lyophilisation sans adjuvants ou séchage par formation de mousse et lyophilisation avec du tréhalose

Pour les trois souches, la présence de saccharose ou de tréhalose améliore fortement la survie au séchage. Pour la souche *L. plantarum*, les taux de survie sont très proches entre les deux méthodes de séchage, en présence d'adjuvants (> 80%). Concernant les deux autres bactéries, la survie est optimale après déshydratation par formation de mousse en présence de tréhalose. Les autres conditions améliorent le taux de survie, mais de façon moins importante. Pour la souche *L. zae*, la déshydratation par formation de mousse est significativement plus efficace que la lyophilisation. De plus, le tréhalose préserve mieux les cellules par formation de mousse alors que le saccharose est plus efficace en lyophilisation. D'autres études ont déjà publié un effet différent du saccharose et du tréhalose, à même concentration, lors du procédé de lyophilisation (Siaterlis et al. 2009).



**Figure 46:** Cultivabilité des souches probiotiques sur milieu gélosé après déshydratation par formation de mousses ou lyophilisation. Les bactéries ont été séchées en présence de tréhalose ou de saccharose et réhydratées dans du PBS à 25 °C.

Zhao et Zhang ont observé une meilleure préservation de la souche *L. brevis* en présence de 10% de tréhalose par rapport à 10% de saccharose alors qu'il n'y avait pas de différences entre les deux sucres pour la souche *O. oeni* (Zhao and Zhang 2005). Ainsi, la préservation de

la viabilité des souches dépend non seulement de la nature du protectant mais également de la technique de déshydratation utilisée.

### 3.1.2. Impact des adjuvants de séchage sur l'intégrité des cellules

Des expérimentations complémentaires ont été menées pour mesurer l'impact des traitements de déshydratation en présence d'adjuvants sur l'intégrité membranaire, l'activité enzymatique et la capacité de division des cellules. L'intégrité membranaire et l'activité enzymatique ont été mesurées par cytométrie en flux, à l'aide de deux sondes fluorescentes, l'iodure de propidium et la carboxyfluoresceine diacétate. Ces paramètres sont également importants dans la préservation de la fonctionnalité probiotique puisque, si les mécanismes d'action sont encore largement inconnus, la fonctionnalité des souches probiotiques est généralement reliée à des propriétés de surface (Lebeer et al. 2010) ou à la synthèse de métabolites (Sokol et al. 2008).

Les résultats de perméabilisation sont assez proches de ceux obtenus en cultivabilité (Figure 47). Ce parallèle est logique car l'IP est souvent utilisé pour mesurer la viabilité des cellules.

	Témoin	Lyophilisation	Lyophilisation (tréhalose)	Lyophilisation (saccharose)	Mousse (tréhalose)	Mousse (saccharose)	
Cellules non perméabilisées (%)	<i>L. plantarum</i>	94%	38%	87%	80%	92%	89%
	<i>B. bifidum</i>	97%	36%	87%	83%	78%	83%
	<i>L. zae</i>	98%	2%	7%	30%	78%	75%
Activité enzymatique (%)	<i>L. plantarum</i>	97%	75%	89%	95%	85%	95%
	<i>B. bifidum</i>	98%	77%	98%	90%	96%	94%
	<i>L. zae</i>	98%	15%	27%	63%	88%	89%
Reprise d'activité (heures)	<i>L. plantarum</i>	12	18	13	12	12	12
	<i>B. bifidum</i>	18	25	20	19	19	19
	<i>L. zae</i>	10	16	14	12	10	11

**Figure 47:** Intégrité des souches *L. plantarum*, *B. bifidum* et *L. zae* après déshydratation par formation de mousses ou lyophilisation. Les bactéries ont été séchées en présence de tréhalose ou de saccharose et réhydratées dans du PBS à 25 °C. Le pourcentage de cellules non perméabilisées et le pourcentage d'activité enzymatique ont été mesurés par cytométrie en flux. Le temps de reprise d'activité des cellules, correspondant au temps nécessaire pour atteindre le milieu de la phase exponentielle de croissance, a été mesuré à l'aide d'un lecteur de plaques.

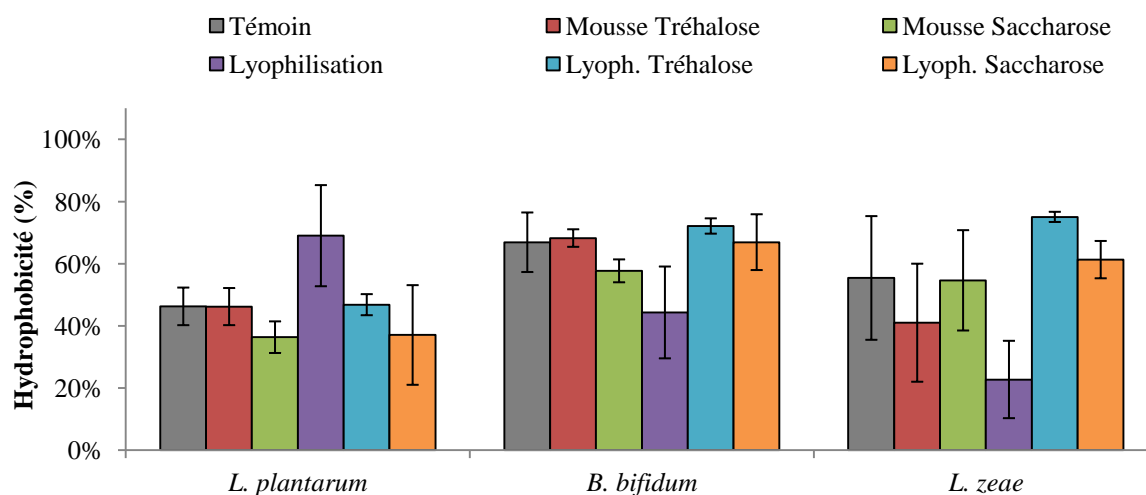
La présence de sucres, tréhalose et saccharose, améliore la préservation de l'intégrité membranaire sauf dans le cas d'une lyophilisation en présence de tréhalose pour la souche *L. zaeae*. Ce phénomène a déjà été mis en évidence sur les souches *E. coli* DH5a et *Bacillus thuringiensis* HD-1 (Leslie et al. 1995). L'effet protecteur des sucres a été attribué à leur capacité à réduire la température de transition de phase de la membrane et à maintenir la structure protéique à l'état sec. Pour les souches *L. plantarum* et *B. bifidum*, les taux de cellules non perméabilisées sont semblables entre les deux méthodes de séchage, que ce soit en présence de tréhalose ou de saccharose. En revanche pour la souche *L. zaeae*, la déshydratation par formation de mousses permet une meilleure préservation de la structure membranaire. L'activité enzymatique des souches *L. plantarum* et *B. bifidum* n'est que peu altérée par la lyophilisation sans adjuvants. Ainsi, l'ajout de tréhalose ou de saccharose permet d'obtenir des valeurs proches de celles du témoin, pour la lyophilisation mais aussi pour la déshydratation par formation de mousses. Pour la souche *L. zaeae*, la déshydratation par formation de mousses permet d'avoir une meilleure conservation de l'activité enzymatique, les deux sucres ayant un effet similaire. Encore une fois pour cette souche, le saccharose est significativement plus efficace que le tréhalose dans le cas d'un séchage par lyophilisation.

Enfin, la capacité de division des cellules a été évaluée en mesurant la reprise de croissance des cellules après séchage. On observe une forte augmentation du temps nécessaire pour atteindre le milieu de la phase exponentielle de croissance lors de la lyophilisation sans adjuvants, par rapport à l'état physiologique pour les trois souches (Figure 45). L'utilisation de sucres pendant la lyophilisation diminue ce temps de reprise d'activité, sans revenir pour autant aux valeurs obtenues pour les souches non traitées. Pour *L. plantarum*, *B. bifidum* et *L. zaeae*, la lyophilisation avec du saccharose permet une meilleure reprise de croissance que le tréhalose. Pour les trois souches, la déshydratation par formation de mousses permet la reprise d'activité la plus rapide, avec des temps non significativement différents des cellules non séchées. Pour cette méthode de déshydratation, il n'y a pas de différences entre saccharose et tréhalose.

### 3.1.3. Impact des adjuvants de séchage sur la fonctionnalité probiotique

La fonctionnalité probiotique a été évaluée par la mesure de l'hydrophobicité de surface et la capacité immuno-stimulante des souches avant et après séchage. Les valeurs obtenues lors de la lyophilisation des bactéries sans adjuvants montrent une augmentation du

pourcentage d'hydrophobicité pour la souche *L. plantarum* et une diminution pour les souches *B. bifidum* et *L. zeae*. Seule la lyophilisation sans adjuvants altère significativement l'hydrophobicité de surface. Pour les trois souches, il semble que les deux techniques de déshydratation testées ne modifient pas les propriétés de surface des micro-organismes, en présence de tréhalose ou de saccharose.



**Figure 48:** Pourcentage d'hydrophobicité des souches après déshydratation par formation de mousses ou lyophilisation. Les bactéries ont été séchées en présence de tréhalose ou de saccharose et réhydratées dans du PBS à 25 °C.

Les deux procédés en présence de sucres n'engendrent pas de modifications significatives des propriétés d'adhésions des souches. Enfin, le potentiel immuno-modulateur a été testé après séchage en présence d'adjuvants. Pour ce test, les expériences ont été menées avec des PBMC provenant d'un donneur différent des PBMC utilisées précédemment (1.2.1).

Les résultats montrent des modifications significatives de la production d'IL-10 après lyophilisation sans adjuvants et en présence de tréhalose. Les niveaux d'IL-12p70 sont très faibles pour toutes les conditions testées et ne permettent pas de mesurer l'impact des différentes conditions.

**Tableau 18:** Evolution de la composante pro-inflammatoire (IL-12p70) et anti-inflammatoire (IL-10) de la souche *B. bifidum* après séchage par formation de mousses et lyophilisation.

	IL-10	IL-12p70	Ratio IL-10/IL-12p70
Témoign	309 (± 35)	< 1	> 309
Mousse (tréhalose)	396 (± 39)	< 1	> 396
Mousse (saccharose)	248 (± 58)	< 1	> 248
Lyophilisation (sans adjuvants)	196 (± 22) *	< 1	> 196
Lyophilisation (tréhalose)	510 (± 59) *	< 1	> 510
Lyophilisation (saccharose)	381 (± 22)	< 1	> 381

Ainsi, les techniques qui semblent préserver le mieux la souche *B. bifidum* (viabilité et fonctionnalité) sont le séchage par formation de mousse (tréhalose ou saccharose) et la lyophilisation avec du saccharose. Cependant, ces tests doivent être complétés car le lot de PBMC utilisé ne produit que très peu d'IL-12. Or, nous avons observé précédemment un impact fort du séchage sur la composante pro-inflammatoire.

### 3.2. Utilisation de cinétiques lentes (encapsulation)

Nous avons vu précédemment que l'utilisation de cinétiques lentes de déshydratation et de réhydratation favorisait la survie des levures et des bactéries (1.1.3.1). Pour ralentir les transferts de matière entre les cellules et leur environnement limiter l'augmentation du rapport s/v, nous avons choisi d'intégrer des bactéries dans un gel protéique. L'objectif de l'encapsulation de micro-organismes probiotique consiste en la préservation du taux de survie et de la fonctionnalité des souches lors du procédé, de la conservation et du passage dans le tractus digestif (estomac). De plus, cette technique permet une libération ciblée d'un grand nombre de cellules microbiennes sur leur site d'action dans le tractus. Une grande variété de substrats ont déjà été testés sur les probiotiques en tant que support d'encapsulation tels que l'alginate, les carraghénanes, la gélatine, les protéines de lactosérum, la méthylcellulose... (Singh 2007). Dans cette section, nous avons souhaité encapsuler les cellules dans un gel fort. L'objectif était de réaliser l'ensemble du procédé à température ambiante.

L'alginate est un hétéro-polysaccharide qui gélifie en présence de calcium et dont la capacité à protéger les bactéries lors du passage de l'estomac est faible (Lee and Heo 2000). L'utilisation de mélange alginate-protéine de pois permet de former des gels plus forts et ces matrices d'encapsulation ont fait l'objet de récentes études (Klemmer 2011; Krasaekoopt et al. 2004). Les protéines de pois sont principalement des globulines (11S légumine et 7S viciline) extraites de graines de pois jaune qui peuvent être utilisées pour être incorporées dans des matrices alimentaires. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Jean-Luc Messin et Rémi Saurel (UMR PAM). Messin et al., ont décrit précédemment les caractéristiques d'une matrice alginate-protéines de pois à l'échelle macroscopique et microscopique (Messin et al. 2012b).

#### 3.2.1. Impact sur la survie des cellules

La survie de deux bactéries probiotiques, *L. plantarum* et *L. zaeae*, a été mesurée après encapsulation soit dans une matrice d'alginate, soit dans une matrice d'alginate-protéines de

pois. La viabilité a également été évaluée après séchage sous air à température ambiante et réhydratation dans un tampon phosphate.

		Témoin	Gel d'alginate	Gel d'alginate sec	Gel d'alginate-pois	Gel d'alginate-pois sec
Cultivabilité (%)	<i>L. plantarum</i>	100%	82%	7%	86%	69%
	<i>L. zae</i>	100%	92%	5%	99%	52%
Cellules non perméabilisées (%)	<i>L. plantarum</i>	99%	90%	46%	91%	92%
	<i>L. zae</i>	98%	86%	47%	87%	86%
Activité enzymatique (%)	<i>L. plantarum</i>	99%	83%	46%	55%	40%
	<i>L. zae</i>	98%	39%	18%	48%	57%

**Figure 49:** Intégrité des souches *L. plantarum* et *L. zae* après encapsulation et séchage dans une matrice d'alginate seul ou alginate-protéines de pois. Les bactéries ont d'abord été intégrées dans un gel d'alginate seul ou d'alginate-protéines de pois. Après 12 heures de gélification, les gels contenant les bactéries ont été séchés dans une enceinte contenant du LiCl (0,11) à 25 °C pendant une nuit puis réhydratés dans un tampon phosphate. La cultivabilité a été mesurée sur du milieu MRS solide. Le pourcentage de cellules non perméabilisées et le pourcentage d'activité enzymatique ont été mesurés par cytométrie en flux

Pour les deux souches, l'encapsulation dans une matrice alginate ou alginate-protéines de pois ne modifie pas significativement le taux de survie (> 82%). La légère perte de viabilité observée, similaire pour les deux matrices d'encapsulation, est peut-être due à la présence d'ions dans le milieu. Après séchage, le taux de survie de la souche *L. plantarum* passe de 82% à 7% en présence d'alginate et de 86% à 69% dans une matrice alginate-protéines de pois. Pour la souche *L. zae*, la viabilité après séchage est de 5% en présence d'alginate et 52% avec le mélange alginate-protéines de pois. Ainsi, la matrice alginate-protéine de pois permet une augmentation forte de la survie au séchage des deux souches probiotiques testées. En effet, ces résultats de viabilité sont supérieurs ou égaux à ceux obtenus lors d'une lyophilisation en présence d'adjuvants. Pour *L. zae*, seule la déshydratation par formation de mousse en présence de tréhalose donne un meilleur taux de survie que l'encapsulation (83% vs 52%). Pour *L. plantarum* et *L. zae*, le procédé d'encapsulation n'altère pas la fonction barrière de la membrane en présence d'alginate ou d'un mélange alginate-protéines de pois. De même, pour les deux souches après séchage dans une matrice alginate-protéines de pois. Ainsi, la perte de cultivabilité observée précédemment pour la souche *L. zae* lors du séchage en présence de protéines de pois, n'a pas pour origine une perte d'intégrité membranaire.

Le séchage dans une matrice d'alginate entraîne une perméabilisation de 54% et 53% des cellules respectivement pour les souches *L. plantarum* et *L. zaeae*. Là encore, le nombre de cellules non perméabilisées est largement supérieur au nombre de cellules cultivables. L'activité enzymatique des souches *L. plantarum* et *L. zaeae* est altérée par le procédé de gélification en présence d'alginate ou d'un mélange alginate-protéines de pois. Ainsi l'activité enzymatique est de 83% et 55% respectivement après encapsulation dans une matrice d'alginate et alginate-protéine de pois pour la souche *L. plantarum* et 39% et 48% respectivement pour *L. zaeae*. Ensuite, le procédé de séchage ne modifie que très peu l'activité estérase des souches.

### 3.2.2. Impact sur la fonctionnalité cellulaire

Le potentiel immuno-modulateur des souches a été mesuré après encapsulation et séchage dans une matrice alginate-protéines de pois. Pour cette expérimentation, nous avons choisi de tester l'impact des bactéries et de la matrice sur les PBMC pour mimer l'ingestion de bactéries encapsulées dans une matrice alginate-protéines de pois (Tableau 19).

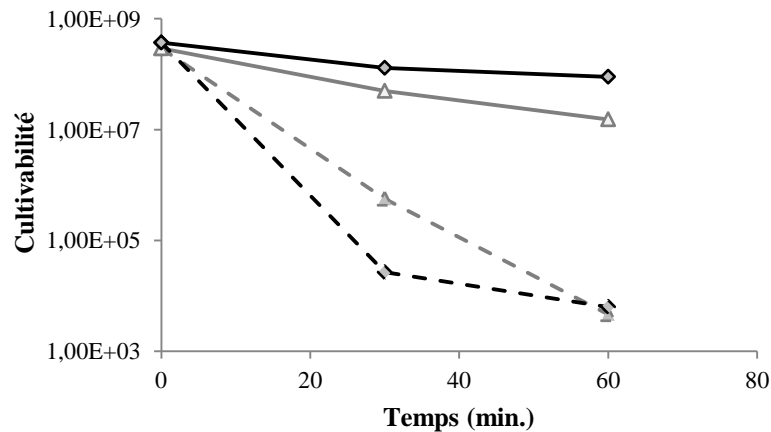
Les résultats montrent des différences significatives entre les échantillons encapsulés et les témoins. Or, pour les échantillons qui avaient été testés sans adjuvants, nous avons mis en évidence une préservation de la fonctionnalité lors du séchage. Plusieurs explications sont possibles pour expliquer ces différences. La plus probable étant un effet de la matrice. D'autres expériences sont prévues pour observer l'impact du traitement sur les bactéries seules et quantifier l'effet de l'alginate et des protéines de pois sur les PBMC.

**Tableau 19:** Evolution de la composante pro-inflammatoire (IL-12p70) et anti-inflammatoire (IL-10) des souches *L. plantarum* et *L. zaeae* après encapsulation et séchage dans une matrice alginate-protéines de pois. Les bactéries ont été encapsulées dans une matrice alginate-protéines de pois, séchées durant une nuit et réhydratées dans un tampon phosphate avant la mise en contact avec les PBMC.

	IL-10	IL-12p70	Ratio IL-10/IL-12p70
Témoin <i>L. plantarum</i> (Bactéries seules)	451 (± 157)	16 (± 14)	34 (± 11)
Après encapsulation et séchage			
(Bactéries + alginate + protéines de pois)	560 (± 85) *	< 1 ***	> 560 ***
Témoin <i>L. zaeae</i> (Bactéries seules)	234 (± 17)	40 (± 4)	6 (± 1,5)
Après encapsulation et séchage			
(Bactéries + alginate + protéines de pois)	198 (± 14)	< 1 ***	> 198 ***

### 3.2.3. Impact sur la résistance à l'acidité gastrique

La résistance à l'acidité gastrique des souches probiotiques dans une matrice alginate-protéines de pois a été évaluée (Figure 50). Pour cette expérience, les bactéries seules ou encapsulées ont été incubées dans un milieu simulant le passage de l'intestin (pH=1,8 – 3g/L pepsine), préalablement décrit dans la bibliographie (Doherty et al. 2011).



**Figure 50:** Résistance au passage de l'estomac des souches *L. plantarum* et *L. zaeae* encapsulées dans une matrice alginate-protéines de pois. La bactérie *L. plantarum* seule (--) ou encapsulée (—) et la bactérie *L. zaeae* seule (--) ou encapsulée (—) ont été testées.

Tout d'abord, la viabilité des bactéries libres est fortement affectée par l'acidité gastrique. Ainsi, le nombre de cellules viables passe de  $3.10^8$  UFC à  $3.10^4$  UFC après 30 minutes et  $6.10^3$  UFC après 60 minutes pour la souche *L. plantarum* et de  $3.10^8$  UFC à  $5.10^5$  UFC après 30 minutes et  $5.10^3$  UFC après 60 minutes pour la souche *L. zaeae*. L'encapsulation dans une matrice alginate-protéines de pois permet de préserver fortement la cultivabilité des souches avec des taux de survie de  $9.10^7$  UFC et  $2.10^7$  UFC après 60 minutes, respectivement pour les souches *L. plantarum* et *L. zaeae*. La perte de survie peut être due à la présence des sels ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ...), qui peuvent déstabiliser la matrice et entraîner la libération de bactéries. De même, la présence de protéases (pepsine) peut avoir un effet similaire. Or, lorsqu'ils sont libres, les deux micro-organismes sont très sensibles à l'acidité stomacale. Des résultats proches ont été observés avec la bactérie *B. adolescentis* encapsulée dans une matrice alginate-protéines de pois (Klemmer et al. 2011).

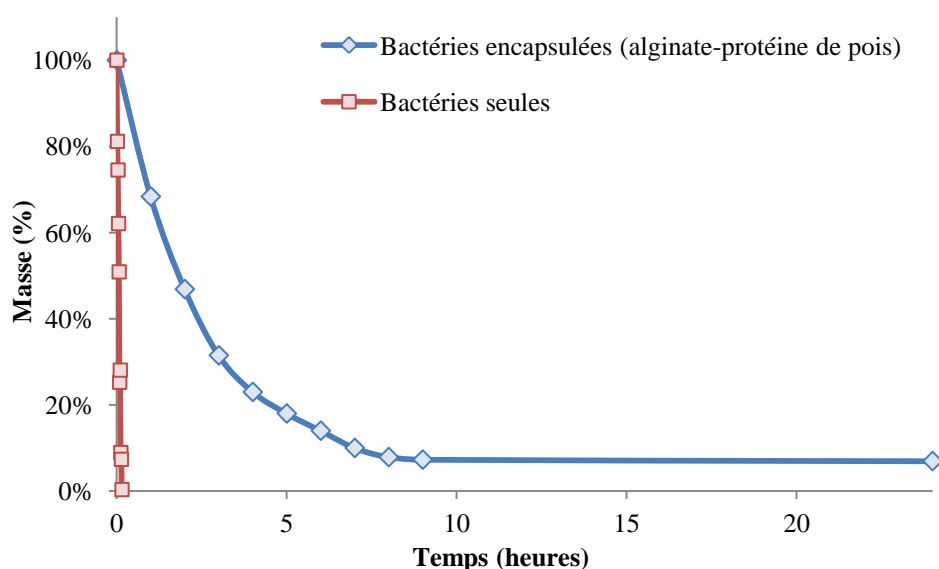
### 3.2.4. Mécanisme d'action

Cette étude met en avant l'utilisation d'un procédé de gélification et de séchage à température ambiante avec des protéines de pois globulaires et de l'alginate pour protéger des bactéries probiotiques. Tout d'abord, la gélification du système est due à la réduction globale



des répulsions électrostatiques entre les bio-polymères. La glucono- $\delta$ -lactone permet l'acidification du mélange et la libération d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du carbonate de calcium. La caractérisation des propriétés mécaniques et de la microstructure du gel a été effectuée par une autre équipe de l'UMR PAM (Mession et al. 2012a; Mession et al. 2012b).

Les résultats précédents ont mis en évidence que la survie de la souche *L. zea* au séchage, notamment à la lyophilisation, était très faible. Cette sensibilité a été attribuée à la faible tolérance de la souche à la contraction volumique. La figure ci-dessous représente la cinétique de déshydratation de la souche dans une matrice alginate-protéines de pois. Cette cinétique est relativement lente et permet un séchage progressif. D'autres études ont observé un meilleur taux de survie des bactéries lors d'une déshydratation lente. Ainsi, Mille et al., ont montré un taux de survie de la souche *L. plantarum* de 29% lors d'une déshydratation en choc à une  $a_w$  de 0,17 contre 97% de survie pour une déshydratation en 50 minutes ( $0,081 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Mille et al. 2004).



**Figure 51:** Cinétique de séchage de la souche *L. plantarum* encapsulée dans une matrice alginate-protéines de pois

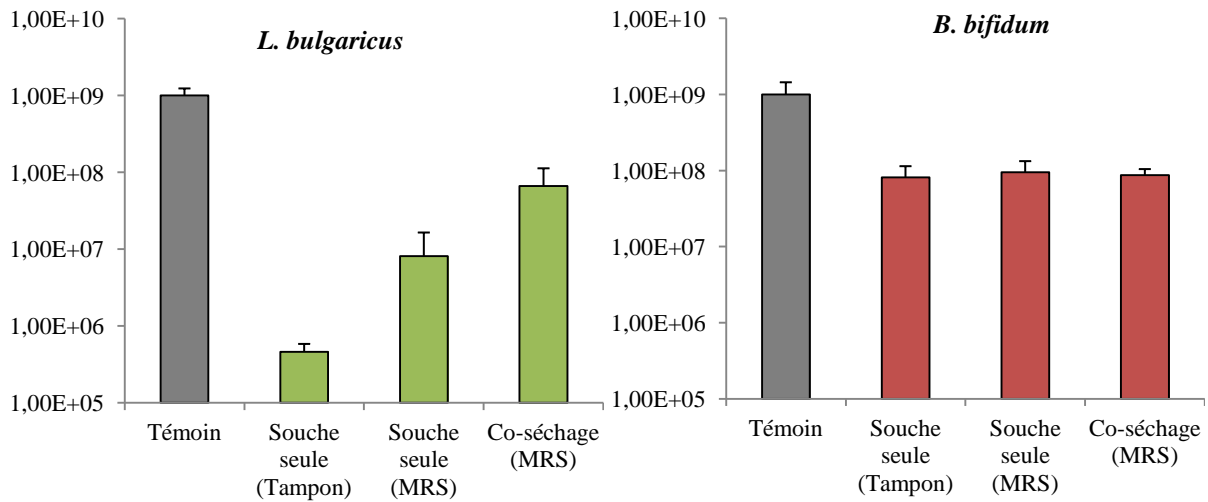
Des résultats similaires ont été décrits sur la levure *S. cerevisiae* avec une survie optimale lors d'une déshydratation lente (Marechal et al. 1999). La vitesse utilisée au cours de nos expérimentations, au moins durant les premières étapes du séchage, est proche de celle utilisée dans cette publication ( $0,011$  vs  $0,009 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Des premières observations réalisées en microscopie confocale en marquant les bactéries avec du Syto9 et les protéines avec de la rhodamine, ont permis de localiser les bactéries dans la matrice alginate-protéines de pois. Les images montrent que les micro-organismes sont situés dans les poches d'alginate. Lors du séchage, on peut penser que le réseau protéique vient entourer et protéger les bactéries. La

présence de ce réseau à l'état sec peut également limiter la contraction volumique des cellules. Des observations de microscopie électronique sont prévues pour valider cette hypothèse. Enfin, le réseau protéique peut également ralentir la vitesse de diminution du rapport s/v lors de l'étape de réhydratation. En effet, les capsules mettent près de 3 heures à se dissoudre et à libérer les bactéries dans le milieu. D'autres travaux ont décrit que des vitesses de réhydratation lentes favorisaient la survie des microorganismes (Dupont et al. 2010; Poirier et al. 1999). Ce procédé de gélification lente s'effectue à température ambiante, ne nécessite pas de matériel particulier autre qu'un récipient permettant de mélanger les composés et permet de donner n'importe quelle forme au matériel encapsulé. Le séchage sous flux d'air permet de préserver la structure du gel et de donner une meilleure résistance à l'acidité. De plus, à la fin de l'étape de séchage, la particule sèche peut être broyée pour réaliser une poudre de microorganisme encapsulée. Cette poudre pourra ensuite être intégrée dans une gélule ou transférée dans un lit fluidisé pour réaliser un coating des particules. Une autre étude montre que l'encapsulation de *L. paracasei* F19 dans une matrice protéique permet une augmentation du taux de survie à la lyophilisation (33% vs 8%) (Heidebach et al. 2010).

### 3.3. Co-séchage d'une bactérie fragile et d'une bactérie résistante

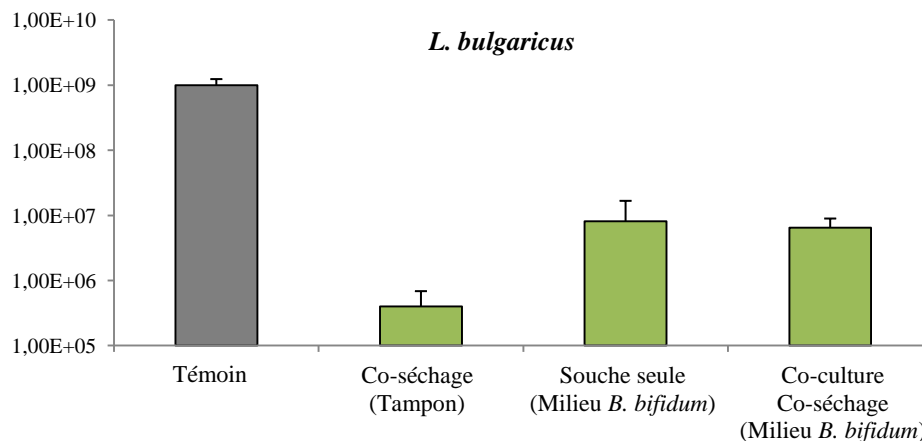
L'objectif de cette étude consiste à optimiser la survie à la déshydratation d'une souche fragile, sans ajout d'additifs mais en la protégeant par une souche bactérienne résistante au séchage. Si la compétition microbienne pour l'accès à l'espace, la lumière ou les nutriments est souvent étudiée, il existe également des exemples positifs de coopération entre espèces bactériennes pour améliorer la croissance (Yonezawa et al. 2010), modifier le métabolisme (Di Cagno et al. 2009; Mathys et al. 2009) ou encore augmenter la survie à des stress environnementaux (Altieri et al. 2008).

La Figure 52 montre le taux de survie des souches probiotiques *L. bulgaricus* et *B. bifidum* après séchage dans du tampon, après séchage dans du milieu de culture ou après culture séparée et co-séchage des deux souches. La souche de bifidobactérie présente un taux de survie très proche (non significativement différent) pour les trois conditions testées. Ces résultats montrent que cette souche probiotique n'est pas sensible à son environnement de déshydratation-réhydratation. A contrario, le lactobacille montre un impact fort de l'environnement dans la résistance au séchage. La viabilité de ce probiotique est fortement augmentée en présence de la souche de Firmicute



**Figure 52:** Taux de survie des souches *L. bulgaricus* (à gauche) et *B. bifidum* (à droite) après séchage dans du tampon, dans du milieu de culture ou culture séparée et co-séchage. Les bactéries ont été séchées dans une enceinte ventilée contenant du LiCl (HR = 11%), maintenues 1h à l'état sec et réhydratées dans du PBS.

. Le mécanisme de protection de *B. bifidum* sur *L. bulgaricus* a été évalué en mesurant le taux de survie de la souche fragile en présence de la bifidobactérie dans du tampon, en présence de son surnageant de culture ou après co-culture et co-séchage (Figure 53). Les résultats ci-dessous indiquent que ni le surnageant, ni la souche seule n'améliorent la tolérance au séchage de *L. bulgaricus*.



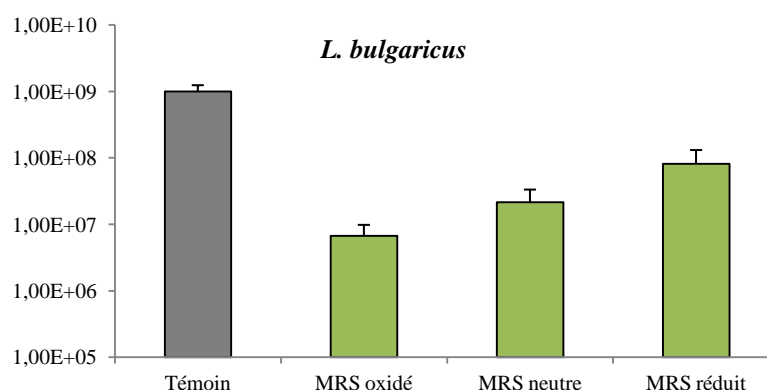
**Figure 53:** Taux de survie de la souche *L. bulgaricus* après séchage en présence de *B. bifidum* dans du tampon, dans le milieu de culture de *B. bifidum* ou après co-culture et co-séchage. Les bactéries ont été séchées dans une enceinte ventilée contenant du LiCl (HR = 11%), maintenues 1h à l'état sec et réhydratées dans du PBS.

La souche *B. bifidum* possède un effet protecteur uniquement lorsque la souche et son milieu de culture sont présents ensemble. Le tableau ci-dessous donne le niveau des principaux paramètres physico-chimiques avant séchage de la souche *L. bulgaricus* dans du tampon, du milieu de culture, après co-culture et co-séchage ou après cultures séparées et co-séchage. La seule grandeur allant dans le même sens que le taux de survie est le potentiel d'oxydoréduction ( $E_h$ ).

**Tableau 20:** Valeurs des principaux paramètres physicochimiques avant séchage

	Tampon	Milieu de culture	Co-culture et co-séchage	Co-séchage
$a_w$	0.988	0.989	0.987	0.989
pH	7.4	4.7	4.7	5.4
Eh7 (mV)	+400	+15	-9	-151
Survie de <i>L. bulgaricus</i>	-	+	+	++

Certains auteurs, ont souligné l'impact de différents micro-organismes sur le potentiel d'oxydoréduction du milieu (Brasca et al. 2007). Les souches de bifidobactéries sont connues pour leur capacité à réduire le milieu. Pour vérifier si cet effet pourrait protéger la souche *L. bulgaricus* pendant le séchage, cette dernière a été séchée dans du milieu de culture réduit, oxydé ou de potentiel d'oxydoréduction neutre (Figure 54). Le milieu a été réduit chimiquement avec de la cystéine. La survie de ce micro-organisme en présence de MRS réduit donne une viabilité similaire à celle obtenue lors du « co-séchage » avec la bifidobactérie.



**Figure 54:** Taux de survie de la souche *L. bulgaricus* dans du milieu de culture oxydé, neutre ou réduit. Les bactéries ont été séchées dans une enceinte ventilée contenant du LiCl (HR = 11%), maintenues 1h à l'état sec et réhydratées dans du PBS.

Il semble donc qu'en réduisant le milieu, la souche de bifidobactérie protège le lactobacille des effets néfastes de l'oxygène pendant le procédé de séchage. Il a déjà été démontré en milieu liquide que la réduction du potentiel redox permettait une meilleure conservation des souches bactériennes au cours du temps (Odamaki et al. 2011). C'est la première fois que le parallèle est fait avec le milieu aérien. D'autres études sont encore nécessaires pour valider l'effet probiotique après séchage. La principale difficulté résulte cependant en la séparation des deux micro-organismes.

Cette étude indique qu'une souche permettant de réduire le potentiel d'oxydoréduction représente une solution intéressante pour améliorer la survie au séchage de bactéries fragiles

sans utiliser d'adjuvants. De plus, la modification du degré d'oxydation du milieu pourrait également avoir d'autres intérêts pour stabiliser ou affaiblir des écosystèmes microbiens (décontamination de surfaces...).

### 3.3.1. Discussion

Trois stratégies de protection ont été testées dans cette section, le développement d'une nouvelle méthode de séchage (déshydratation par formation de mousses), l'optimisation de la résistance au stress mécanique par encapsulation et l'optimisation de la résistance au stress oxydant par co-séchage. Ces techniques présentent l'avantage d'améliorer significativement le taux de survie et de maintenir la fonctionnalité des cellules, des caractéristiques essentielles avant la commercialisation d'un produit probiotique.

La souche la plus sensible au séchage, *L. zaeae*, possède un faible taux de survie (< 5%) lorsqu'elle est déshydratée par lyophilisation sans adjuvants. Le taux de survie augmente fortement en présence d'adjuvants (36% avec du saccharose), par encapsulation (52%) ou lors du séchage par formation de mousse (89%). L'utilisation d'adjuvants améliore la résistance des souches à la lyophilisation et au séchage par formation de mousses. La présence de milieu de culture dans la matrice augmente également la viabilité, probablement en raison de la présence de sucres, d'acides aminés ou d'ions (Trofimova et al. 2010; Tymczyszyn et al. 2007b; Zhao and Zhang 2005). Le MRS peut avoir une action bénéfique au niveau de l'étape de déshydratation mais également lors de la réhydratation (1.1.2.2). Les molécules de sucre peuvent remplacer les molécules d'eau qui hydratent normalement les protéines et la membrane, diminuer la température de transition de phase lipidique ( $T_m$ ), empêcher la dénaturation des protéines et augmenter la température de transition vitreuse ( $T_g$ ). De plus, des composants du milieu tels que l'extrait de levure, la peptone ou le glucose peuvent avoir une activité antioxydante (Shen et al. 2011). Dans cette dernière publication, un effet antioxydant a également été attribué au surnageant de culture de la souche *B. animalis*.

Dans le cas de l'encapsulation, des nouvelles expérimentations sont nécessaires pour tester l'impact du traitement sur la fonctionnalité de la souche seule. A l'heure actuelle dans la bibliographie, seules la viabilité et la résistance aux stress du tractus sont vérifiées après encapsulation (Klemmer et al. 2011). Cette technique permet néanmoins de garder le taux de survie après séchage et passage de l'acidité gastrique. En effet, la dégradation de la capsule est lente et permet une libération des bactéries après le passage de l'estomac. La présence d'ions au niveau de l'intestin grêle pourrait également favoriser la libération de bactérie au

niveau de l'iléon (Klemmer 2011). Cette libération ralentie est due à la présence de protéines de pois, l'alginate seul favorisant une libération rapide des bactéries (< 30 min.) (Chandramouli et al. 2004).

*Le criblage de micro-organismes probiotiques selon leurs aptitudes fonctionnelles peut conduire à sélectionner une souche très sensible au procédé de séchage et/ou à l'acidité gastrique. Pour protéger les bactéries fragiles, trois stratégies ont été étudiées dans cette dernière partie :*

- *la déshydratation par formation de mousses*
- *l'encapsulation dans une matrice alginate-protéines de pois*
- *le coséchage avec une bactérie résistante*

*Ces techniques permettent d'améliorer nettement la survie au séchage et/ou au passage de l'estomac par rapport à la lyophilisation.*

*La fonctionnalité cellulaire ne semble pas affectée par la déshydratation par formation de mousses mais d'autres études avec des lots de PBMC produisant plus d'IL-12 sont encore nécessaires. De même, il convient de vérifier l'effet des protéines de pois sur la production de cytokines.*

#### 4. Sélection d'une souche et production industrielle

Au vu des résultats obtenus lors des essais *in vitro* et des essais souris, la souche *L. plantarum* a été sélectionnée par Merck MF pour son potentiel immuno-stimulant. La souche bactérienne a été produite en fermenteur 60L et séchée par lyophilisation par l'entreprise Biovitis. Pour satisfaire aux contraintes réglementaires, des tests de caractérisation ont été menés sur le lyophilisat. La société Novéal a été sélectionnée pour la préparation des gélules vèrum et placebo. Enfin, nous avons choisi de faire appel à la société CEN Nutriment, en tant que CRO (Contract Research Organization), pour organiser et conduire l'étude clinique chez l'homme.

##### 4.1. Transposition industrielle

La production industrielle de ferments probiotiques se déroule généralement selon une succession d'opérations unitaires schématisées ci-dessous (Figure 55).

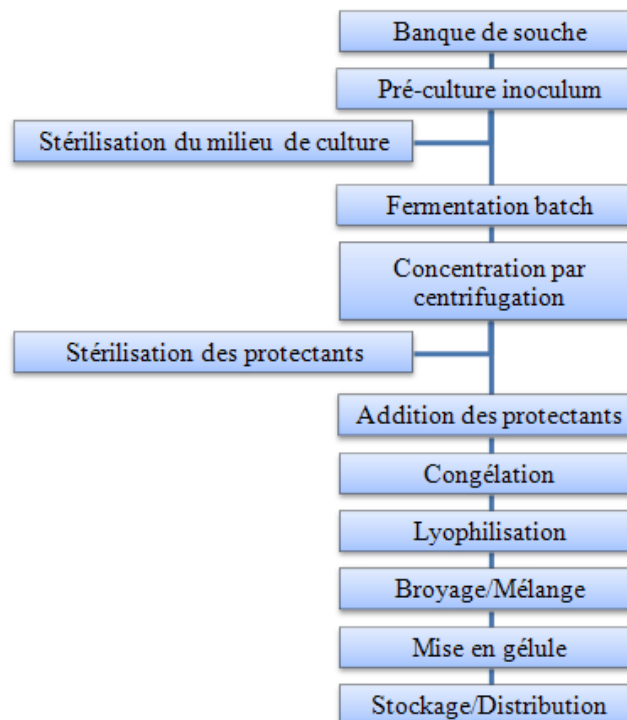


Figure 55: Diagramme de production d'une souche probiotique

Ce diagramme reprend les opérations unitaires suivies pour la production industrielle de la souche *L. plantarum*. Tout d'abord, la souche *L. plantarum* CNRZ 1997 certifiée par le CIRM et validée par l'INRA de Jouy-en-Josas a été récupérée. Puis, nous avons optimisé la

composition du milieu de culture pour augmenter la quantité de biomasse. Nous avons ensuite déterminé les protectants, le cycle de lyophilisation et la forme galénique adéquate pour la souche. La détermination de ces paramètres a permis de lancer la production industrielle et le démarrage d'une étude clinique chez l'homme.

#### 4.2. Production en fermenteur

La production d'une souche bactérienne à l'échelle industrielle impose une modification des conditions de cultures utilisées en laboratoire. Les composés utilisés doivent répondre aux critères de sécurité définis par l'EFSA. Ainsi, la production pour l'alimentation humaine nécessite de remplacer les composés d'origine animale par des composés d'origine végétale (protéines de pois/soja et peptone de caséine). De plus, la quantité de composés utilisés répond à des critères économiques et doit permettre une production de biomasse maximale. Afin de déterminer les conditions de culture optimales, différentes concentrations de protéines de pois, de peptones de caséine, d'extrait de levure et de glucose ont été testées (Tableau 21). Les conditions optimales de production ont été déterminées et figurent également dans ce tableau.

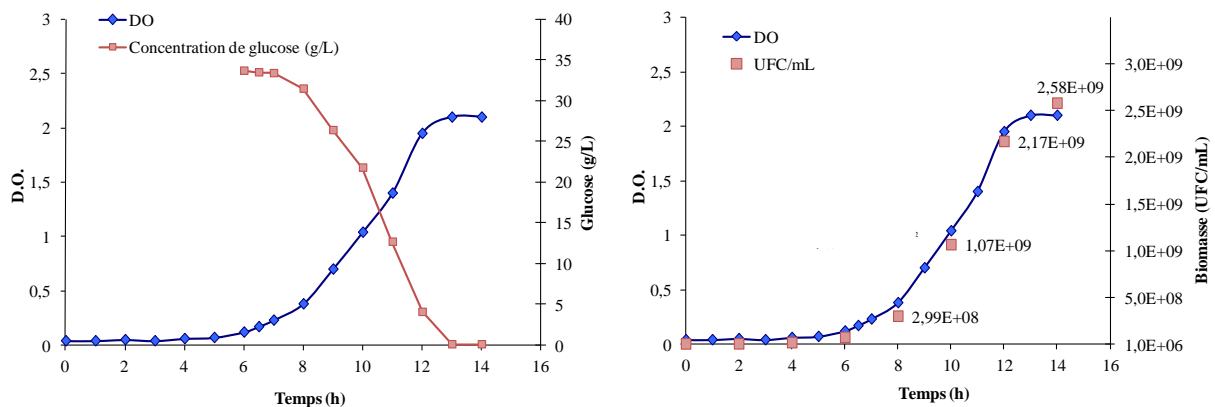
**Tableau 21** : Conditions de culture testées et retenues pour la production industrielle de la souche *L. plantarum* CNRZ 1997

Conditions de culture		Concentrations testées (g/L)	Concentrations retenues (g/L)
	Protéines de pois / Peptone de caséine	0,00 – 10,00 ( $\Delta= 5,00$ )	5,00
	Extrait de levure	5,00 – 25,00 ( $\Delta= 5,00$ )	10,00
	Glucose - Sigma (G5767)	20,00 – 60,00 ( $\Delta= 5,00$ )	20,00
	Tween 80 - Merck	1,08	1,08
<b>Composés</b>	Dipotassium phosphate - Merck (anhydre)	2,00	2,00
	Sodium acetate - Merck (anhydre)	5,00	5,00
	Ammonium citrate - Prolabo	2,00	2,00
	Magnesium sulfate - Prolabo (Heptahydraté)	0,20	0,20
	Manganese sulfate - Prolabo (Monohydraté)	0,05	0,05
<b>Agitation</b>		Oui / Non	Oui
<b>Température</b>		30°C - 37 °C	37 °C

Afin de valider ces conditions, un essai en fermenteur de 5L a été réalisé. La souche *L. plantarum* a été produite dans le milieu de culture décrit précédemment avec une microaération (0,2 vvm), sous agitation (125 rpm), à une température de 37 °C et avec un pH



régulé à 6,5. Enfin, une quantité de 0,3 ml/L d'antimousse a été ajoutée dans le fermenteur. Les résultats montrent une croissance plus rapide en fermenteur que dans les conditions de laboratoire. Le début de la phase stationnaire est atteint après 14 heures de croissance et la concentration finale est de  $2,6 \cdot 10^9$  UFC/mL. Le temps de génération est de  $0,49h^{-1}$  et la totalité du glucose est consommée. La consommation en soude a été de 326g. Enfin, les observations microscopiques effectuées en fin de culture montrent une forte proportion (>95%) de micro-organismes ayant une morphologie similaire à ceux obtenus sans régulation de pH.



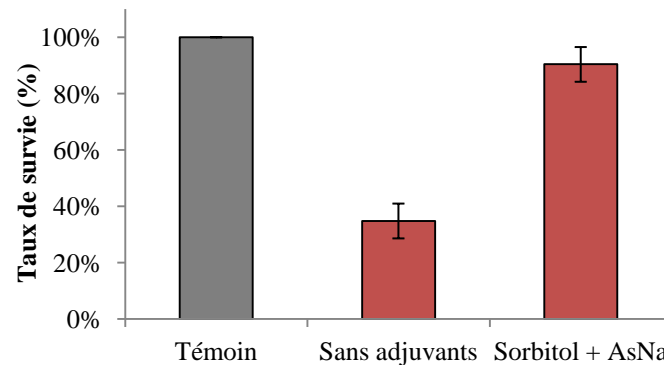
**Figure 56:** Courbe de croissance de la souche *L. plantarum* en fermenteur 5L et évolution de la concentration en glucose

Ces résultats ont été transmis à l'entreprise Biovitis. A la fin du premier semestre de l'année 2012, deux lots cliniques ont été produits dans ces conditions en fermenteur 60L, et aucun problème majeur n'est à signaler. Après production du premier lot, la population totale était de  $2,3 \cdot 10^{14}$  UFC, soit une concentration en bactérie de  $3,5 \cdot 10^9$  UFC/mL. Cette concentration est légèrement supérieure à celle obtenue en fermenteur 5L. Cette différence peut s'expliquer par l'utilisation de méthodes de mesure de la viabilité différentes et une meilleure régulation du pH dans le fermenteur 60L. En effet, pour la production de 5L, l'acidification devient très forte après 11 heures de culture et la pompe régule difficilement le pH.

#### 4.3. Séchage

Après production, la culture a été lavée et concentrée avec un facteur 15. Différents adjuvants de séchage ont été testés pour préserver la viabilité bactérienne. Le mélange sorbitol (20g/L) et ascorbate de sodium (1% m/m) a été sélectionné. Dans la bibliographie, ce mélange est décrit pour améliorer la survie des souches de *L. plantarum* à la lyophilisation (Carvalho et al. 2002). Les expérimentations menées au sein de l'UMR PAM ont montré une préservation

de 90,5% de la souche *L. plantarum* CNRZ 1997 avec ces adjuvants et un cycle de lyophilisation optimal.



**Figure 57:** Taux de survie de la souche *L. plantarum* lors d'une lyophilisation sans adjuvants et en présence du mélange sorbitol (20g/L), ascorbate de sodium (1% m/m)

Après lyophilisation du premier lot clinique par Biovitis, le rendement était de 73%. Ce rendement, bien qu'inférieur à celui obtenu dans les conditions de laboratoire, est assez élevé pour un premier essai industriel.

#### 4.4. Innocuité du lyophilisat bactérien

Pour pouvoir être administré à l'être humain, le lyophilisat ne doit contenir que la souche *L. plantarum* CNRZ 1997 et cette dernière ne doit pas être dangereuse pour l'homme.

La souche *L. plantarum* possède le statut GRAS et QPS. Pour s'assurer de son innocuité, un antibiogramme a été réalisé par la société Nexidia afin de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de la souche de *L. plantarum* vis-à-vis de 10 antibiotiques (Tableau 22). Un séquençage complet de la souche est actuellement à l'étude pour déterminer si la résistance de la souche à certains antibiotiques est portée par des plasmides.

Pour s'assurer de la « propreté » du lyophilisat, le laboratoire Icare a recherché des contaminants éventuels dans le produit et a trouvé la présence de germes aérobies et de levures inférieures à la norme (normes respectives de  $10^3/g$  et de  $10^2/g$ ) et une absence des espèces *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *E. coli*. Le laboratoire Novéal a également effectué des analyses microbiologiques sur la poudre et n'a pas détecté la présence d'*E. coli*, ni de Salmonelles. Ce laboratoire a aussi vérifié l'absence de métaux lourds dans le lyophilisat. La recherche de *Clostridium* a été effectuée par l'UMR PAM et les résultats montrent une absence de ce type de micro-organisme.

Enfin, une étude est en cours pour identifier précisément la souche *L. plantarum* CNRZ 1997 parmi d'autres souches avec une technique validée par les instances réglementaires, l'électrophorèse en champs pulsés. Par rapport à une électrophorèse classique, cette technique consiste à faire varier l'orientation du champ électrique au cours du temps. L'utilisation de cette technique après chaque fermentation/séchage permettra de valider chaque lot de production.

**Tableau 22:** Détermination des concentrations minimales inhibitrices (méthode Etest®, BioMérieux)

Famille	Antibiotique	Gamme de concentration testée (µg/mL)	Concentration Minimale Inhibitrice (µg/mL)	Interprétation
Aminosides (Aminoglycosides)	Gentamycine	0,016-1024	0,19	Sensible
	Kanamycine	0,016-256	12,0	Sensible
	Streptomycine	0,016-256	8,0	Sensible
Glycopeptides	Vancomycine	0,016-256	> 256	Résistante
Macrolides, lincosamides et streptogramines	Clindamycine	0,016-256	0,094	Sensible
	Erythromycine	0,016-256	0,094	Sensible
	Qinupristine/dalfopristine	0,002-32	1,5	Intermédiaire
Pénicillines	Ampicilline	0,016-256	3,0	Intermédiaire
Phénicolés	Chloramphénicol	0,016-256	8,0	Intermédiaire
Tétracyclines	Tétracycline	0,016-256	48,0	Résistante

#### 4.5. Mise en gélule

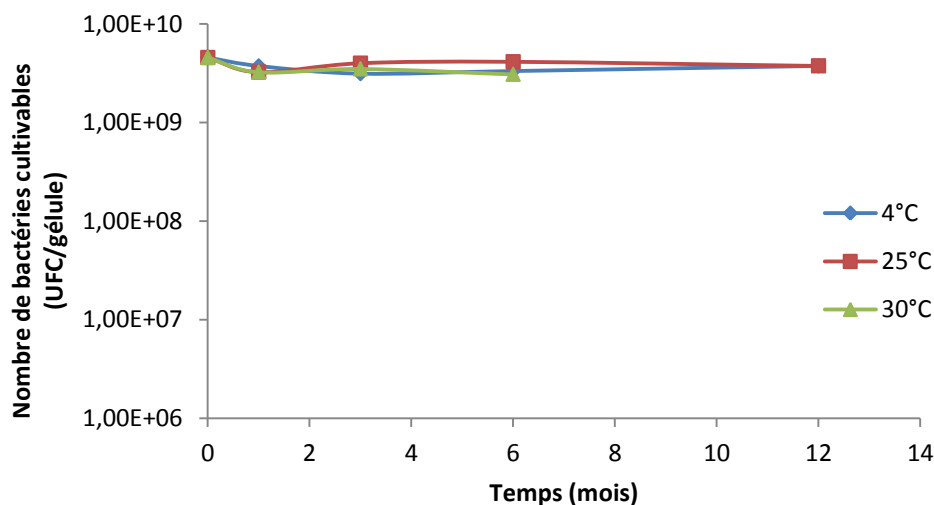
Le lyophilisat a été transmis à la société Novéal pour la mise en gélule. La poudre a ainsi été broyée et tamisée pour pouvoir être intégrée dans des gélules de taille 3. De la cellulose microcristalline, du dioxyde de silicium et du stéarate de magnésium ont été utilisés, en plus de la poudre de bactérie, pour remplir les gélules Vérum. Des gélules Placébo, ne contenant pas la souche, ont également été produites par cette société.

**Tableau 23** : Composition des gélules vérum réalisées par la société Novéal

Ingrédients	Fonction	Quantité (mg)
<i>L. plantarum</i> CNRZ 1997	Probiotique	16,7
Cellulose microcristalline	Diluant	220
Dioxyde de silicium	Lubrifiant (écoulement)	2
Stéarate de magnésium	Lubrifiant (anti-collage)	2
Total		240,7

#### 4.6. Validation de la viabilité et de la fonctionnalité après industrialisation

La viabilité et la fonctionnalité de la bactérie *L. plantarum* ont été validées après la production industrielle. Pour les mesures de viabilité, les tubes ont été stockés selon les conditions ICH à 4 °C/60%HR, 25 °C/60%HR et 30 °C/65%HR. Le taux de survie a été mesuré tous les trois mois sur 3 tubes de 30 gélules différents. Les résultats montrent un maintien au cours du temps de la viabilité des souches bactériennes (Figure 56).



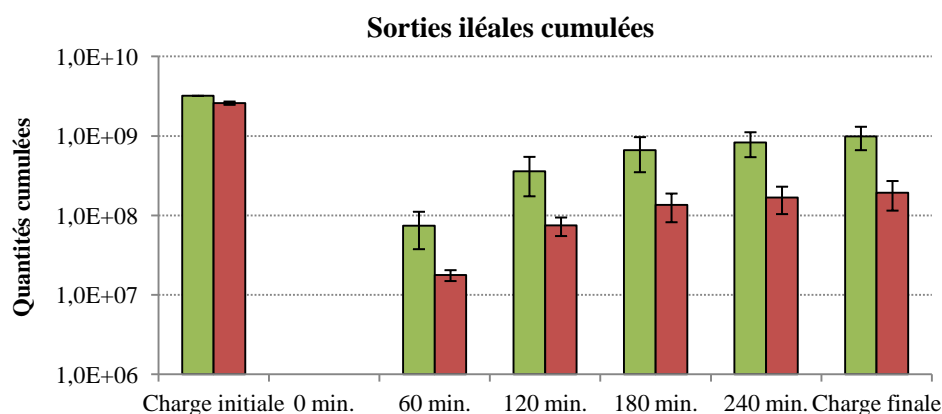
**Figure 58** : Evolution de la viabilité de la souche *L. plantarum* dans les gélules à 4 °C, 25 °C et 30 °C. Pour chaque point, le taux de survie à été mesuré sur 3 tubes différents par l'UMR PAM. Les tubes fermés hermétiquement ont été stockés selon les conditions ICH à 4 °C/60%HR, 25 °C/60%HR et 30 °C/65%HR.

La fonctionnalité est également préservée après production industrielle et séchage par rapport à la souche cultivée dans des conditions de laboratoire. Les résultats PBMC montrent de légères variations de production de cytokines pro- et anti-inflammatoires mais pas de différences significatives entre la souche produite industriellement et la souche témoin.

D'autres mesures de validation de la fonctionnalité au cours du stockage sont également prévues.

#### 4.7. Résistance aux conditions du tractus digestif

Afin de déterminer si la souche était capable d'arriver vivante au niveau de sites d'action du système immunitaire dans le tractus digestif, des mesures de la cultivabilité de la souche ont été effectuées à différents niveaux du tube digestif grâce à un appareil TIM-1 (Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand 1, Faculté de Pharmacie) (Figure 59). Les résultats mettent en évidence une libération rapide des souches, au niveau de l'estomac. La viabilité de la souche est plus élevée lors de l'administration d'une gélule par rapport à l'administration de la souche seule. De plus,  $10^9$  cellules arrivent vivantes en sortie d'iléon, ce qui correspond à la quantité de bactérie ayant montré un effet positif lors des tests *in vitro*. Les résultats obtenus montrent également que la majeure partie de la perte de viabilité est due au passage de l'estomac et à l'ouverture rapide de la gélule. Un essai est prévu avec des comprimés protégeant la souche de l'acidité stomacale.



**Figure 59:** Quantités cumulées de souche *L. plantarum* CNRZ1997 cultivables en sortie d'iléon. La souche a été administrée sous forme de poudre (■) ou dans une gélule (■) après 12 mois de stockage (n=2). Pour chaque temps, un prélèvement en sortie d'iléon a été effectué et mis en culture.

*Les expériences menées en amont au sein de l'UMR PAM ont permis de produire industriellement la souche *L. plantarum* CNRZ 1997 en préservant sa viabilité et sa fonctionnalité et de l'intégrer dans des gélules pour lui permettre d'arriver vivante au niveau de l'iléon. La souche a été produite en fermenteur 60L dans un milieu MRS modifié, séchée en lyophilisation en présence de sorbitol et d'ascorbate de sodium et mise en gélule à une concentration de  $5.10^9$  UFC/gélule. Des essais avec des comprimés gastro-résistants, permettant une libération ciblée sont également prévus. Si de nombreux tests ont déjà été effectués (antibiogramme, innocuité, taux de survie...), la souche est encore en cours de caractérisation (Séquençage, PFGE, développement d'amorces PCR, mesures de la viabilité et de la fonctionnalité au cours du stockage).*

*Une étude clinique en double aveugle, randomisée contre placebo a été démarrée. La première phase de l'étude clinique a été lancée à l'automne 2011 sur 179 patients. A l'issue de la première saison, 133 auto-questionnaires ont été reçus. La seconde phase de l'étude clinique se déroulera entre octobre 2012 et mars 2013 et comprendra au moins autant de patients. La levée d'aveugle et l'analyse de l'ensemble des résultats auront lieu à la fin de l'hiver 2013.*

*CONCLUSION GENERALE*

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail s'intègre dans un programme FUI regroupant, outre l'UMR PAM et l'entreprise Merck MF, l'INRA de Jouy-en-Josas (Unité MICALIS, UMR 1319) et l'entreprise Senoble. L'objectif premier de ce travail de thèse était de produire industriellement une nouvelle souche probiotique, en maintenant sa viabilité et sa fonctionnalité intacte, pour pouvoir la tester chez l'être humain.

Pour sélectionner la bactérie à industrialiser, il a d'abord été nécessaire de déterminer la sensibilité des 10 souches, transmises par l'INRA de Jouy-en-Josas, aux stress du procédé de fabrication et aux perturbations du tractus digestif. Si de nombreux tests permettant de caractériser la fonctionnalité probiotique *in vitro* (immuno-stimulation, exclusion de pathogènes, adhésion...) existent déjà, très peu caractérisent le procédé de fabrication. De même, beaucoup de tests très différents ont été développés pour déterminer la résistance aux perturbations du tractus digestif, rendant difficile les comparaisons entre études. Nous avons donc développé et validé, dans cette étude, des tests de criblage simples et représentatifs des perturbations subies par les bactéries.

A la vue des résultats obtenus, la souche *L. plantarum* CNRZ 1997 a été sélectionnée. Cette bactérie a ensuite été testée chez la souris et les résultats montrent une diminution de la perte de poids et une quantité moindre de virus dans les poumons des animaux par rapport aux souris témoin, lors d'une infection par un virus de la grippe.

La souche a alors été produite industriellement et fait actuellement l'objet d'une étude clinique en double aveugle, randomisée contre placebo chez l'homme.

- **Impact du procédé sur la viabilité et la fonctionnalité des souches probiotiques**

Les résultats montrent que le procédé de séchage peut altérer la viabilité et la fonctionnalité des cellules. En effet, le séchage induit simultanément un stress mécanique et un stress oxydant pour la cellule. La maîtrise de ces phénomènes, en termes d'amplitude et d'intensité est essentielle dans la préservation des cellules d'intérêt :

- Le stress oxydant apparaît dès les premières étapes de déshydratation et reste présent dans les cellules. Son impact paraît assez faible sur le taux de survie mais paraît important sur la fonctionnalité probiotique. De plus, lorsque le niveau d'hydratation est important, l'oxydation diffuse rapidement dans les cellules et entraîne des pertes de viabilité importantes lors du stockage. Le stress oxydant apparaît donc lors des étapes transitoires mais cause des dommages importants lors de la conservation à l'état sec.



○ Le stress mécanique dépend de l'amplitude de séchage alors que son intensité dépend de la cinétique. Son impact est fort sur le taux de survie et sur la fonctionnalité probiotique. La maîtrise des cinétiques de déshydratation et de réhydratation, lors du séchage, permet d'améliorer significativement la viabilité des cellules. Les résultats de l'étude que nous avons menés sur la levure permettent, pour la première fois, de faire un parallèle avec des expérimentations menées en milieu liquide. Les cinétiques rapides, en ne permettant pas à la membrane de se plisser correctement, induisent la formation de vésicules et la mort des cellules lors de l'étape de réhydratation. A contrario, l'utilisation de cinétiques lentes favorise la réorganisation de la membrane et la survie des cellules. Pour l'étape de déshydratation, le choix de la matrice de déshydratation permet de favoriser la vitrification (tréhalose), diminuer l'oxydation (cystéine, bactérie réductrice) ou de diminuer la contraction volumique (glycérol). Pour l'étape de réhydratation, la température et la composition de la matrice (milieu de culture) permettent d'améliorer significativement le taux de survie. Le stress mécanique n'est présent que lors des étapes transitoires du séchage et n'intervient pas dans l'évolution du taux de survie lors de la conservation à l'état sec.

Pour un séchage optimal, il est donc nécessaire de choisir une matrice adaptée, limitant l'impact des stress mécanique et oxydant, d'utiliser des cinétiques ni trop lentes (favorisant la réorganisation membranaire mais aussi l'oxydation), ni trop rapides (empêchant la diffusion de l'oxydation aux fortes valeurs d'hydratation mais aussi la réorganisation membranaire) et une température de réhydratation élevée.

- **Caractérisation de la résistance de la souche *L. plantarum* CNRZ 1997**

Des tests de criblage rapides et représentatifs du procédé de séchage, de l'acidité de l'estomac et du transit dans le colon ont été mis en places sur 10 bactéries immuno-stimulantes. A l'échelle industrielle, les microorganismes probiotiques sont généralement séchés par lyophilisation. Ce procédé préserve assez bien les cellules mais présente l'inconvénient d'être relativement lent et couteux. Au cours de cette étude, un procédé de séchage rapide a été développé pour comparer l'impact de la déshydratation sur la viabilité (intégrité structurale) et la fonctionnalité (intégrité enzymatique) entre les souches du projet. L'analyse a été effectuée en cytométrie en flux. De plus, la sensibilité des bactéries à chaque composante du séchage, stress mécanique et stress oxydant a été testée. La souche *L. plantarum* CNRZ 1997 présente un fort taux de survie à ces deux stress (respectivement 88% et 89% de viabilité). Ces résultats sont corrélés avec le séchage sur couche mince où *L. plantarum* possède le meilleur taux de survie (36%) et la lyophilisation où *L. plantarum*

possède le troisième taux de survie (42% de cellules non perméabilisées et 31% de cultivabilité). Au niveau de la fonctionnalité, les résultats montrent un maintien de l'activité enzymatique après séchage (66% et 71%, respectivement après séchage sur couche mince et lyophilisation). De même, l'hydrophobicité de surface et l'effet immuno-stimulant de *L. plantarum* CNRZ 1997 restent identiques après déshydratation par lyophilisation.

Le taux de survie de la souche *L. plantarum* CNRZ 1997 est affecté par le procédé de lyophilisation mais pas sa fonctionnalité. Pour améliorer la viabilité et maintenir la fonctionnalité lors du séchage et lors de la conservation à l'état sec, un mélange d'adjuvants (sorbitol + ascorbate de sodium) a été sélectionné. De plus, pour optimiser la résistance moyenne de la souche aux perturbations du tractus digestif, les bactéries ont été mises en gélules avant l'étude clinique.

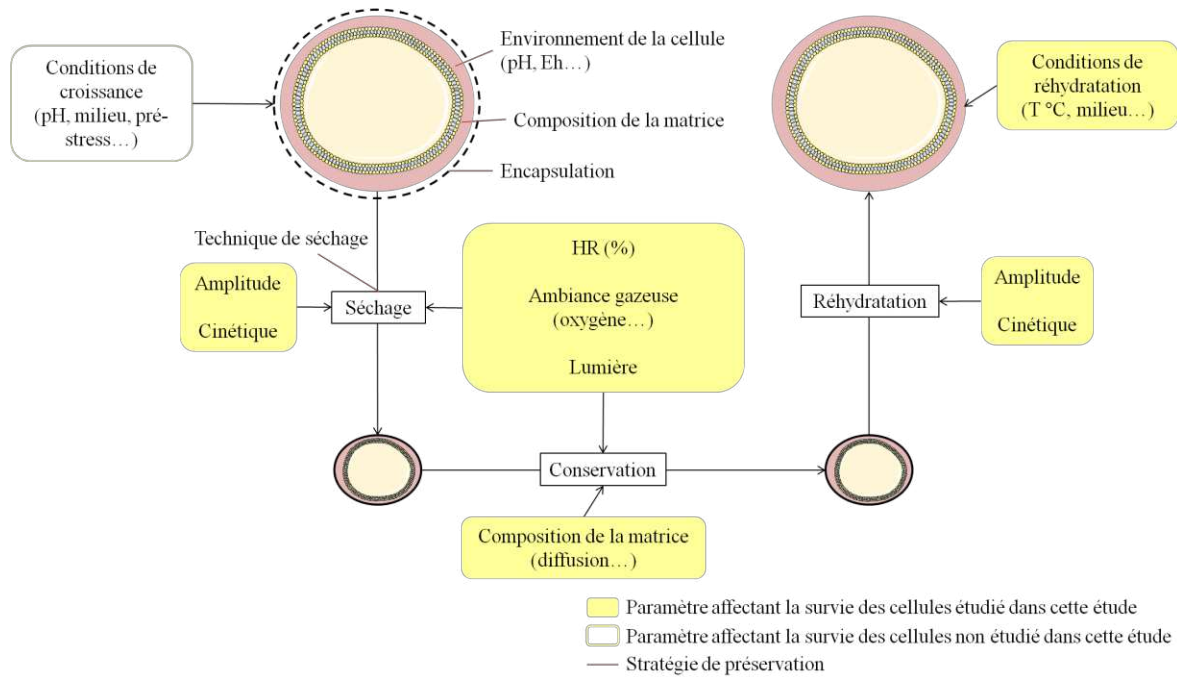
- **Préservation de la viabilité et de la fonctionnalité de souches fragiles**

La souche sélectionnée dans ce projet présente l'avantage de posséder une bonne résistance au procédé. Néanmoins, plusieurs stratégies de protection ont été développées dans le cas où la souche sélectionnée aurait été sensible au séchage et aux perturbations du tractus :

- Le séchage sous vide avec des sucres (séchage par formation de mousse),
- La protection contre les dommages dus au stress oxydant (co-séchage d'une souche fragile et d'une souche résistante)
- La protection contre le stress mécanique et l'acidité stomacale (encapsulation dans une matrice alginate-protéines de pois)

Pour chaque stratégie, l'impact sur la viabilité et la fonctionnalité des cellules a été mesuré. Nous avons également mis en évidence que les protectants à utiliser dépendent des caractéristiques de la souche. A chaque type de souche correspond un mix (technique, adjuvants) particulier. Les tests développés permettent de classer les souches et de déterminer l'origine de leur sensibilité.

De plus, certaines techniques comme le séchage sur couche mince semblent pouvoir améliorer la capacité d'adhésion des microorganismes. Pour l'instant, ce séchage détruit une trop grande partie de la population microbienne pour pouvoir être utilisé. Cependant, il représente une piste d'étude à explorer.



**Figure 60:** Paramètres affectant la survie au séchage et stratégies de protection proposées

- **Production industrielle et démarrage de l'étude clinique**

La bactérie *L. plantarum* CNRZ 1997 a été produite industriellement en fermenteur 60L. Puis, la souche a été certifiée, mise en gélule et fait l'objet d'une étude clinique. Cette étude randomisée, en double aveugle contre placebo a été scindée en deux saisons hivernales pour éviter le risque de tomber sur une année avec un hiver particulier (hiver très doux, très humide...). La première partie de l'étude est terminée (octobre 2011-mars 2012) et la seconde partie se déroulera entre fin 2012 et début 2013. Enfin, les résultats obtenus avec le TIM-1 montrent un taux de survie acceptable de la souche en sortie d'iléon. Cependant, ce taux de survie doit pouvoir être amélioré et la libération plus ciblée au niveau des cellules immunitaires du tractus. Ces derniers points sont donc encore à l'étude.

- **Proposition d'une démarche de sélection de micro-organismes probiotiques**

La réalisation de cette étude nous conduit à proposer une démarche de sélection de micro-organismes probiotiques. Ainsi, la première étape concerne la sélection d'une souche probiotique selon des critères de fonctionnalité. La bactérie doit être choisie en fonction de ses résultats sur les tests de criblage *in vitro* et les essais chez l'animal. En effet, les structures ou les molécules à l'origine de l'effet probiotique n'étant pas encore identifiées, il est difficile de modifier positivement la fonctionnalité probiotique d'un micro-organisme. A contrario, plusieurs stratégies existent déjà pour protéger les bactéries du séchage ou de l'acidité stomacale.

---

Nous avons mis en place des tests de criblage représentatifs du procédé de séchage et des stress rencontrés lors du passage dans le tractus digestif. Ces tests permettent de déterminer la sensibilité de la souche au séchage et plus particulièrement aux contraintes mécaniques et oxydatives. Dans cette étude, nous avons développé différentes techniques de protection des bactéries en fonction de leur sensibilité au séchage et aux perturbations du tractus. Ces techniques ont été utilisées séparément au cours de cette étude mais pourraient également l'être simultanément. Enfin, les résultats des tests de criblage du tractus digestif, en regard des résultats obtenus lors de l'essai avec le TIM-1 permettent de prédire la tolérance des souches au passage dans le tractus digestif.

*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdul-Fattah AM, Kalonia DS, Pikal MJ. 2007. The challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: Product quality implications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96(8):1886-1916.
- Adhikari K, Mustapha A, Grün I, Fernando L. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science* 83(9):1946-1951.
- Adlerberth I, Wold AE. 2009. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica* 98(2):229-238.
- Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, Von Wright A. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology* 65(1):351-354.
- Altieri C, Bevilacqua A, D'Amato D, Nobile MAD, Sinigaglia M. 2008. Modelling the survival of starter lactic acid bacteria and *Bifidobacterium bifidum* in single and simultaneous cultures. *Food Microbiology* 25(5):729-734.
- Ananta E, Volkert M, Knorr D. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal* 15(4):399-409.
- Artis D. 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews Immunology* 8(6):411-420.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473(7346):174-180.
- Bâati L, Fabre-Gea C, Auriol D, Blanc PJ. 2000. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *International Journal of Food Microbiology* 59(3):241-247.
- Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(44):15718-15723.
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307(5717):1915-1920.
- Ball P. 2008. Water as an active constituent in cell biology. *Chemical Reviews* 108(1):74-108.
- Ball P. 2011. Biophysics: More than a bystander. *Nature* 478(7370):467-468.
- Bao Y, Zhang Y, Liu Y, Wang S, Dong X, Wang Y, Zhang H. 2010. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control* 21(5):695-701.
- Bayrock D, Ingledew W. 1997. Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. *Food Research International* 30(6):417-425.
- Béal C, Marin M, Fontaine E, Fonseca F, Obert JP. 2008. Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. *In* Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Collection Sciences et techniques agroalimentaires. Paris, FR: Tec & Doc Lavoisier.
- Beney L, Gervais P. 2001. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Applied microbiology and biotechnology* 57(1):34-42.
- Beney L, Marechal P, Gervais P. 2001. Coupling effects of osmotic pressure and temperature on the viability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56(3):513-516.

- Beney L, Simonin H, Mille Y, Gervais P. 2007. Membrane physical state as key parameter for the resistance of the gram-negative *Bradyrhizobium japonicum* to hyperosmotic treatments. *Archives of Microbiology* 187(5):387-396.
- Berggren A, Lazou Ahrén I, Larsson N, Onning G. 2011. Randomised, double-blind and placebo-controlled study using new probiotic lactobacilli for strengthening the body immune defence against viral infections. *European Journal of Nutrition* 50(3):203-210.
- Binder H. 2007. Water near lipid membranes as seen by infrared spectroscopy. *European Biophysics Journal* 36(4):265-279.
- Blaut M, Collins M, Welling G, Dore J, Van Loo J, De Vos W. 2002. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *British Journal of Nutrition* 87(2):203-211.
- Boclé J, Thomann C. 2005. Effects of probiotics and prebiotics on flora and immunity in adults. L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments report. L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort, France:59-128.
- Boge T, Rémy M, Vaudaine S, Tanguy J, Bourdet-Sicard R, Van der Werf S. 2009. A probiotic fermented dairy drink improves antibody response to influenza vaccination in the elderly in two randomised controlled trials. *Vaccine* 27(41):5677-5684.
- Bolla PA, de los Angeles Serradell M, De Urraza PJ, De Antoni GL. 2011. Effect of freeze-drying on viability and *in vitro* probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *Journal of Dairy Research* 78(1):15-22.
- Bozoglu T, Ozilgen M, Bakir U. 1987. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbial Technology* 9(9):531-537.
- Brasca M, Morandi S, Lodi R, Tamburini A. 2007. Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 103(5):1516-1524.
- Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF. 2011. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(38):16050-16055.
- Brennan M, Wanismail B, Johnson M, Ray B. 1986. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Protection* 49(1):47-53.
- Bronshtein V. 1998. Preservation by foam formation. US Patent 5,766,520.
- Bronshtein V. 2004. Preservation by foam formulation: An alternative to freeze-drying. *Pharmaceutical Technology* 28(4):86-92.
- Brovchenko I, Krukau A, Oleinikova A, Mazur AK. 2007. Water clustering and percolation in low hydration DNA shells. *The Journal of Physical Chemistry B* 111(12):3258-3266.
- Buch V, Milet A, Vacha R, Jungwirth P, Devlin JP. 2007. Water surface is acidic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(18):7342-7347.
- Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering* 104(4):467-483.
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 3(1):3-8.
- Cachon R, Antérieux P, Diviès C. 1998. The comparative behavior of *Lactococcus lactis* in free and immobilized culture processes. *Journal of Biotechnology* 63(3):211-218.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata F, Gibbs P. 2003. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology* 94(6):947-952.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. 2002. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology letters* 24(19):1587-1591.

- Castro HP, Teixeira P, Kirby R. 1995. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44(1):172-176.
- Castro HP, Teixeira PM, Kirby R. 1996. Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnology Letters* 18(1):99-104.
- Ceragioli M, Mols M, Moezelaar R, Ghelardi E, Senesi S, Abee T. 2010. Comparative transcriptomic and phenotypic analysis of the responses of *Bacillus cereus* to various disinfectant treatments. *Applied and Environmental Microbiology* 76(10):3352-3360.
- Cerrutti P, Segovia de Huerdo M, Galvagno M, Schebor C, del Pilar Buera M. 2000. Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(4):575-580.
- Champagne CP, Fustier P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology* 18(2):184-190.
- Champagne CP, Raymond Y, Simon JP. 2012. Effect of water activity and protective solutes on growth and subsequent survival to air-drying of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95(3):745-756.
- Chandramouli V, Kailasapathy K, Peiris P, Jones M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods* 56(1):27-35.
- Chang LL, Pikal MJ. 2009. Mechanisms of protein stabilization in the solid state. *Journal of pharmaceutical sciences* 98(9):2886-2908.
- Chang WS, Li X, Halverson LJ. 2009. Influence of water limitation on endogenous oxidative stress and cell death within unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Microbiology* 11(6):1482-1492.
- Charalampopoulos D, Rastall RA. 2009. *Prebiotics and probiotics science and technology*: Springer.
- Chauviere G, Coconnier MH, Kerneis S, Darfeuille-Michaud A, Joly B, Servin AL. 1992. Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Letters* 91(3):213-217.
- Chen S, Cao Y, Ferguson LR, Shu Q, Garg S. 2012. Flow cytometric assessment of the protectants for enhanced *in vitro* survival of probiotic lactic acid bacteria through simulated human gastro-intestinal stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95(2):345-356.
- Chirife J, Fontan CF. 1980. A study of the water activity lowering behavior of polyethylene glycols in the intermediate moisture range. *Journal of Food Science* 45(6):1717-1719.
- Collado M, Meriluoto J, Salminen S. 2007. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology* 45(4):454-460.
- Conrad PB, Miller DP, Cielenski PR, de Pablo JJ. 2000. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology* 41(1):17-24.
- Conway P, Gorbach S, Goldin B. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science* 70(1):1-12.
- Corcoran B, Ross R, Fitzgerald G, Stanton C. 2004. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology* 96(5):1024-1039.



- Corcoran B, Stanton C, Fitzgerald G, Ross R. 2005. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6):3060-3067.
- Corthésy B, Gaskins HR, Mercenier A. 2007. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *The Journal of Nutrition* 137(3):781-790.
- Crowe J, Crowe L. 1984. Effects of dehydration on membranes and membrane stabilization at low water activities. *Biological membranes* 5:57-103.
- Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 60(1):73-103.
- Crowe JH, Crowe LM, Wolkers WF, Oliver AE, Ma X, Auh JH, Tang M, Zhu S, Norris J, Tablin F. 2005. Stabilization of dry mammalian cells: lessons from nature. *Integrative and Comparative Biology* 45(5):810-820.
- Crowe JH, Hoekstra F, Crowe L. 1992. Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 54(1):579-599.
- Crowe JH, Tablin F, Wolkers W, Gousset K, Tsvetkova N, Ricker J. 2003. Stabilization of membranes in human platelets freeze-dried with trehalose. *Chemistry and physics of lipids* 122(1-2):41-52.
- Crowe LM, Reid DS, Crowe JH. 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophysical Journal* 71(4):2087-2093.
- Cummings JH. 1998. Dietary carbohydrates and the colonic microflora. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 1(5):409-414.
- De Angelis M, Gobbetti M. 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics* 4(1):106-122.
- de Maranon IM, Marechal PA, Gervais P. 1996. Passive response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shifts: cell volume variations depending on the physiological state. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 227(2):519-523.
- De Valdez GF, de Giori GS, de Ruiz Holgado AP, Oliver G. 1983. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology* 20(5):560-566.
- de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. 2001. Probiotics - compensation for lactase insufficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2):421-429.
- de Vrese M, Winkler P, Rautenberg P, Harder T, Noah C, Laue C, Ott S, Hampe J, Schreiber S, Heller K. 2005. Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on common cold episodes: a double blind, randomized, controlled trial. *Clinical Nutrition* 24(4):481-491.
- de Vrese M, Winkler P, Rautenberg P, Harder T, Noah C, Laue C, Ott S, Hampe J, Schreiber S, Heller K. 2006. Probiotic bacteria reduced duration and severity but not the incidence of common cold episodes in a double blind, randomized, controlled trial. *Vaccine* 24(44):6670-6674.
- Debnath A, Mukherjee B, Ayappa K, Maiti PK, Lin ST. 2010. Entropy and dynamics of water in hydration layers of a bilayer. *The Journal of Chemical Physics* 133(17):174704-174714.
- Deepika G, Green RJ, Frazier RA, Charalampopoulos D. 2009. Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Applied Microbiology* 107(4):1230-1240.
- Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. 2005. Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques: Éditions Tec & doc.

- Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D. 2008. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology* 10(1/2):37-54.
- den Besten HMW, Mols M, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T. 2009. Phenotypic and transcriptomic analyses of mildly and severely salt-stressed *Bacillus cereus* ATCC 14579 cells. *Applied and Environmental Microbiology* 75(12):4111-4119.
- Desmond C, Fitzgerald G, Stanton C, Ross R. 2004. Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10):5929-5936.
- Desmond C, Ross R, O'callaghan E, Fitzgerald G, Stanton C. 2002. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of applied microbiology* 93(6):1003-1011.
- Desmond C, Stanton C, Fitzgerald G, Collins K, Ross R. 2001. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal* 11(10):801-808.
- Di Cagno R, De Angelis M, Coda R, Minervini F, Gobetti M. 2009. Molecular adaptation of sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400 under co-cultivation with other lactobacilli. *Research in Microbiology* 160(5):358-366.
- Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C. 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 48(3):385-407.
- Dimitrellou D, Kourkoutas Y, Koutinas A, Kanellaki M. 2009. Thermally-dried immobilized kefir on casein as starter culture in dried whey cheese production. *Food Microbiology* 26(8):809-820.
- Ding W, Shah N. 2007. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science* 72(9):446-450.
- Doherty S, Gee V, Ross R, Stanton C, Fitzgerald G, Brodkorb A. 2011. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids* 25:1604-1617.
- Doleyres Y, Lacroix C. 2005. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal* 15(10):973-988.
- Doleyres Y, Paquin C, LeRoy M, Lacroix C. 2002. *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free-and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(1):168-173.
- Dong A, Prestrelski SJ, Allison SD, Carpenter JF. 1995. Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation. *Journal of pharmaceutical sciences* 84(4):415-424.
- Drouault-Holowacz S, Foligné B, Dennin V, Goudercourt D, Terpend K, Burckel A, Pot B. 2006. Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolérance: *In vitro* and *in vivo* considerations. *Clinical Nutrition* 25(6):994-1003.
- Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology* 70(4):2161-2171.
- Dumont F, Marechal PA, Gervais P. 2004. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Applied and Environmental Microbiology* 70(1):268-272.
- Duncan S, Louis P, Flint H. 2007. Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Letters in Applied Microbiology* 44(4):343-350.
- Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of

- human origin: correlation with *in vivo* findings. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2):386-392.
- Dupont S, Beney L, Ferreira T, Gervais P. 2011. Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808(6):1520-1528.
- Dupont S, Beney L, Ritt JF, Lherminier J, Gervais P. 2010. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1798(5):975-985.
- Ebel B, Lemetais G, Beney L, Cachon R, Sokol H, Langella P, Gervais P. 2012. Could probiotics prevent cardiovascular diseases? A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* DOI: 10.1080/10408398.2011.579361.
- EFSA. 2007. Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the Scientific Committee. *EFSA J* 587:1-16.
- Ellis RJ, Minton AP. 2003. Join the crowd. *Nature* 425(6953):27-28.
- Espindola A, Gomes D, Panek A, Eleutherio E. 2003. The role of glutathione in yeast dehydration tolerance. *Cryobiology* 47(3):236-241.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada.
- Farhataziz T, Ross AB. 1977. In: Selected specific rates of reactions of transients in water and aqueous media III. Hydroxyl radical and their radical ions. National Standard Reference Data Service, p59.
- Fayol-Messaoudi D, Berger CN, Coconnier-Polter MH, Lievin-Le Moal V, Servin AL. 2005. pH-, lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic lactobacilli against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology* 71(10):6008-6013.
- Fernandez EM, Valenti V, Rockel C, Hermann C, Pot B, Boneca IG, 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(8):1050-1059.
- Fernández Murga M, Font de Valdez G, Disalvo A. 2000. Changes in the surface potential of *Lactobacillus acidophilus* under freeze-thawing stress. *Cryobiology* 41(1):10-16.
- Foerst P, Reitmaier J, Kulozik U. 2010. 1H NMR investigation on the role of sorbitol for the survival of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in vacuum-dried preparations. *Journal of Applied Microbiology* 108(3):841-850.
- Foligne B, Dewulf J, Breton J, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Pot B. 2010. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: Immunomodulation by *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology* 140(2):136-145.
- Foligne B, Nutten S, Grangette C, Dennin V, Goudercourt D, Poiret S, Dewulf J, Brassart D, Mercenier A, Pot B. 2007. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology* 13(2):236-243.
- Fonseca F, Béal C, Corrieu G. 2000. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research* 67(1):83-90.
- Fonty G, Chaucheyras-Durand F, editors. 2007. Les écosystèmes digestifs.
- França M, Panek A, Eleutherio E. 2005. The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress & Chaperones* 10(3):167-170.

- França M, Panek A, Eleutherio E. 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146(4):621-631.
- Friedrich U, Vogelsang H, Bauer A, Kaatz M, Hipler U, 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. *Clinical & Experimental Allergy* 38(1):93-102.
- Fu N, Chen XD. 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International* 44(5):1127-1149.
- Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469(7331):543-547.
- Fukushima Y, Miyaguchi S, Yamano T, Kaburagi T, Iino H, Ushida K, Sato K. 2007. Improvement of nutritional status and incidence of infection in hospitalised, enterally fed elderly by feeding of fermented milk containing probiotic *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC533). *British Journal of Nutrition* 98(5):969-977.
- Fuller R. 1991. Probiotics in human medicine. *Gut* 32(4):439-442.
- Fuller W, Forsyth T, Mahendrasingam A. 2004. Water-DNA interactions as studied by X-ray and neutron fibre diffraction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359(1448):1237-1248.
- Gardiner G, Bouchier P, O'Sullivan E, Kelly J, Kevin Collins J, Fitzgerald G, Ross R, Stanton C. 2002. A spray-dried culture for probiotic cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal* 12(9):749-756.
- Gardiner G, O'Sullivan E, Kelly J, Auty M, Fitzgerald G, Collins J, Ross R, Stanton C. 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology* 66(6):2605-2612.
- Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. 2010. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 7(9):503-514.
- Garre E, Raginel F, Palacios A, Julien A, Matallana E. 2010. Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 136(3):295-303.
- Gawrisch K, Ruston D, Zimmerberg J, Parsegian V, Rand R, Fuller N. 1992. Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces. *Biophysical Journal* 61(5):1213-1223.
- Generoso SV, Viana ML, Santos RG, Arantes RME, Martins FS, Nicoli JR, Machado JAN, Correia MITD, Cardoso VN. 2011. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. *European Journal of Nutrition* 50(4):261-269.
- Gervais P, Marechal PA, Molin P. 1992. Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering* 40(11):1435-1439.
- Ghadimi D, Folster-Holst R, de Vrese M, Winkler P, Heller KJ, Schrezenmeier J. 2008. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. *Immunobiology* 213(8):677-692.
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125:1401-1412.

- Gilad O, Svensson B, Viborg AH, Stuer-Lauridsen B, Jacobsen S. 2011. The extracellular proteome of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 reveals proteins with putative roles in probiotic effects. *Proteomics* 11(11):2503-2514.
- Gill H, Prasad J. 2008. Probiotics, immunomodulation, and health benefits. *Bioactive Components of Milk* 606:423-454.
- Gill H, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. 2001. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *The American journal of clinical nutrition* 74(6):833-839.
- Gitton C, Meyrand M, Wang J, Caron C, Trubuil A, Guillot A, Mistou MY. 2005. Proteomic signature of *Lactococcus lactis* NCDO763 cultivated in milk. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11):7152-7163.
- Giulio BD, Orlando P, Barba G, Coppola R, Rosa MD, Sada A, Prisco PPD, Nazzaro F. 2005. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(5):739-746.
- Golowczyc MA, Gerez CL, Silva J, Abraham AG, De Antoni GL, Teixeira P. 2010. Survival of spray-dried *Lactobacillus kefir* is affected by different protectants and storage conditions. *Biotechnology Letters* 33(4):681-686.
- Golowczyc MA, Silva J, Teixeira P, De Antoni GL, Abraham AG. 2011a. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International journal of food microbiology* 144:556-560.
- Golowczyc MA, Silva J, Teixeira P, De Antoni GL, Abraham AG. 2011b. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International Journal of Food Microbiology* 144(3):556-560.
- Gómez-Pastor R, Pérez-Torrado R, Cabiscol E, Ros J, Matallana E. 2010. Reduction of oxidative cellular damage by overexpression of the thioredoxin TRX2 gene improves yield and quality of wine yeast dry active biomass. *Microbial Cell Factories* 9(9):1-14.
- Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill H. 2001. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 67(3):207-216.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(29):10321-10326.
- Greenspan L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solution. *Journal of research of the National Bureau of Standards* 81A:89-96.
- Grimoud J, Durand H, De Souza S, Monsan P, Ouarné F, Theodorou V, Roques C. 2010. *In vitro* screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *International Journal of Food Microbiology* 144(1):42-50.
- Grogan DW, Cronan Jr JE. 1986. Characterization of *Escherichia coli* mutants completely defective in synthesis of cyclopropane fatty acids. *Journal of Bacteriology* 166(3):872-877.
- Gross M, Cramton SE, Gotz F, Peschel A. 2001. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infection and immunity* 69(5):3423-3426.
- Grossmann G, Opekarová M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W. 2007. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO Journal* 26(1):1-8.

- Grzeskowiak L, Isolauri E, Salminen S, Gueimonde M. 2011. Manufacturing process influences properties of probiotic bacteria. *British Journal of Nutrition* 105(6):887-894.
- Guarner F. 2012. *The Enteric Flora*: Morgan & Claypool Life Science Publishers.
- Guillemard E, Tondu F, Lacoïn F, Schrezenmeir J. 2010. Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition* 103(1):58-68.
- Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, Meurman JH, Poussa T, Näse L, Saxelin M, Korpela R. 2001. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *Bmj* 322(7298):1327.
- Heckly RJ, Dimmick R. 1968. Correlations between free radical production and viability of lyophilized bacteria. *Applied Microbiology* 16(7):1081-1085.
- Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M, Michel G. 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* 464(7290):908-912.
- Heidebach T, Först P, Kulozik U. 2010. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering* 98(3):309-316.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408(6813):740-745.
- Henderson B, Allan E, Coates ARM. 2006. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. *Infection and immunity* 74(7):3693-3706.
- Herdeiro R, Pereira M, Panek A, Eleutherio E. 2006. Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760(3):340-346.
- Holzappel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2):365-373.
- Holzappel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 41(2):85-101.
- Hood S, Zoitola E. 1988. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *Journal of Food Science* 53(5):1514-1516.
- Hooper LV. 2004. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends in Microbiology* 12(3):129-134.
- Hooper LV, Gordon JI. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292(5519):1115-1118.
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291(5505):881-884.
- Hughes DT, Terekhova DA, Liou L, Hovde CJ, Sahl JW, Patankar AV, Gonzalez JE, Edrington TS, Rasko DA, Sperandio V. 2010. Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(21):9831-9836.
- Imlay JA. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology* 57(1):395-418.
- Ingrassia I, Leplingard A, Darfeuille-Michaud A. 2005. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease

- patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6):2880-2887.
- Ismail AS, Hooper LV. 2005. Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 289(5):779-784.
- Isolauri E, Rautanen T, Juntunen M, Sillanauke P, Koivula T. 1991. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 88(1):90-97.
- Jacobsen CN, Nielsen VR, Hayford A, Møller P, Michaelsen K, Pærregaard A, Sandström B, Tvede M, Jakobsen M. 1999. 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. *Applied and Environmental Microbiology* 65(11):4949-4956.
- Jankovic I, Sybesma W, Phothirath P, Ananta E, Mercenier A. 2010. Application of probiotics in food products--challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology* 21(2):175-181.
- Jones SE, Whitehead K, Saulnier D, Thomas CM, Versalovic J, Britton RA. 2011. Cyclopropane fatty acid synthase mutants of probiotic human-derived *Lactobacillus reuteri* are defective in TNF inhibition. *Gut Microbes* 2(2):69-79.
- Kaila M, Isolauri E, Saxelin M, Arvilommi H, Vesikari T. 1995. Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Archives of Disease in Childhood* 72(1):51-53.
- Kankainen M, Paulin L, Tynkkynen S, Von Ossowski I, Reunanen J, Partanen P, Satokari R, Vesterlund S, Hendrickx APA, Lebeer S. 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(40):17193-17198.
- Kataria J, Li N, Wynn JL, Neu J. 2009. Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial? *Nutrition reviews* 67(9):546-550.
- Kecskés G, Belagyi T, Olah A. 2003. Early jejunal nutrition with combined pre-and probiotics in acute pancreatitis--prospective, randomized, double-blind investigations. *Magyar sebeszet* 56(1):3-8.
- Kimoto-Nira H, Suzuki C, Kobayashi M, Mizumachi K. 2008. Different growth media alter the induction of interleukin 12 by a *Lactococcus lactis* strain. *Journal of Food Protection* 71(10):2124-2128.
- Klemmer KJ. 2011. Synbiot encapsulation employing a pea protein-alginate matrix. Saskatoon, SK, Canada: University of Saskatchewan. 100 p.
- Klemmer KJ, Korber DR, Low NH, Nickerson MT. 2011. Pea protein-based capsules for probiotic and prebiotic delivery. *International Journal of Food Science & Technology* 46(11):2248-2256.
- Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(7):2879-2883.
- Klipp E, Nordlander B, Krüger R, Gennemark P, Hohmann S. 2005. Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nature Biotechnology* 23(8):975-982.
- Koch AL. 1988. Biophysics of bacterial walls viewed as stress-bearing fabric. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 52(3):337.
- Koskenniemi K, Koponen J, Kankainen M, Savijoki K, Tynkkynen S, de Vos WM, Kalkkinen N, Varmanen P. 2009. Proteome analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG using 2-D DIGE and mass spectrometry shows differential protein production in

- laboratory and industrial-type growth media. *Journal of Proteome Research* 8(11):4993-5007.
- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 14(8):737-743.
- Kruis W, Frič P, Pokrotnieks J, Lukáš M, Fixa B, Kaščák M, Kamm M, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M. 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53(11):1617-1623.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388(4):621-625.
- Kurtmann L, Carlsen CU, Risbo J, Skibsted LH. 2009. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology* 58(2):175-180.
- Lacroix C, Yildirim S. 2007. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology* 18(2):176-183.
- Lahtinen SJ, Ahokoski H, Reinikainen JP, Gueimonde M, Nurmi J, Ouwehand AC, Salminen SJ. 2008. Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria. *Letters in applied microbiology* 46(6):693-698.
- Lahtinen SJ, Gueimonde M, Ouwehand AC, Reinikainen JP, Salminen SJ. 2006. Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiology* 23(6):571-577.
- Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Gionchetti P, Rizzello F, Caramelli E, Matteuzzi D, Campieri M. 2003. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 38(2):165-172.
- Laroche C, Beney L, Marechal P, Gervais P. 2001. The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56(1):249-254.
- Larsson E, Tremaroli V, Lee YS, Koren O, Nookaew I, Fricker A, Nielsen J, Ley RE, Bäckhed F. 2011. Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut* doi:10.1136/gutjnl-2011-301104.
- Leach R, Scott W. 1959. The influence of rehydration on the viability of dried microorganisms. *Journal of General Microbiology* 21(2):295-307.
- Lebeer S, Claes IJJ, Vanderleyden J. 2012. Anti-inflammatory potential of probiotics: lipoteichoic acid makes a difference. *Trends in Microbiology* 20(1):5-10.
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 8(3):171-184.
- Lee KY, Heo TR. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology* 66(2):869-873.
- Lemetais G, Dupont S, Beney L, Gervais P. 2012. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Applied microbiology and biotechnology*:DOI: 10.1007/s00253-012-4014-3.
- Lepercq P, Relano P, Cayuela C, Juste C. 2004. *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 hydrolyses bile salts in the gastrointestinal tract of pigs. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 39(12):1266-1271.



- Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology* 61(10):3592-3597.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. 2006a. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124(4):837-848.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. 2006b. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444(7122):1022-1023.
- Leyer GJ, Li S, Mubasher ME, Reifer C, Ouwehand AC. 2009. Probiotic effects on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children. *Pediatrics* 124(2):172-179.
- Lian WC, Hsiao HC, Chou CC. 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International journal of food microbiology* 74(1-2):79-86.
- Lindberg E, Adlerberth I, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, Åberg N, Wold AE. 2004. High rate of transfer of *Staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora. *Journal of Clinical Microbiology* 42(2):530-534.
- Linders L, Meerdink G, Van 't Riet K. 1997. Effect of growth parameters on the residual activity of *Lactobacillus plantarum* after drying. *Journal of Applied Microbiology* 82(6):683-688.
- Liu CF, Tseng KC, Chiang SS, Lee BH, Hsu WH, Pan TM. 2011. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(12):2284-2291.
- Logan AC, Katzman M. 2005. Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy. *Medical Hypotheses* 64(3):533-538.
- Lopez M, Li N, Kataria J, Russell M, Neu J. 2008. Live and ultraviolet-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease flagellin-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition* 138(11):2264-2268.
- Lothigius Å, Sjöling Å, Svennerholm AM, Bölin I. 2010. Survival and gene expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* during long-term incubation in sea water and freshwater. *Journal of Applied Microbiology* 108(4):1441-1449.
- Macfarlane S, Dillon J. 2007. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 102(5):1187-1196.
- Macpherson AJ, Harris NL. 2004. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology* 4(6):478-485.
- Madhu AN, Awasthi SP, Reddy KBPK, Prapulla SG. 2011. Impact of freeze and spray drying on the retention of probiotic properties of *Lactobacillus fermentum*: An in vitro evaluation model. *International journal of microbiological research* 2(3):243-251.
- Mañé J, Pedrosa E, Lorén V, Gassull M, Espadaler J, Cuñé J, Audivert S, Bonachera M, Cabré E. 2011. A mixture of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 enhances systemic immunity in elderly subjects. A dose-response, double-blind, placebo-controlled, randomized pilot trial. *Nutrición Hospitalaria* 26(1):228-235.
- Manojlović V, Nedović VA, Kailasapathy K, Zuidam NJ, editors. 2010. Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. Springer ed: N.J. Zuidam and V.A. Nedović. 269-302 p.
- Marechal PA, de Maranon IM, Poirier I, Gervais P. 1999. The importance of the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorganisms: significance for minimal food processing. *Trends in Food Science & Technology* 10(1):15-20.
- Marin M, René F. 2000. Lyophilisation. *Techniques de l'ingénieur*.
- Masco L, Crockaert C, Van Hoorde K, Swings J, Huys G. 2007. *In vitro* assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of Bifidobacterium. *Journal of Dairy Science* 90(8):3572-3578.

- Mathys S, Meile L, Lacroix C. 2009. Co-cultivation of a bacteriocin-producing mixed culture of *Bifidobacterium thermophilum* RBL67 and *Pediococcus acidilactici* UVA1 isolated from baby faeces. *Journal of Applied Microbiology* 107(1):36-46.
- Maus J, Ingham S. 2003. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 95(1):146-154.
- Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122(1):107-118.
- McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Fekety R, Elmer GW, Moyer KA, Melcher SA, Bowen KE, Cox JL, Noorani Z. 1994. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA: the Journal of the American Medical Association* 271(24):1913-1918.
- McGuffee SR, Elcock AH. 2010. Diffusion, crowding & protein stability in a dynamic molecular model of the bacterial cytoplasm. *PLoS Computational Biology* 6(3):e1000694.
- Medalia O, Weber I, Frangakis AS, Nicastro D, Gerisch G, Baumeister W. 2002. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science* 298(5596):1209-1213.
- Meng XC, Stanton C, Fitzgerald G, Daly C, Ross R. 2008. Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry* 106(4):1406-1416.
- Mession JL, Assifaoui A, Cayot P, Saurel R. 2012a. Effect of pea proteins extraction and vicilin/legumin fractionation on the phase behavior in admixture with alginate. *Food Hydrocolloids* 29(2):335-346.
- Mession JL, Assifaoui A, Lafarge C, Saurel R, Cayot P. 2012b. Protein aggregation induced by phase separation in a Pea Proteins–Sodium alginate–Water ternary system. *Food Hydrocolloids* 28(2):333-343.
- Michida H, Tamalampudi S, Pandiella SS, Webb C, Fukuda H, Kondo A. 2006. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. *Biochemical engineering journal* 28(1):73-78.
- Mileykovskaya E, Dowhan W. 2000. Visualization of Phospholipid Domains in *Escherichia coli* by Using the Cardiolipin-Specific Fluorescent Dye 10-N-Nonyl Acridine Orange. *Journal of Bacteriology* 182(4):1172-1175.
- Mileykovskaya E, Dowhan W. 2009. Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788(10):2084-2091.
- Milhaud J. 2004. New insights into water-phospholipid model membrane interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1663(1-2):19-51.
- Mille Y, Beney L, Gervais P. 2002. Viability of *Escherichia coli* after combined osmotic and thermal treatment: a plasma membrane implication. *Biochimica et Biophysica Acta* 1567(1-2):41-48.
- Mille Y, Beney L, Gervais P. 2003. Magnitude and kinetics of rehydration influence the viability of dehydrated *E. coli* K-12. *Biotechnology and Bioengineering* 83(5):578-582.
- Mille Y, Obert JP, Beney L, Gervais P. 2004. New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium. *Biotechnology and Bioengineering* 88(1):71-76.
- Miorner H, Johansson G, Kronvall G. 1983. Lipoteichoic acid is the major cell wall component responsible for surface hydrophobicity of group A streptococci. *Infection and immunity* 39(1):336-343.

- Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. 2006. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. *Cryobiology* 52(1):27-32.
- Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quigley EMM. 2010. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 59(3):325-332.
- Mols M, Abee T. 2011. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environmental Microbiology* 13(6):1387-1394.
- Morimoto K, Takeshita T, Nanno M, Tokudome S, Nakayama K. 2005. Modulation of natural killer cell activity by supplementation of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in habitual smokers. *Preventive Medicine* 40(5):589-594.
- Muldrew K, McGann LE. 1994. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophysical Journal* 66(2):532-541.
- Muñoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, Godoy P, Segura A, Ramos JL. 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology* 72(1):472-477.
- Nagao F, Nakayama M, Muto T, Okumura K. 2000. Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64(12):2706-2708.
- Nagendra H, Sukumar N, Vijayan M. 1998. Role of water in plasticity, stability, and action of proteins: the crystal structures of lysozyme at very low levels of hydration. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 32(2):229-240.
- Ninomiya K, Matsuda K, Kawahata T, Kanaya T, Kohno M, Katakura Y, Asada M, Shioya S. 2009. Effect of CO<sub>2</sub> concentration on the growth and exopolysaccharide production of *Bifidobacterium longum* cultivated under anaerobic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107(5):535-537.
- Nista E, Candelli M, Cremonini F, Cazzato I, Zocco M, Franceschi F, Cammarota G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. 2004. *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 20(10):1181-1188.
- Nivoliez A, Camares O, Paquet-Gachinat M, Bornes S, Forestier C, Veisseire P. 2012. Influence of manufacturing processes on *in vitro* properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *Journal of Biotechnology* 160(3-4):236-241.
- Norrish RS. 1966. An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionery syrups. *International Journal of Food Science & Technology* 1(1):25-39.
- O'Hara AM, O'Regan P, Fanning Á, O'Mahony C, MacSharry J, Lyons A, Bienenstock J, O'Mahony L, Shanahan F. 2006. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* 118(2):202-215.
- O'Hara AM, Shanahan F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* 7(7):688-693.
- Odamaki T, Xiao J, Yonezawa S, Yaeshima T, Iwatsuki K. 2011. Improved viability of bifidobacteria in fermented milk by cocultivation with *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. *Journal of Dairy Science* 94(3):1112-1121.
- Olivares M, Diaz-Ropero MP, Sierra S, Lara-Villoslada F, Fonollá J, Navas M, Rodriguez JM, Xaus J. 2007. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* 23(3):254-260.
- Ouweland AC, Salminen S, Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82(1):279-289.

- Palmfeldt J, Hahn-Hägerdal B. 2000. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *International Journal of Food Microbiology* 55(1):235-238.
- Parente E, Ciocia F, Ricciardi A, Zotta T, Felis GE, Torriani S. 2010. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology* 144(2):270-279.
- Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F. 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science* 67(2):309-317.
- Pereira E, Panek AD, Eleutherio ECA. 2003. Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress Chaperones* 8(2):120-124.
- Perez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P. 2010. *In vitro* immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology* 215(12):996-1004.
- Persson E, Halle B. 2008. Cell water dynamics on multiple time scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(17):6266-6271.
- Petersen PB, Saykally RJ. 2008. Is the liquid water surface basic or acidic? Macroscopic vs. molecular-scale investigations. *Chemical Physics Letters* 458(4):255-261.
- Peterson BW, Sharma PK, van der Mei HC, Busscher HJ. 2012. Bacterial cell surface damage due to centrifugal compaction. *Applied and Environmental Microbiology* 78(1):120-125.
- Picot A, Lacroix C. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal* 14(6):505-515.
- Piette J. 1991. New trends in photobiology: biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 11(3-4):241-260.
- Pisal S, Wawde G, Salvankar S, Lade S, Kadam S. 2006. Vacuum foam drying for preservation of LaSota virus: effect of additives. *Aaps Pharmscitech* 7(3):30-37.
- Plumed-Ferrer C, Koistinen KM, Tolonen TL, Lehesranta SJ, Kärenlampi SO, Mäkimattila E, Joutsjoki V, Virtanen V, Von Wright A. 2008. Comparative study of sugar fermentation and protein expression patterns of two *Lactobacillus plantarum* strains grown in three different media. *Applied and Environmental Microbiology* 74(17):5349-5358.
- Poirier I, Maréchal PA, Evrard C, Gervais P. 1998. *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* responses to osmotic stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50(6):704-709.
- Poirier I, Maréchal PA, Gervais P. 1997. Effects of the kinetics of water potential variation on bacteria viability. *Journal of Applied Microbiology* 82(1):101-106.
- Poirier I, Maréchal PA, Richard S, Gervais P. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. *Journal of Applied Microbiology* 86(1):87-92.
- Poolman B, Glaasker E. 1998. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol* 29(2):397-407.
- Potts M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 58(4):755-805.
- Prantera C, Scribano M, Falasco G, Andreoli A, Luzi C. 2002. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus* GG. *Gut* 51(3):405-409.

- Prestrelski SJ, Tedeschi N, Arakawa T, Carpenter JF. 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal* 65(2):661-671.
- Price AH, Atherton NM, Hendry GAF. 1989. Plants under drought-stress generate activated oxygen. *Free Radical Research* 8(1):61-66.
- Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. 2002. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters* 217(2):133-139.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464(7285):59-65.
- Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K. 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126(2):520-528.
- Ragoonanan V, Malsam J, Bond DR, Aksan A. 2008. Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778(10):2283-2290.
- Rajilić-Stojanović M, Smidt H, De Vos WM. 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental Microbiology* 9(9):2125-2136.
- Rault A, Béal C, Ghorbal S, Ogier JC, Bouix M. 2007. Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology* 55(1):35-43.
- Reddy KBPK, Madhu AN, Prapulla SG. 2009. Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria. *International Journal of Dairy Technology* 62(2):240-248.
- Richard J, Benoît JP. 2000. Microencapsulation. *Techniques de l'ingénieur Référence J2210*.
- Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9(1):29-33.
- Roy I, Gupta MN. 2004. Freeze drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 39(2):165-177.
- Ruiz-Moyano S, Martín A, Benito MJ, Nevado FP, de Guía Córdoba M. 2008. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science* 80(3):715-721.
- Rumney CJ, Rowland IR. 1992. *In vivo* and *in vitro* models of the human colonic flora. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 31(4):299-331.
- Saarela M. 2007. Methods to improve the viability and stability of probiotics. *Functional dairy products* 2:391-403.
- Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Matto J, Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84(3):197-215.
- Sánchez B, Bressollier P, Urdaci MC. 2008. Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 54(1):1-17.
- Sanders ME, Akkermans LMA, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, Huys G, Levy DD, Lutgendorff F, Mack D. 2010. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 1(3):164-185.
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. 2007a. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress* 23(2):302-315.

- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. 2008. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology* 105(1):1-13.
- Santivarangkna C, Wenning M, Foerst P, Kulozik U. 2007b. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Journal of Applied Microbiology* 102(3):748-756.
- Sashihara T, Sueki N, Furuichi K, Ikegami S. 2007. Effect of growth conditions of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 on the immunostimulatory activity for production of interleukin-12 (p70) by murine splenocytes. *International Journal of Food Microbiology* 120(3):274-281.
- Savage DC. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Reviews in Microbiology* 31(1):107-133.
- Savard T, Gardner N, Champagne C. 2003. Growth of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* cultures in a vegetable juice medium, and their stability during storage in a fermented vegetable juice. *Sciences des Aliments* 23(2):273-283.
- Schebor C, Burin L, Buera MP, Chirife J. 1999. Stability to hydrolysis and browning of trehalose, sucrose and raffinose in low-moisture systems in relation to their use as protectants of dry biomaterials. *LWT - Food Science and Technology* 32(8):481-485.
- Schwab C, Vogel R, Gänzle MG. 2007. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology* 55(2):108-114.
- Shabala L, Ross T. 2008. Cyclopropane fatty acids improve *Escherichia coli* survival in acidified minimal media by reducing membrane permeability to H<sup>+</sup> and enhanced ability to extrude H<sup>+</sup>. *Research in Microbiology* 159(6):458-461.
- Shanahan F. 2002. The host-microbe interface within the gut. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 16(6):915-931.
- Sheih YH, Chiang BL, Wang LH, Liao CK, Gill HS. 2001. Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *Journal of the American College of Nutrition* 20(2):149-156.
- Shen Q, Shang N, Li P. 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Bifidobacterium animalis* 01 isolated from centenarians. *Current Microbiology* 62(4):1097-1103.
- Siaterlis A, Deepika G, Charalampopoulos D. 2009. Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Letters in Applied Microbiology* 48(3):295-301.
- Simonin H, Beney L, Gervais P. 2007. Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: mechanisms of cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768(6):1600-1610.
- Simonin H, Beney L, Gervais P. 2008. Controlling the membrane fluidity of yeasts during coupled thermal and osmotic treatments. *Biotechnology and Bioengineering* 100(2):325-333.
- Simpson P, Stanton C, Fitzgerald G, Ross R. 2005. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology* 99(3):493-501.
- Singh H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology* 18(5):240-251.
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G and others. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota

- analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(43):16731-16736.
- Sonnenburg JL, Angenent LT, Gordon JI. 2004. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nature Immunology* 5(6):569-573.
- Souza T, Zacarías M, Silva A, Binetti A, Reinheimer J, Nicoli J, Vinderola G. 2012. Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 51A are differentially affected by technological variables in fermented milks. *Journal of Applied Microbiology* 112(6):1184-1192.
- Speck ML, Myers RP. 1946. The viability of dried skim-milk cultures of *Lactobacillus bulgaricus* as affected by the temperature of reconstitution. *Journal of Bacteriology* 52(6):657.
- Strasser S, Neureiter M, Gepl M, Braun R, Danner H. 2009. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 107(1):167-177.
- Taillandier P, Gilis F, Portugal FR, Laforce P, Strehaiano P. 1996. Influence of medium composition, pH and temperature on the growth and viability of *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Letters* 18(7):775-780.
- Takeda K, Okumura K. 2007. Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the human NK-cell activity. *The Journal of Nutrition* 137(3):791-793.
- Teixeira P, Castro H, Kirby R. 1995. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology* 78(4):456-462.
- Teixeira P, Castro H, Kirby R. 1996. Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Letters in Applied Microbiology* 22:34-38.
- Teixeira P, Castro H, Mohácsi-Farkas C, Kirby R. 1997. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology* 83(2):219-226.
- Teusink B, Smid EJ. 2006. Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 4(1):46-56.
- Thompson SS, Flury M, Yates MV, Jury WA. 1998. Role of the air-water-solid interface in bacteriophage sorption experiments. *Applied and Environmental Microbiology* 64(1):304-309.
- Thompson SS, Yates MV. 1999. Bacteriophage inactivation at the air-water-solid interface in dynamic batch systems. *Applied and Environmental Microbiology* 65(3):1186-1190.
- Thorpe G, Fong C, Alic N, Higgins V, Dawes I. 2004. Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(17):6564-6569.
- To B, Etzel MR. 1997. Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *Journal of Food Science* 62(3):576-578.
- Trevors J. 2012. Can dead bacterial cells be defined and are genes expressed after cell death? *Journal of Microbiological Methods* 90(1):25-28.
- Trofimova Y, Walker G, Rapoport A. 2010. Anhydrobiosis in yeast: influence of calcium and magnesium ions on yeast resistance to dehydration–rehydration. *FEMS Microbiology Letters* 308(1):55-61.
- Trouwborst T, Kuyper S, De Jong J, Plantinga A. 1974. Inactivation of some bacterial and animal viruses by exposure to liquid-air interfaces. *Journal of General Virology* 24(1):155-165.

- Turnbaugh PJ, Gordon JI. 2009. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *The Journal of Physiology* 587(17):4153-4158.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP. 2008. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457(7228):480-484.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. 2007. The human microbiome project. *Nature* 449(7164):804-810.
- Tymczyszyn E, del Rosario Diaz M, Gómez Zavaglia A, Disalvo E. 2007a. Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *Journal of Applied Microbiology* 103(6):2410-2419.
- Tymczyszyn E, Díaz R, Pataro A, Sandonato N, Gómez-Zavaglia A, Disalvo EA. 2008. Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *International Journal of Food Microbiology* 128(2):342-347.
- Tymczyszyn E, Gomez-Zavaglia A, Disalvo E. 2007b. Effect of sugars and growth media on the dehydration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology* 102(3):845-851.
- van Baarlen P, Troost F, van der Meer C, Hooiveld G, Boekschoten M, Brummer RJM, Kleerebezem M. 2011. Human mucosal *in vivo* transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(1):4562-4569.
- van Baarlen P, Troost FJ, Van Hemert S, Van Der Meer C, De Vos WM, De Groot PJ, Hooiveld GJEJ, Brummer RJM, Kleerebezem M. 2009. Differential NF- $\kappa$ B pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(7):2371-2376.
- Ventling BL, Mistry V. 1993. Growth characteristics of bifidobacteria in ultrafiltered milk. *Journal of Dairy Science* 76(4):962-971.
- Viernstein H, Raffalt J, Polheim D. 2005. Stabilisation of probiotic microorganisms. *Applications of cell immobilisation biotechnology* 8B(4):439-453.
- Vigh L, Maresca B, Harwood JL. 1998. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends in Biochemical Sciences* 23(10):369-374.
- Vinderola G, Zacarías M, Bockelmann W, Neve H, Reinheimer J, Heller K. 2011. Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices *Food Microbiology* 30(1):274-280.
- Volkert M, Ananta E, Luscher C, Knorr D. 2008. Effect of air freezing, spray freezing, and pressure shift freezing on membrane integrity and viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Food Engineering* 87(4):532-540.
- Wagner H. 2002. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Current opinion in microbiology* 5(1):62-69.
- Walter J. 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology* 74(16):4985-4996.
- Walter J, Ley RE. 2011. The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annual Review of Microbiology* 65:411-429.
- Wang KY, Li SN, Liu CS, Perng DS, Su YC, Wu DC, Jan CM, Lai CH, Wang TN, Wang WM. 2004a. Effects of ingesting *Lactobacillus*-and *Bifidobacterium*-containing yogurt



- in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. The American Journal of Clinical Nutrition 80(3):737-741.
- Wang Y, Corrieu G, Béal C. 2005. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. Journal of Dairy Science 88(1):21-29.
- Wang YC, Yu RC, Chou CC. 2004b. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. International Journal of Food Microbiology 93(2):209-217.
- Whitehead K, Versalovic J, Roos S, Britton RA. 2008. Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. Applied and Environmental Microbiology 74(6):1812-1819.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. Proceedings of the National Academy of Sciences 95(12):6578-6583.
- Wilson M. 2008. Bacteriology of humans: an ecological perspective. Malden, MA, USA: Blackwell Publishing Ltd.
- Wong C, Ustunol Z. 2006. Mode of inactivation of probiotic bacteria affects interleukin 6 and interleukin 8 production in human intestinal epithelial-like Caco-2 cells. Journal of Food Protection 69(9):2285-2288.
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science 334(6052):105-108.
- Yonezawa S, Xiao JZ, Odamaki T, Ishida T, Miyaji K, Yamada A, Yaeshima T, Iwatsuki K. 2010. Improved growth of bifidobacteria by cocultivation with *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. Journal of Dairy Science 93(5):1815-1823.
- Zayed G, Roos YH. 2004. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. Process Biochemistry 39(9):1081-1086.
- Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. 2005. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor-alpha-induced Interleukin-8 production in Caco-2 cells. The Journal of Nutrition 135(7):1752-1756.
- Zhao G, Zhang G. 2005. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze drying. Journal of Applied Microbiology 99(2):333-338.
- Ziegelhoffer EC, Donohue TJ. 2009. Bacterial responses to photo-oxidative stress. Nature Reviews Microbiology 7(12):856-863.
- Zimmermann U. 1977. Cell turgor pressure regulation and turgor pressure-mediated transport processes. Symposia of the Society for Experimental Biology 31:117-154.
- Zocco M, Ainora M, Gasbarrini G, Gasbarrini A. 2007. *Bacteroides thetaiotaomicron* in the gut: molecular aspects of their interaction. Digestive and Liver Disease 39(8):707-712.
- Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, de Visser JAGM, de Vos WM. 2001. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. Microbial Ecology in Health and Disease 13(3):129-134.