



# THESE

présentée à



L'UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS – MOSTAGANEM

Spécialité: Nutrition humaine.

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN SCIENCES

De l'université de Mostaganem

Par

**Hasnia ZIAR**

## **CONTRIBUTION A L'AMELIORATION DE LA SURVIE DE BACTERIES LACTIQUES D'INTERET ASSIMILATRICES DE CHOLESTEROL.**

Soutenue le.....2013 devant le jury d'examen composé de :

Président : Mr Halbouche Miloud, Professeur à l'univ. Mostaganem.  
Rapporteur : Mr Riazi Ali, Professeur à l'univ. Mostaganem.  
Examineurs : Mr Benalaoua Said, Professeur à l'univ. Béjaia.  
Mr Dilmi-Bouras Abdelkader, Professeur à l'univ. Chlef.  
Mr Benali Mohamed, Professeur à l'univ. Sidi-Bel-Abbès.  
Mr Koceir Elhadj-Ahmed, Professeur à l'USTHB, Alger.

**Année Universitaire : 2012 / 2013.**

## **Dédicace**

Je dédie mon travail de thèse à :

Mon cher père et ma chère mère. Après le bon Dieu, C'est grâce à vous que je suis arrivée aujourd'hui à ce niveau d'étude. Je ne trouverai jamais les mots pour vous remercier autant pour toute la veille morale et physique sur moi.

Mes chers frères et sœurs.

Toute la grande famille sans exception !

*Hasnia*

## **AVANT- PROPOS**

La plus grande partie de ce travail de thèse a été réalisée au sein du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem. Certaines expériences spécifiques comme celles sur la production microbienne d'exopolysaccharides et d'isomères conjugués d'acide linoléique (CLA) ont été réalisées à l'unité mixte de recherches UMR1319, précisément dans l'équipe MICALIS (INRA de Jouy-En-Josas, France). L'analyse qualitative et quantitative des CLA a été faite à l'unité de recherches UR1213 sur les Herbivores dans l'équipe DIMA (INRA de Theix, Saint-Genès-Champanelle, Clermont Ferrand, France).

Je tiens, tout d'abord, à témoigner ma profonde reconnaissance à mon directeur de recherches, Mr Riazi Ali, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour m'avoir acceptée dans son laboratoire, initiée à la recherche depuis le démarrage de mon magister jusqu'au doctorat, et pour avoir consacré tout son temps et ses moyens à la bonne conduite de ce travail. Soyez rassuré de ma gratitude et de mon profond respect.

Mes chaleureux et respectueux remerciements sont adressés à Mr Halbouche Miloud, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, qui a bien voulu présider le jury de ma thèse malgré l'étroitesse du temps qui lui est imparti pour ses nombreuses responsabilités pédagogiques et scientifiques.

Je suis honorée par la participation de Mr Benalaoua Said, Professeur à l'Université Abderahmane Mira de Béjaïa et actuel président de la sous-commission universitaire nationale «sciences de la nature et de la vie-sciences médicales et sciences de la terre » à l'examen de cette thèse.

Je remercie également mon enseignant, Mr Dilmi-Bouras Abdelkader, Professeur à l'Université Hassiba Ben Bouali de Chlef et actuel président de la Société Algérienne de Microbiologie (SAM), pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements sont aussi adressés à Mr Benali Mohamed, Professeur à l'Université Djillali Liabes de Sidi-Bel-Abbès, pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie Mr Koceir Elhadj-Ahmed, Professeur à l'Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene (USTHB) de Bab Ezzouar à Alger et vice-président de la

Société Algérienne de Nutrition (SAN), d'avoir aimablement accepté d'apporter ses critiques à ce travail.

Je tiens à remercier également le Dr Philippe Gérard (Directeur de recherches à l'UMR1319, INRA de Jouy-En-Josas, France) pour avoir accepté de m'accueillir dans son équipe, mis à ma disposition les moyens pour réaliser mes manipulations spécifiques et participé de très près à la critique des résultats des chapitres IV et V ayant fait l'objet de publications.

Je souhaite aussi remercier le Pr Michel Doreau, Directeur de recherches dans l'UR1213, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et les conseils pratiques qu'il m'a prodigué lors de l'analyse qualitative et quantitative des conjugués de l'acide linoléique.

Je voudrais également remercier tout particulièrement toutes ces personnes rencontrées dans les deux laboratoires français où j'avais séjourné et je pense à Catherine pour son aide et l'attention qu'elle a bien voulu accorder au suivi de la préparation d'échantillons CLA pour chromatographie, à Jean-Jacques le microbiologiste pour ses précieux conseils, enfin à Sophie Laverroux et Hélène Albarello pour les petites ficelles de manipulations en CPG-FID.

Le traitement statistique des résultats de cette thèse a été réalisé par Samira que je remercie vivement.

Je salue et remercie chaleureusement mes amis et collègues du LMBAFS pour leurs encouragements, leurs précieux conseils et leur aide morale.

Enfin, un immense merci à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation, à mes étudiants de l'université Hassiba Ben Bouali de Chlef où j'ai commencé ma carrière d'enseignante et ceux de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem où j'exerce présentement. Je remercie mes étudiants d'avoir accepté d'avancer avec moi sur des terrains de recherche nouveaux, parfois glissants, ainsi que pour leur soutien, leur dévouement et le respect dont ils ont fait preuve à mon égard.

*Hasnia Ziar*

## RESUME

Cette étude a pour objectif principal la promotion de la survie de quatre bactéries lactiques d'intérêt laitier aux hostilités digestives simulées *in vitro* et aux conditions qui règnent dans l'aliment vecteur (le yaourt mixte) entreposé à 4°C pendant quatre semaines. Il s'agit des starters du yaourt (*Streptococcus thermophilus* TA040 et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340), de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 qui ont, d'abord, fait l'objet d'une série de tests d'amélioration de leur survie aux hostilités digestives simulées *in vitro* pour qu'elles puissent assurer efficacement leur rôle physiologique bénéfique attendu chez l'hôte et, ensuite, été explorées pour leur pouvoir à assimiler du cholestérol et à bioconvertir l'acide linoléique en ses isomères conjugués (CLA ou conjugated linoleic acid). En présence de bile ou d'acide cholique, le polysorbate 80 (additif alimentaire autorisé) améliore sensiblement la survie des starters du yaourt (souches LB340 et TA040) qui incorporent l'acide oléique exogène dans leur membrane où le profil en certains acides gras (les acides octadécanoïques C18 et leurs dérivés méthyliques: C19 cyc, ainsi que les acides gras en C20 ou C21) révélé par l'analyse chromatographique en phase gazeuse varie en réponse à la présence de bile dans le milieu. Le polysorbate 80 induit une augmentation du rapport acides gras insaturés/acides gras saturés chez ces deux souches starters. Leur survie est également préservée en milieu gastrique simulé (pH 2.5). Leur activité enzymatique BSH (Bile Salt Hydrolase) se trouve accentuée. La microencapsulation des deux bactéries bénéfiques (*L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. lactis* Bb12) dans le gel d'alginate de calcium-amidon résistant s'est révélée comme un outil efficace pour la préservation de leur survie *in vitro* aux hostilités digestives (alpha amylase salivaire, acidité gastrique et sécrétions biliaires). La microencapsulation exerce le même effet promoteur de la survie de ces deux bactéries dans le yaourt mixte (en présence des souches starters) entreposé quatre semaines à 4°C. Le pouvoir bactérien assimilateur *in vitro* (MRS) de cholestérol s'est révélé souche-dépendant et se déroule au cours des premières 24 h de culture. Il est stimulé par les divers prébiotiques (mannitol, raffinose, pectine et lactulose) et ingrédients laitiers ( $\beta$ -caséine et hydrolysats protéiques laitiers) testés. L'acide linoléique ajouté à 0.5 ou 1 mg.mL<sup>-1</sup> dans les monocultures MRS et lait est bioconverti par les quatre souches étudiées en ses isomères conjugués, les CLA, avec la prédominance de l'isomère 9-*cis*,11-*trans* ou acide ruménique. Les souches *S. thermophilus* et *B. lactis* sont les plus actives dans cette production de CLA.

**Mots clefs:** Bactéries lactiques– Survie- Prébiotiques- Protéines lactières-Polysorbate80- Microencapsulation- Cholestérol - Acide linoléique – CLA.

## ABSTRACT

The main goal of this study is to improve the survival of four dairy-related bacteria: *Streptococcus thermophilus* TA040, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12, when present in four weeks stored yogurt or exposed to *in vitro* simulated deleterious digestive conditions in order to ensure that they can express their expected beneficial effects in the host. Cholesterol assimilation and linoleic acid bioconversion activities of these strains were then explored. Polysorbate 80, an authorized food emulsifier, significantly improved the survival of bile or cholic acid stressed yogurt starters (strains TA040 and LB340), and increased the ratio of the unsaturated and saturated fatty acids in their cell membranes. Such effect is probably related to the bacterial uptake of exogenous oleic acid supplied by polysorbate 80, since the revealed gas chromatographic profiles of some fatty acids (octadecanoic acid C18 and its methylic form C19 cyc, and C20-21 fatty acids) varied with the presence of bile. Moreover, increased Bile Salt Hydrolase activity and survival to pH 2.5 by the presence of polysorbate 80 in the starter cultures, were monitored. The protective effect of microencapsulation in calcium-alginate-resistant starch mixed gel of *L. rhamnosus* LBRE-LSAS and *B. lactis* Bb12, in the simulated gastro-intestinal conditions (salivary alpha amylase, gastric acidity and bile secretions), as well as in four weeks stored mix yogurt (with free starter strains), was herein clearly demonstrated. The main *in vitro* (MRS) bacterial cholesterol assimilation occurred during the first 24 h of culture and seems to be strain-dependent. It could be markedly improved by the different assayed prebiotics (mannitol, raffinose, pectin and lactulose) or milk proteins ( $\beta$ -casein, dairy protein hydrolysates). All the four assayed strains (monocultures) were able to transform the added linoleic acid (0.5 and 1 mg.mL<sup>-1</sup> in MRS or milk) into its conjugated isomers (CLA) with the predominance of *cis*-9, *trans*-11 namely rumenic acid. *S. thermophilus* and *B. lactis* strains were the most efficient in this CLA production.

**Keywords:** Lactic acid bacteria– Survival- Prebiotics - Milk Proteins- Polysorbate 80- Microencapsulation- Cholesterol – Linoleic acid - CLA.

## Liste des abréviations

- Bb12: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.
- LBRE-LSAS: *Lactobacillus rhamnosus*.
- LB340: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
- TA040: *Streptococcus thermophilus*.
- AL : acide linoléique.
- CLA : isomère conjugué d'acide linoléique (conjugated linoleic acid).
- AR : amidon résistant.
- ARm: acide ruménique.
- *c* : acide gras de configuration *cis*.
- *t* : acide gras de configuration *trans*.
- *tt* : acide gras de configuration *trans trans*.
- MRS : milieu spécifique pour les lactobacilles décrit par De Man, Rogosa et Sharpe.
- BSH : Bile Salt Hydrolase (hydrolase des sels biliaires)
- 16S RNA : le constituant ARN de la petite sous-unité ribosomique de 30S.
- HT29 : lignée cellulaire isolée d'un adénocarcinome colique humain servant comme modèle d'étude en culture cellulaire.
- Caco-2 : un autre modèle de lignée cellulaire isolée d'un adénocarcinome colique humain servant aussi comme modèle d'étude en culture cellulaire.
- MRS-THIO+G : MRS bouillon additionné de thioglycollate de sodium à 2% et de glucose à 2%.
- MRS-THIO-G : MRS bouillon additionné de thioglycollate de sodium à 2% et sans glucose.
- E 433 : additif alimentaire polysorbate 80.
- EPS : Exopolysaccharides.
- U : Unité Enzymatique.
- MGS : modèle gastro-intestinal simulé.
- MIS : modèle intestinal simulé.
- TIC: Techniques d'Immobilisation Cellulaire.

## Liste des tableaux et des figures

### Liste des tableaux

#### **CHAPITRE I : Bactéries lactiques, statut probiotique et assimilation de cholestérol.**

- Tableau 1 :** Principales souches probiotiques..... pp 8.
- Tableau 2 :** Exemples de souches probiotiques industrielles (Guarner et al., 2008). ..... pp 9.
- Tableau 3 :** Les différents prébiotiques avérés (en gras) et supposés (en italique) (Frank, 2002). .....pp12.
- Tableau 4 :** Produits et ingrédients laitiers dérivant des peptides bioactifs et existant sur le marché mondial (Korhonen et Pihlanto, 2006 ; Patterson et al., 2008). ..... pp 14.
- Tableau 5 :** Exemples de peptides bioactifs issus des protéines de lait par action de divers microorganismes et/ou enzymes microbiennes (Hartmann et Meisel, 2007). ..... pp 15.
- Tableau 6 :** Les CLA dans les aliments (Menon et al., 2010). ..... pp 19.
- Tableau 7 :** Effet de l'acidité sur la survie de quelques souches probiotiques. .... pp 30.
- Tableau 8 :** Les principales études récentes sur la microencapsulation des microorganismes probiotiques. pp 40.
- Tableau 9 :** Détails de quelques études évaluant l'effet hypocholestérolémiant des produits laitiers fermentés aux probiotiques (d'après Pereira et Gibson, 2002a). ..... pp 46.
- Tableau 10 :** Sommaire de quelques études *in vivo* sur l'effet des fructo-oligosaccharides (FOS) sur le métabolisme lipidique (d'après Pereira et Gibson, 2002a). ..... pp 49.

#### **CHAPITRE II : Pouvoir d'assimilation de cholestérol chez quatre souches lactiques.**

- Tableau 11 :** Caractéristiques des souches bactériennes utilisées dans cette étude (Wang et al., 2005; Foligne et al., 2007). ..... pp 56.

#### **CHAPITRE III : Effets du polysorbate 80 « E 433 » sur la survie des starters du yaourt exposés aux conditions digestives simulées.**

- Tableau 12 :** Effet du polysorbate 80 (1% : v/v) sur l'activité enzymatique de la BSH chez les souches starters de yaourt en présence de 0.5% (p/v) bile ou acide cholique. .... pp 71.
- Tableau 13 :** Effet du polysorbate 80 (E 433) sur la survie des souches starters du yaourt à l'acidité gastrique simulée (pH 2.5). ..... pp 74.
- Tableau 14 :** Effet du polysorbate 80 sur la croissance (Log UFC. mL<sup>-1</sup>) de *Streptococcus thermophilus* TA040 en présence de bile ou d'acide cholique. .... pp 76.
- Tableau 15 :** Effet du polysorbate 80 sur la croissance (Log UFC. mL<sup>-1</sup>) de *Lactobacillus bulgaricus* LB340 en présence de bile ou d'acide cholique. .... pp 76.

**Tableau 16:** La composition cellulaire en acides gras (%) de *L. bulgaricus* LB340 cultivée<sup>#</sup> en présence de 0.3% bile et avec ou sans l'ajout de polysorbate 80. .... pp 79.

**Tableau 17 :** La composition cellulaire en acides gras (%) de *S. thermophilus* TA 040 cultivée en présence de 0.3% bile et avec ou sans l'ajout de polysorbate 80. .... pp 81.

**CHAPITRE IV : Effet de la microencapsulation sur la survie *in vitro* de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 dans le yaourt mixte et dans des conditions digestives simulées.**

**Tableau 18 :** Différents types de cultures réalisées et conditions de culture. . .... pp 89.

**CHAPITRE V : Effets d'ingrédients protéiques laitiers et de prébiotiques sur la survie à la bile et le pouvoir d'assimilation de cholestérol chez les quatre souches lactiques cultivées sur milieu MRS.**

**Tableau 19 :** Fermentescibilité (DO\*<sub>620</sub> et pH\*) de la  $\beta$ -caséine et des hydrolysats protéiques laitiers par les souches lactiques sur milieu MRS<sup>st</sup>. .... pp 117

**Tableau 20 :** Fermentescibilité (DO\*<sub>620</sub> et pH\*) des prébiotiques par les souches lactiques sur milieu MRS<sup>st</sup>. .... pp 120.

**Tableau 21 :** Effets des ingrédients protéiques laitiers sur l'activité enzymatique spécifique de BSH\* (U. mg<sup>-1</sup> protéines) dans les cultures des souches étudiées en phase stationnaire. .... pp 123.

**CHAPITRE VI : Pouvoir de conversion de l'acide linoléique en isomères conjugués par les bactéries lactiques.**

**Tableau 22 A :** Pouvoir bactérien de bioconversion de l'acide linoléique additionné à 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> en isomères CLA dans les surnageants des cultures MRS de 24 h. .... pp 148.

**Tableau 22 B :** Pouvoir bactérien de bioconversion de l'acide linoléique additionné à 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> en isomères CLA dans les lactosérums des cultures lait écrémé de 24 h. .... pp 149.

**Tableau 23A :** Pouvoir bactérien de bioconversion de l'acide linoléique additionné à 1 mg. mL<sup>-1</sup> en isomères CLA dans les surnageants des cultures MRS de 24 h. .... pp 151.

**Tableau 23 B :** Pouvoir bactérien de bioconversion de l'acide linoléique additionné à 1 mg. mL<sup>-1</sup> en isomères CLA dans les lactosérums des cultures lait écrémé de 24 h. .... pp 153.

### **Liste des figures**

**CHAPITRE I : Bactéries lactiques, statut probiotique et assimilation de cholestérol.**

**Figure 1 :** Structures moléculaires simplifiées de l'acide linoléique (AL) et ses deux isomères majeurs (Morin, 2005). .... pp 17.

- Figure 2 :** Métabolisme de l'acide linoléique chez les bactéries fécales de l'homme (d'après Devillard et al., 2007). ..... pp 21.
- Figure 3 :** Multiples cibles de l'isomère CLA 10*trans*,12*cis* sur la différenciation et le métabolisme de l'adipocyte (d'après Pariza, 2001). ..... pp 24.
- Figure 4 :** Morphologie cellulaire (×100, microscopie confocale) et mise en évidence des granules lipidiques de cholestérol et de triacylglycérol (colorées en rouges) dans les macrophages traitées pendant 2 jours avec BSA (témoin véhicule), 30 µM de C18:2 9*cis*,11*trans*, de C18:2 10*trans*,12*cis* ou d'acide linoléique (d'après Stachowska et al., 2010). ..... pp 26.
- Figure 5 :** Observation au microscope électronique (grossissement ×50 080) de l'aspect des cellules de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 traitées par les sels biliaires (a) par l'ATDC (acide taurodésoxycholique), (b) par l'ADC (acide désoxycholique), ou (c) dans les témoins non traitées (Taranto et al., 2006). ..... pp 31.
- Figure 6 :** Microencapsulation par la technique d'émulsion (Heidebach et al., 2012)... ..... pp 33.
- Figure 7 :** Microencapsulation par la technique d'extrusion (Heidebach et al., 2012). .... .....pp 34.
- Figure 8 :** Représentation schématique des différents types de capsule: (a) type réservoir, (b) type matrice, et (c) type enveloppe et matrice (Burgain et Tous, 2011). ..... pp 35.
- Figure 9 :** Principales étapes de gélification de l'alginate de sodium (d'après Vallée, 2007). ..... pp 37.

## CHAPITRE II : Pouvoir d'assimilation de cholestérol chez quatre souches lactiques.

- Figure 10:** Cholestérol assimilé (en mg.g<sup>-1</sup> de cellules sèches) par *L. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. lactis* Bb12, *S. thermophilus* TA 040 et *L. bulgaricus* LB340 cultivées **24** h en présence de bile (0.3%, p/v) soit sur le milieu MRS glucosé (MRS-THIO+G, 2% p/v) (■) soit sur le milieu MRS sans glucose (MRS-THIO-G) (■). L'inoculum est de 5. 10<sup>6</sup> à 10<sup>7</sup> cellules mL<sup>-1</sup> et est utilisé à 1% provenant d'une culture jeune (18 h). Le cholestérol a été ajouté à une concentration finale de 65- 85 µg. mL<sup>-1</sup>. \* : P<0.05, \*\* : P<0.01 et \*\*\* : P<0.001. Les comparaisons sont faites en comparant les résultats du milieu MRS-THIO+G à ceux de MRS-THIO-G. .... pp 60.
- Figure 11:** Cholestérol assimilé (en mg.g<sup>-1</sup> de cellules sèches) par *L. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. lactis* Bb12, *S. thermophilus* TA 040 et *L. bulgaricus* LB340 cultivées **48** h en présence de bile (0.3%, p/v) soit sur le milieu MRS glucosé (MRS-THIO+G, 2% p/v) (■) soit sur le milieu MRS sans glucose (MRS-THIO-G) (■). L'inoculum est de 5. 10<sup>6</sup> à 10<sup>7</sup> cellules mL<sup>-1</sup> et est utilisé à 1% provenant d'une culture jeune (18 h). Le cholestérol a été ajouté à une concentration finale de 65- 85 µg. mL<sup>-1</sup>. \* : P<0.05, \*\* : P<0.01 et \*\*\* : P<0.001. Les comparaisons sont faites en comparant les résultats du milieu MRS-THIO+G à ceux de MRS-THIO-G. .... pp 61.
- Figure 12 :** Pouvoir d'assimilation de cholestérol des souches lactiques cultivées 48 h dans le milieu MRS-THIO (2% thioglycollate de sodium) avec ou sans glucose. .... pp 63.

**CHAPITRE IV : Effet de la microencapsulation sur la survie *in vitro* de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 dans le yaourt mixte et dans des conditions digestives simulées.**

**Figure 13 :** Viabilité (log UFC. g<sup>-1</sup>) de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 **libre** et des starters du yaourt *S. thermophilus* « St » et *L. bulgaricus* « Lb » libres au cours de l'entreposage à 4°C du yaourt. L'inoculum utilisé était à 3% (v/v) et composé des trois souches associées dans un rapport = 1. Les valeurs représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes ± SD (n=9). ... pp 93.

**Figure 14 :** Viabilité (log UFC. g<sup>-1</sup>) de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 **encapsulée** et des starters du yaourt *S. thermophilus* « St » et *L. bulgaricus* « Lb » libres au cours de l'entreposage à 4°C du yaourt. L'inoculum utilisé était à 3% (v/v) et composé des trois souches associées dans un rapport = 1. Les valeurs représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes ± SD (n=9). .... pp 93.

**Figure 15 :** Evolution du pH des yaourts mixtes entreposés à 4°C contenant la souche *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 **libre** ou **encapsulée** avec les starters du yaourt *S. thermophilus* « St » et *L. bulgaricus* « Lb ». L'inoculum utilisé était à 3% (v/v) et composé des trois souches (1 :1 :1). Les valeurs représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes ± SD (n=9). ..... pp 95.


**Figure 16 :** Viabilité (log UFC. g<sup>-1</sup>) de *L.rhamnosus* LBRE-LSAS **libre** et des starters du yaourt *S. thermophilus* « St » et *L. bulgaricus* « Lb » libres au cours de l'entreposage à 4°C du yaourt. L'inoculum utilisé était à 3% (v/v) et composé des trois souches associées dans un rapport = 1. Les valeurs représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes ± SD (n=9)..... pp 97.

**Figure 17 :** Viabilité (log UFC. g<sup>-1</sup>) de *L.rhamnosus* LBRE-LSAS **encapsulée** et des starters du yaourt *S. thermophilus* « St » et *L. bulgaricus* « Lb » libres au cours de l'entreposage à 4°C du yaourt. L'inoculum utilisé était à 3% (v/v) et composé des trois souches associées dans un rapport = 1. Les valeurs représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes ± SD (n=9). ..... pp 97.

**Figure 18 :** Evolution du pH des yaourts mixtes entreposés à 4°C contenant la souche *L. rhamnosus* LBRE-LSAS **libre** ou **encapsulée** avec les starters du yaourt *S. thermophilus* « St » et *L. bulgaricus* « Lb ». L'inoculum utilisé était à 3% (v/v) et est composé des trois souches (1 :1 :1). Les valeurs représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes ± SD (n=9). ..... pp 99.

**Figure 19 :** Teneurs en exopolysaccharides (EPS) produits au cours de la conservation à 4°C des yaourts mixtes contenant Bb12 ou LBRE-LSAS **libre** ou **encapsulée** avec les starters de yaourt *S. thermophilus* « St » et *L. bulgaricus* « Lb ». Les valeurs représentent la moyenne de trois essais indépendants et le maximum de déviation entre les trois mesures est de 5%. <sup>a-d</sup> valeurs différentes pour chaque type de yaourt. <sup>A-B</sup> valeurs différentes entre les différents yaourts et pour un temps d'entreposage particulier. .... pp 101.

**Figure 20 :** Evolution de la viscosité (mP.s) des yaourts mixtes à Bb12 ou LBRE-LSAS **encapsulée** ou **libre** (témoin). Les valeurs représentent la moyenne de trois essais indépendants et le maximum de déviation entre les mesures est de 10%. .... pp 103.

- Figure 21 :** Résistance des microcapsules de Bb12 ou LBRE-LSAS, exposées 4 h à 37°C à de différentes concentrations d'α-amylase salivaire, exprimée en termes de biomasse libérée. Les résultats représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes ±SD (n=9). ..... pp 104.
- Figure 22 :** Effet de la microencapsulation sur la survie de *B. lactis* Bb 12 et LBRE-LSAS libres ou encapsulées (log UFC. g<sup>-1</sup>) aux conditions hostiles du modèle gastrique simulé (MGS, 2 h d'exposition au pH 2) et du modèle intestinal simulé (MIS, pH 6.5, 0.5% bile, 0.25% bicarbonate de sodium, 16 h). L'inoculum était ajusté à une concentration finale de 8 ± 0.5 log UFC. g<sup>-1</sup>. \* Valeurs statistiquement significatives (P<0.05). ..... pp 107.
- CHAPITRE V: Effets d'ingrédients protéiques laitiers et de prébiotiques sur la survie à la bile et le pouvoir d'assimilation de cholestérol chez les quatre souches lactiques cultivées sur milieu MRS.**
- Figure 23 :** Procédure de détermination de la BSH (Liong et Shah, 2005a). ..... pp 114.
- Figure 24 :** Effets des prébiotiques (0.5%, p/v) sur l'activité spécifique de BSH (U. mg<sup>-1</sup>) dans les extraits cellulaires des cultures de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. lactis* Bb 12, *S. thermophilus* TA040 et *L. bulgaricus* LB340 en phase stationnaire de croissance. <sup>a-d</sup> Valeurs significativement différentes (P<0.05). ..... pp 125.
- Figure 25 :** Biomasse (log UFC. mL<sup>-1</sup>) des différentes souches lactiques étudiées après 12 h de culture en présence de bile et de divers ingrédients protéiques (β-caséine , hydrolysats protéiques laitiers  ou lysine ). <sup>a-h</sup> Valeurs significativement différentes (P<0.05). ..... pp 127.
- Figure 26 :** Biomasse (log UFC. mL<sup>-1</sup>) des différentes souches lactiques étudiées après 12 h/37°C de culture en présence de bile et de divers prébiotiques (glucose , lactose , mannitol , raffinose , pectine  ou lactulose ). <sup>a-g</sup> Valeurs significativement différentes (P<0.05). .. pp 129.
- Figure 27 :** Cholestérol assimilé *in vitro* (mg. g<sup>-1</sup>) par les bactéries lactiques étudiées : *L. rhamnosus* LBRE-LSAS (, *B. lactis* Bb12 (, *S. thermophilus* TA 040 () et *L. bulgaricus* LB340 () cultivées 24 (A) et 48 h (B) dans le milieu MRS-THIO (0.3%, p/v bile) additionné d'une source protéique (11mg. mL<sup>-1</sup>) β-caséine ou hydrolysats protéiques laitiers comparée à la lysine. L'inoculum provenant d'une culture jeune (18 h) est de 10<sup>7</sup> à 5. 10<sup>7</sup> UFC. mL<sup>-1</sup> et utilisé à 1% (v/v). Le cholestérol est ajouté à une concentration finale de 65-85 μg. mL<sup>-1</sup>. \* : P<0.05, \*\* : P<0.01 et \*\*\* : P<0.001. Les comparaisons ont été faites pour une même durée de fermentation. .... pp 131.
- Figure 28 :** Cholestérol assimilé (mg. g<sup>-1</sup>) par les souches bactériennes étudiées : *L. rhamnosus* LBRE-LSAS (, *B. lactis* Bb12 (, *S. thermophilus* TA 040 () et *L. bulgaricus* LB340 () cultivées 24 h à 37°C dans le milieu MRS-THIO (0.3%, p/v bile) additionné d'un prébiotique (0.5%, p/v) mannitol, raffinose, pectine ou lactulose (glucose et lactose, sont les sucres témoins) utilisé comme la seule source de carbone. L'inoculum est issu d'une culture jeune (18 h), contient 10<sup>7</sup> à 5. 10<sup>7</sup> UFC. mL<sup>-1</sup> et est utilisé à 1% (v/v). Le cholestérol est ajouté à une concentration finale de 65-85 μg. mL<sup>-1</sup>. \* : P<0.05, \*\* : P<0.01 et \*\*\* : P<0.001. Les comparaisons ont été faites pour une même durée de fermentation. ....pp 136.

**CHAPITRE VI : Pouvoir de conversion de l'acide linoléique en isomères conjugués par les bactéries lactiques.**

**Figure 29 :** Biomasse accumulée (log UFC. mL<sup>-1</sup> ou log UFC. g<sup>-1</sup>) après 24 h de monoculture à 37°C en anaérobiose de *S. thermophilus* TA040, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340, *L. rhamnosus* LBRE-LSAS ou *B. animalis* subsp. *lactis* Bb 12 et de culture associée des deux souches starters de yaourt (1:1) dans le milieu **MRS (A)** ou **lait écrémé (18% MS) fermenté (B)** en présence ou en absence (0, 0.5 ou 1 mg. mL<sup>-1</sup>) d'acide linoléique (AL). L'inoculum a été ajusté à une concentration finale de 1.10<sup>7</sup> à 5.10<sup>7</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>. Les valeurs représentent la moyenne « m » de trois expériences indépendantes ±SD (n=9). .....pp 144.

**Figure 30 :** Le pH des monocultures de 24 h de *S. thermophilus* TA040, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340, *L. rhamnosus* LBRE-LSAS ou *B. animalis* subsp. *lactis* Bb 12 et de culture associant les deux souches starters du yaourt (1:1) dans le milieu **MRS (A)** ou **lait écrémé (18% MS) fermenté (B)** en présence ou en absence (0, 0.5 ou 1 mg. mL<sup>-1</sup>) d'acide linoléique (AL). L'inoculum a été ajusté à une concentration finale de 1.10<sup>7</sup> à 5.10<sup>7</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>. Les valeurs représentent la moyenne « m » de trois expériences indépendantes ±SD (n=9). ..... pp 146.

## Table des matières

Dédicace	
Avant-propos	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux et des figures	
Table des matières	
<b>Introduction</b> .....	1
<b>CHAPITRE I : Bactéries lactiques, statut probiotique et assimilation de cholestérol.</b>	
I.1. Les probiotiques.....	6
I.1.1. Définition et historique.....	6
I.1.2. Critères d'acquisition du statut probiotique.....	7
I.1.3. Les principales souches probiotiques.....	7
I.2. Le concept d'aliment fonctionnel.....	10
I.3. Les Prébiotiques.....	11
I.4. Les Synbiotiques.....	11
I.5. En quoi certains peptides dits « bioactifs » procurent-ils un bénéfice santé ?.....	13
I.6. Les isomères conjugués de l'acide linoléique: quels effets sur la santé ? .....	16
I.6.1. Le concept de CLA.....	16
I.6.2. Les sources de CLA.....	18
I.6.3. Conversion de l'acide linoléique en CLA par les bactéries intestinales .....	20
I.6.4. Production <i>in vivo</i> de CLA par des bactéries probiotiques sélectionnées.....	23
I.6.5. Les effets physiologiques et métaboliques des CLA .....	23
I.6.5.1. Effet anti-obésité.....	23
I.6.5.2. Propriétés hypocholestérolémiantes.....	25
I.6.5.3. Propriétés antidiabétiques et immunomodulatrices.....	25
I.6.5.4. Effets anti-athérosclérotique et anti-cancérogène.....	26
I.6.5.5. Effet antimicrobien des acides linoléique et linoléique, et des CLA.....	27
I.7. La survie des probiotiques dans l'aliment vecteur et aux hostilités digestives ....	28
I.7.1. La survie dans l'aliment vecteur.....	28
I.7.2.1. Microflore intestinale et environnement digestif.....	28
I.7.2.2. La survie des probiotiques à l'acidité stomacale et à la bile.....	29
I.7.3. Les solutions innovatrices : la microencapsulation comme outil de préservation de la survie.....	32
I.7.3.1. Techniques d'encapsulation des cellules probiotiques.....	32
I.7.3.1.1. Technique d'émulsion.....	32

I.7.3.1.2. Technique d'extrusion.....	34
I.7.3.2. Caractéristiques de la capsule.....	34
I.7.3.3. Polymères pour l'encapsulation.....	35
I.7.3.4. Avantages de l'encapsulation des microorganismes probiotiques en industrie laitière .....	39
I.7.3.4.1. Préservation et amélioration des propriétés sensorielles de produits à base de cultures probiotiques.....	39
I.7.3.4.2. Préservation et amélioration de la viabilité des microorganismes probiotiques.....	41
I.8. L'assimilation du cholestérol par les probiotiques: vers une remédiation du problème d'hypercholestérolémie ?.....	42
I.8.1. Cholestérol, fonctions biologiques et implications pathologiques.....	42
I.8.2. Mécanismes bactériens régulant le taux de cholestérol .....	43
I.8.2.1. Action des probiotiques.....	43
I.8.2.2. Action des prébiotiques.....	47
I.8.2.3. Action des synbiotiques.....	48
I.8.2.4. Action des hydrolysats protéiques du lait .....	50
I.9. Conclusion.....	51
 <b>CHAPITRE II : Pouvoir d'assimilation de cholestérol chez quatre souches lactiques.</b>	
II.1. Introduction.....	54
II.2. Matériels et Méthodes.....	54
II.2.1. Matériels.....	54
II.2.1.1. Souches utilisées.....	54
II.2.1.2. Les sels biliaires et le cholestérol.....	55
II.2.1.3. Les milieux de culture.....	55
II.2.2. Méthodes.....	57
II.2.2.1. Manipulations pré-culturelles.....	57
II.2.2.2. Détermination du taux d'assimilation de cholestérol .....	57
II.2.2.3. Traitement statistique des résultats.....	58
II.3. Résultats et discussion.....	58
II.4. Conclusion .....	64
 <b>CHAPITRE III : Effets du polysorbate 80 « E 433 » sur la survie des starters du yaourt exposés aux conditions digestives simulées.</b>	
III.1. Introduction .....	65
III.2. Matériels et Méthodes.....	66
III.2.1. Matériels.....	66

III.2.1.1. Souches utilisées.....	66
III.2.1.2. Polysorbate 80.....	66
III.2.2. Méthodes.....	66
III.2.2.1. Détermination de l'activité enzymatique BSH en présence de polysorbate 80...	66
III.2.2.2. Tolérance des souches lactiques au pH acide (2.5) en présence ou en l'absence de polysorbate 80.....	67
III.2.2.3. Exploration de l'effet du polysorbate 80 sur la tolérance bactérienne vis-à-vis de la bile ou de l'acide cholique.....	68
III.2.2.4. Détermination de l'effet de polysorbate 80 sur la composition cellulaire en acides gras des bactéries starters e présence de la bile. ....	69
III.2.3. Traitement statistique des résultats.....	70
III.3. Résultats et Discussion.....	70
III.3.1. L'activité enzymatique BSH.....	70
III.3.2. Effet du polysorbate 80 sur la survie des starters du yaourt à l'acidité gastrique simulée.....	72
III.3.3. Effet du polysorbate 80 sur la tolérance bactérienne à la bile et à l'acide cholique.....	75
III.3.4. Effet de polysorbate 80 sur la composition cellulaire des starters de yaourt cultivés en présence de la bile.....	77
III.4. Conclusion .....	82

**CHAPITRE IV : Effet de la microencapsulation sur la survie *in vitro* de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 dans le yaourt mixte et dans des conditions digestives simulées.**

IV.1. Introduction .....	84
IV.2. Matériels .....	85
IV. 3. Méthodes.....	86
IV.3.1. Technique d'encapsulation des cellules bactériennes.....	86
IV.3.2. Préparation du yaourt.....	87
IV.3.3. Analyses microbiologiques .....	88
IV.3.4. Analyses physico-chimiques.....	88
IV.3.4.1. pH. ....	88
IV.3.4.2. Dosage des exopolysaccharides (EPS).....	89
IV.3.4.3. Mesure de la viscosité.....	90
IV.3.5. Effet de l' $\alpha$ - amylase salivaire sur l'intégrité des microcapsules-alginate calcium-Amidon résistant formées.....	90
IV.3.6. Mesure de la tolérance des souches encapsulées vis-à-vis du jus gastrique et de la bile (modèle gastro-intestinal simulé).....	90

IV.3.7. Traitement statistique des résultats.....	91
IV.4. Résultats et discussion.....	92
IV.4.1. Y-a-t-il un effet positif de la microencapsulation à l’alginate-Ca-AR sur la viabilité et l’activité post-acidifiante des souches bénéfiques dans le yaourt mixte?.....	92
IV.4.1.1. Effet de l’encapsulation sur la viabilité et l’activité post-acidifiante de <i>B. lactis</i> Bb12 dans le yaourt mixte entreposé 28 jours à 4°C. ....	92
IV.4.1.2. Effet de l’encapsulation sur la viabilité et l’activité post-acidifiante de <i>L. rhamnosus</i> LBRE-LSAS dans le yaourt mixte entreposé 28 jours à 4°C... ..	96
IV.4.2. Effet de l’encapsulation sur la teneur en exopolysaccharides (EPS) des yaourts mixtes contenant Bb12 ou LBRE-LSAS.....	100
IV.4.3. Effet de l’encapsulation de <i>B. lactis</i> Bb12 ou de <i>L. rhamnosus</i> LBRE-LSAS sur la viscosité des yaourts mixtes entreposés à 4°C.....	102
IV.4.4. Effet de l’ $\alpha$ - amylase salivaire sur l’intégrité des microcapsules-alginate-Ca-AR formées.....	103
IV.4.5. Résistance des souches encapsulées au jus gastrique et à la bile : « un modèle gastro-intestinal simulé ». ....	105
IV.4.5.1. Résistance des souches Bb 12 et LBRE-LSAS aux conditions gastriques simulées.....	105
IV.4.5.2. Résistance des souches Bb 12 et LBRE-LSAS aux conditions intestinales simulées .....	106
IV.5. Conclusion.....	108

**CHAPITRE V : Effets d’ingrédients protéiques laitiers et de prébiotiques sur la survie à la bile et le pouvoir d’assimilation de cholestérol chez les quatre souches lactiques cultivées sur milieu MRS.**

V.1. Introduction.....	110
V.2. Matériels et Méthodes.....	111
V.2.1. Matériels.....	111
V.2.1.1. Souches utilisées .....	111
V.2.1.2. Réactifs et ingrédients.....	111
V.2.2. Méthodes.....	112
V.2.2.1. Vérification de l’identité des souches et ajustement de l’inoculum.....	112
V.2.2.2. La fermentescibilité des ingrédients protéiques ou des prébiotiques.....	112
V.2.2.3. Détermination de l’activité enzymatique de la BSH (Bile Salt Hydrolase).....	113
V.2.2.4. Procédure d’évaluation de la tolérance des souches à la bile.....	115

V.2.2.5. Mesure de l'effet des ingrédients protéiques laitiers et de divers prébiotiques sur le pouvoir bactérien assimilateur de cholestérol .....	116
V.2.2.6. Traitement statistique des résultats.....	116
V.3. Résultats et discussion.....	116
V.3.1. Fermentescibilité des sources protéiques et des prébiotiques.....	
V.3.2. Effet des ingrédients protéiques laitiers et des prébiotiques sur l'activité enzymatique de la BSH bactérienne.....	122
V.3.3. Effets des sources protéiques et des prébiotiques sur la survie des souches bénéfiques en présence de bile.....	126
V.3.4. Effets des ingrédients protéiques laitiers et de prébiotique sur le pouvoir d'assimilation <i>in vitro</i> de cholestérol par les bactéries lactiques.....	130
V.4. Conclusion .....	137
 <b>CHAPITRE VI : Pouvoir de conversion de l'acide linoléique en isomères conjugués par les bactéries lactiques.</b>	
VI.1. Introduction.....	138
VI.2. Matériels et méthodes.....	138
VI.2.1. Matériels .....	138
VI.2.2. Méthodes.....	
VI.2.2.1. Repiquage, revivification et ajustement de l'inoculum.....	139
VI.2.2.2. Procédure d'évaluation du pouvoir fermentaire des souches lactiques sur milieux lait et MRS en présence d'acide linoléique .....	139
VI.2.2.3. Détermination des CLA issus de la conversion bactérienne de l'acide linoléique.....	139
VI.2.3. Traitement statistique des résultats.....	140
VI.3. Résultats et discussion.....	142
VI.3.1. L'aptitude des bactéries lactiques à convertir l'acide linoléique.....	142
VI.3.1.1. Pouvoir fermentaire des souches lactiques sur milieux lait et MRS en présence de l'acide linoléique.....	142
VI.3.1.1.1. Biomasse accumulée.....	143
VI.3.1.1.2. Le pouvoir acidifiant des souches bactériennes en présence de l'acide linoléique.....	145
VI.3.1.2. Production bactérienne en CLA .....	147
VI.4. Conclusion.....	154
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>156</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## Introduction Générale

Le chiffre d'affaire mondial des produits probiotiques est en constante progression (MDEIE, 2010). Les probiotiques, présentés comme partenaires pour la santé, deviennent de plus en plus une composante incontournable du paysage alimentaire « sain ». Mais qu'en est-il exactement?

L'Organisation Mondiale de la Santé et l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO/OMS, 2002) définissent les probiotiques comme des «microorganismes vivants qui, lorsque consommés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte». Selon les directives du comité mixte d'experts FAO/OMS, ces microorganismes ne peuvent acquérir le statut de probiotique que s'ils remplissent un certain nombre de critères fonctionnels assez précis.

De nombreuses études ont été menées sur le caractère probiotique des souches de bactéries lactiques. Néanmoins, avant d'exercer leurs effets positifs, ces microorganismes bénéfiques doivent surmonter plusieurs obstacles à leur survie dans l'organisme : l'acidité de l'estomac, les sécrétions biliaires ou la compétition avec la microflore intestinale. Une des premières solutions était de rajouter des ingrédients indigestes appelés "prébiotiques", et qui sont sélectivement utilisés par les probiotiques pour leur propre développement (Culligan et al., 2009).

Le synbiotique est l'association d'un probiotiques avec un prébiotique et, dont l'ingestion concomitante pourrait favoriser la multiplication du premier dans le tractus digestif (par exemple, une association de bifidobactéries ou de lactobacilles et de fructo-oligosaccharides). De plus en plus de bénéfices supplémentaires sont attribués aux synbiotiques (régression des maladies de Crohn et la pochite) (Rambaud, 2004).

La viabilité des cultures probiotiques dans les nutraceutiques et les aliments fonctionnels constitue donc un aspect critique de leur fonctionnalité. La production et la commercialisation des probiotiques à l'échelle industrielle pose le problème de leur survie aux différentes opérations unitaires du procédé de fabrication. La concentration en cellules viables recommandée pour tout produit véhiculant des probiotiques est de  $10^6$  à  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  (FAO/OMS, 2001).

Pour pallier à ce problème de survie, plusieurs études récentes ont suggéré la production de cultures microencapsulées dans le gel d'alginate (Kailasapathy, 2006 ; Annan

et al., 2008 ; Gbassi et al., 2009...). Cette technologie offre des bénéfices potentiels à deux groupes d'industriels : d'abord pour les producteurs de cultures qui pourraient disposer de suspensions concentrées sans faire appel à la centrifugation ou à l'ultrafiltration et, ainsi opter pour le séchage par air sur lit fluidisé plutôt que pour la lyophilisation ; ensuite pour les transformateurs qui vont pouvoir limiter les pertes de survie des probiotiques ajoutées aux aliments dues aux procédés de fabrications, ainsi qu'aux conditions hostiles du tube digestif.

De nombreuses études épidémiologiques prospectives et rétrospectives, dont la plus fameuse est celle de Framingham aux Etats Unis, ont établi des corrélations positives entre l'alimentation et l'incidence de certaines pathologies (Matthan et al., 2009). Ce constat est à l'origine de la définition d'une politique sanitaire préventive de certaines maladies métaboliques ainsi que du développement du marché des aliments fonctionnels (Mills et al., 2011). Une seule publication (Manson et al., 1992) a réussi à chiffrer la corrélation entre le risque de certaines pathologies et le niveau de certaines constantes biologiques, en préconisant qu'une faible réduction de la cholestérolémie pourrait réduire de 2 à 3% le risque des cardiopathies coronaires.

Dans le contexte du développement des aliments fonctionnels, les produits laitiers occupent une place importante liée en partie à leur procédé de fabrication qui implique l'ajout de bactéries lactiques réputées posséder des propriétés probiotiques et/ou produire des métabolites actifs avec des effets sanitaires promoteurs (Stanton et al., 2005).

De nombreux peptides bioactifs sont imbriqués dans les protéines lactières et demeurent inactifs jusqu'à ce qu'ils soient libérés et activés pendant la digestion gastro-intestinale ou la transformation des aliments. Ils sont naturellement présents dans le lait, le lait fermenté et le fromage.

Récemment, Alhaj et al. (2010) ont montré que le potentiel *in vitro* d'indisponibilisation du cholestérol chez la souche probiotique *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb 12) en présence d'hydrolysats de caséines bovines était significativement amélioré. D'autres études antérieures (Seelig et Seelig, 1996 ; Li et Papadopoulos, 1998) avaient suggéré un effet hypocholestérolémiant des peptides bioactifs issus de la fermentation des caséines et de lactosérum.

En effet, l'effet hypocholestérolémiant du lait fermenté a été démontré chez l'homme pour la première fois en 1963 (Shaper et al., 1963 ; cités par Liong et Shah, 2005a) et depuis,

les études se sont accentuées dans le but de sélectionner des souches de bactéries lactiques potentiellement hypocholestérolémiantes.

De ce fait, différentes approches scientifiques utilisant les probiotiques, les prébiotiques (Pereira et Gibson, 2002) ou les synbiotiques (Umeki et al., 2004), ont été testées. Par ailleurs, Gilliland et al. (1985) ont observé une relation étroite et significative entre le phénomène d'assimilation du cholestérol chez les lactobacilli et leur pouvoir de déconjugaison des sels biliaries.

La présence d'une activité enzymatique de type hydrolase des sels biliaries (Bile Salt Hydrolase ou BSH), enzyme clé responsable de la déconjugaison des sels biliaries durant la circulation entéro-hépatique, est considérée comme un critère de choix des microorganismes à potentiel hypocholestérolémiant selon Tahri et al. (1996 et 1997). Ces auteurs considèrent que les bactéries qui ne synthétisent pas de BSH ne peuvent pas réduire la cholestérolémie à un niveau significativement appréciable, étant donné que ce phénomène se produit en présence de bile.

D'autres composés bioactifs du lait fermenté, tels que les isomères conjugués d'acide linoléique (conjugated linoleic acid ou CLA) peuvent moduler la cholestérolémie. Un certain nombre de bactéries probiotiques se sont avérées productrices de CLA, y compris les souches de lactobacilles, bifidobactéries, bactéries propioniques, pédiocoques, entérocoques, streptocoques et lactocoques (Ogawa et al., 2005).

Les CLA jouissent déjà de l'intérêt de plusieurs consommateurs puisqu'ils sont utilisés sous forme de suppléments depuis 1997 (Turini et Martin, 2001) et ceci, après qu'une étude chez la souris ait montré une diminution de la masse grasse du corps associée à une augmentation de la masse maigre (Park et al., 1997). Au-delà des effets des CLA sur la composition corporelle (diminution de la graisse), ces acides gras conjugués pourraient avoir des effets sur la santé humaine tels que les effets anti-cancéreux, antiathérogènes, anti-adipogènes, antidiabétiques, anti-inflammatoires, et stimulation de la fonction immunitaire (Pariza et al., 2001 et Chew et al., 1993 ; cités par LeDoux et al., 2007).

Les recherches commencées dans notre laboratoire étaient axés sur la mise en évidence du caractère probiotique de souches lactiques susceptibles de fermenter efficacement le lait écrémé. C'est ainsi que l'étude de la capacité assimilatrice de cholestérol par ces mêmes bactéries a débouché par la suite sur leurs capacités de survie dans l'aliment vecteur et aux conditions digestives simulées. Dans le lait comme milieu réactionnel, le pouvoir

hypocholestérolémiant des bactéries lactiques est le plus difficile à expliquer. Avec son calcium, ses caséines, ses CLA et ses bactéries, le lait fermenté module les taux de lipides sanguins. De même, étant donné que l'effet bénéfique sur la santé est conditionné par le taux de survie de la souche bactérienne considérée, particulièrement à l'hostilité digestive, il est indispensable de veiller à préserver cette viabilité lors de son transit digestif.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la problématique de cette thèse qui a pour objectifs principaux : i) la démonstration que des souches lactiques assimilent *in vitro* le cholestérol et ii) la recherche de moyens par lesquels il serait possible d'améliorer leur survie aux hostilités digestives simulées.

La notion de survie et l'action d'assimilation de cholestérol sont très étroitement liées, et sont fonction de la nature du moyen utilisé pour les promouvoir et de la souche bactérienne elle-même. Voilà pourquoi les moyens de préservation de la survie des bactéries sont étudiés ici séparément afin d'en apprécier correctement l'effet protecteur généré.

Alors, bien que la liste de ces palliatifs ne soit pas exhaustive, nous exposons dans cette thèse seulement les nouveaux moyens permettant d'arriver à cette fin.

La présente thèse est structurée en cinq chapitres expérimentaux avec un premier chapitre qui reflète une revue de littérature sur le sujet. Ainsi, le chapitre II de la thèse concerne tout d'abord la mise en évidence du pouvoir d'assimilation de cholestérol chez quatre souches lactiques sélectionnées. Elles appartiennent toutes aux seuls genres (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus*) les plus utilisés comme probiotiques et qui sont autorisés en alimentation humaine (Berg, 1998). *Streptococcus thermophilus* TA040 et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340 qui ne sont pas de simples souches starters de yaourt, mais ont déjà fait l'objet de plusieurs travaux publiés (Foligne et al., 2007; Burns et al., 2008) mettant en relief de possibles effets physiologiques positifs. La troisième souche est une souche expérimentale d'origine humaine *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS provenant de notre collection de laboratoire, elle aussi a fait et fait encore l'objet de différents travaux de recherches au niveau de notre laboratoire, visant à démontrer ses caractéristiques probiotiques. La quatrième souche étudiée est la fameuse souche probiotique *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12, prise comme souche de référence.

Dans les chapitres III et IV, nous envisageons d'améliorer le pouvoir de survie de ces souches séparément aux conditions digestives. L'utilisation de l'additif alimentaire le polysorbate 80 E433 comme un nouveau moyen dans la protection des souches starters de

yaourt à l'hostilité digestive a été entamé dans le chapitre III, tout en mettant en évidence ses effets sur leur activité BSH et ses modifications apportées sur le profil lipidique des cellules mises en contact avec la bile.

Le quatrième chapitre de cette thèse consistera à démontrer les bienfaits de la microencapsulation dans les capsules d'alginate de calcium et d'amidon résistant de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS comparée à la souche probiotique *Bifidobacterium lactis* Bb12, en étudiant leur capacité post-fermentaire dans le yaourt mixte (en présence des starters de yaourt) entreposé à 4°C comme aliment vecteur et leur survie aux conditions gastro-intestinales simulées.

Le cinquième chapitre est une contribution scientifique à une meilleure compréhension de la nécessité de réunir le potentiel bénéfique d'un microorganisme à son substrat prébiotique afin de constituer un mélange synbiotique à caractère assimilateur *in vitro* de cholestérol. Nous vérifions aussi si l'enrichissement de ces mêmes cultures en caséine ou d'hydrolysats de protéines pourrait avoir un effet positif sur leur pouvoir d'assimilation de cholestérol.

Le sixième chapitre et qui est la dernière partie pratique de cette thèse est consacré à l'exploration du pouvoir des souches lactiques à produire des isomères conjugués de l'acide linoléique sur milieux MRS et lait.

# **CHAPITRE I :**

**Bactéries lactiques, statut probiotique  
et assimilation de cholestérol.**

## **CHAPITRE I : Bactéries lactiques, statut probiotique et assimilation de cholestérol.**

### **I.1. Les probiotiques**

#### **I.1.1. Définition et historique**

La notion de probiotique tire son origine des travaux de Metchnikoff, microbiologiste et Prix Nobel de Médecine au début du 20<sup>e</sup> siècle. D'après la synthèse de ses travaux réalisée par Tannock (2002), Metchnikoff associa la longévité des populations de l'Europe de l'Est à une importante consommation de lait fermenté. Il attribua cette longévité au remplacement des bactéries intestinales qu'il qualifiait de " putréfiantes " par les bactéries " acidifiantes " des laits fermentés. Selon Metchnikoff, les bactéries intestinales produisaient en effet des substances toxiques responsables du vieillissement. Entretemps, l'idée d'ingérer des microorganismes pour améliorer la santé de l'hôte a été relayée par d'autres scientifiques qui ont introduit, puis précisé la notion de " probiotique ".

Le terme probiotique a été introduit par Lilly et Stillwell (1965 ; cités par Tannock, 2002) pour désigner les substances, produites par un microorganisme, et qui stimulaient le développement d'autres microorganismes. Depuis, la définition des probiotiques a évolué au gré de l'état des connaissances de leurs mécanismes d'action sur la santé. En 1974, Parker (cités par Tannock, 2002) élargit la notion de probiotiques aux microorganismes qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale, englobant ainsi les microorganismes et les métabolites microbiens produits. Quinze ans plus tard, Fuller (1989) redéfinit les probiotiques comme étant : "des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et ayant une action bénéfique chez l'hôte où elles améliorent l'équilibre de la flore intestinale".

Plus récemment, un groupe d'experts européens a proposé d'élargir la définition pour y inclure les microorganismes ayant des mécanismes d'action indépendants d'une modification de la microflore intestinale, une proposition qui a été adoptée par le groupe de travail mandaté, conjointement par l'Organisation des Nations Unies pour l'agriculture et l'alimentation et par l'Organisation Mondiale pour la Santé, pour faire le point sur la question. Ce groupe d'experts internationaux définit en effet les probiotiques comme étant " des

microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte " (FAO/OMS, 2001).

### **I.1.2. Critères d'acquisition du statut probiotique**

L'acquisition du statut probiotique d'un microorganisme implique que celui-ci présente un certain nombre de caractéristiques répertoriées par FAO/OMS (2002):

#### **- Critères de sécurité**

- Historique de non pathogénicité (Generally Recognized As Safe ou GRAS),
- Origine humaine ou alimentaire,
- Phénotype et génotype connus et stables dans le temps,
- Appartenance à une collection de cultures internationale,
- Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques,
- Ne pas être sujet à des translocations.

#### **- Critères de fonctionnalité**

- Tolérance à l'acidité gastrique,
- Tolérance à la bile,
- Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes (bactériocines),
- Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus,
- Stimulation du système immunitaire.

#### **- Critères technologiques**

- Stabilité au cours des procédés de fabrication et dans le produit fini,
- Conservation des propriétés probiotiques après production.

### **I.1.3. Les principales souches probiotiques**

De nombreux microorganismes sont considérés comme étant potentiellement probiotiques (Tableau 1), particulièrement les genres *Bifidobacterium* sp et *Lactobacillus* sp qui sont les plus utilisés en industrie laitière (Tableau 2).

A ce jour, les autres genres microbiens qui se sont avérés potentiellement probiotiques sont: *Enterococcus* sp, *Pediococcus* sp, *Bacillus* sp, *Streptococcus* sp, *Lactococcus* sp, *Propionibacterium* sp et *Saccharomyces* sp (Champagne et al., 2011).

**Tableau 1:** Principales souches probiotiques.

Genres	Espèces	Études
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	Cutting (2011)
	<i>clausii</i>	Cutting (2011)
	<i>cereus</i> var. <i>toyoi</i>	Cutting (2011)
	<i>coagulans</i>	Cutting (2011)
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	Ooi et Liong (2010)
	<i>rhamnosus</i>	Ooi et Liong (2010)
	<i>paracasei</i>	Ooi et Liong (2010)
	<i>leichmannii</i>	Ooi et Liong (2010)
	<i>lactis</i>	Ooi et Liong (2010)
	<i>casei</i>	Lye et al. (2010)
	<i>bulgaricus</i>	Lye et al. (2010)
	<i>fermentum</i>	Jeun et al. (2010)
<i>Bifidobacterium</i>	<i>plantarum</i>	Jeun et al. (2010)
	<i>bifidus</i>	Ooi et Liong (2010)
	<i>longum</i>	Ooi et Liong (2010)
	<i>infantis</i>	Ooi et Liong (2010)
<i>Enterococcus</i>	<i>animalis</i>	Lye et al. (2010)
	<i>faecium</i>	De Verse et Scherzenmeir (2008)
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	De Verse et Shrezenmeir (2008)
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	De Verse et Shrezenmeir (2008)
<i>Saccharomyces</i>	<i>boulardii</i>	De Verse et Shrezenmeir (2008)

**Tableau 2** : Exemples de souches probiotiques industrielles (Guarner et al., 2008).

Souches	Nom commercial	Fabriquant
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Activia	Danone/Dannon
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12		Chr. Hansen
<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	Bifiene	Yakult
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align	Procter & Gamble
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru™ Bifido	Danisco
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536		Morinaga Milk Industry
<i>Enterococcus</i> LAB SF 68	Bioflorin	Cerbios-Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Mutaflor	Ardeypharm
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM		Danisco
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Actimel, DanActive	Danone/Dannon
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> F19	Cultura	Arla Foods
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1)	LC1	Nestlé
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Norrmejerier	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	GoodBelly, ProViva	NextFoods Probi
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATTC 55730	Retueri	BioGaia Biologics
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Vifit et autres	Valio
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Verum	Norrmejerier
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (boulardii) Iyo	DiarSafe, Ultralevure et autres	Wren Laboratories, Biocodex, and others
Testé comme mélange: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 & <i>Lactobacillus casei</i> Lbc80r	Bio K+	Bio K+ International
Testé comme mélange: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 & <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	FemDophilus	Chr. Hansen
Testé comme mélange: VSL#3 (mélange d'une souche de <i>Streptococcus thermophilus</i> , quatre de <i>Lactobacillus</i> spp & trois de <i>Bifidobacterium</i> spp)	VSL#3	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.
Testé comme mélange: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60 & <i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL 20		
Testé comme mélange: <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 & <i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011	A'Biotica et autres	Institut Rosell
Testé comme mélange: <i>Bacillus clausii</i> , les souches O/C, NR, SIN, et T	Enterogermina	Sanofi-Aventis

## **I.2. Le concept d'aliment fonctionnel**

Le concept d'aliment fonctionnel est né au Japon dans les années 1980. A cette époque, l'accroissement des maladies liées à l'alimentation, et en particulier celles de la population vieillissante, conduit le gouvernement japonais à initier un programme de recherche visant à identifier les fonctions physiologiques des aliments. La mise en évidence de fonctions biomodulantes intervenant dans le contrôle de l'homéostasie de l'organisme, puis l'identification de composés bioactifs et la détermination des facteurs de santé qu'ils améliorent ont défini une nouvelle catégorie d'aliments désignée par le terme " aliment fonctionnel ".

Pour les instances japonaises, l'aliment fonctionnel fait référence à un aliment de consommation courante qui, par la présence de composés bioactifs, a un effet bénéfique sur un aspect spécifique de la santé, supérieur à la plupart des aliments conventionnels. Les composés alimentaires, présents naturellement dans l'aliment ou ajoutés, considérés au pays du soleil levant comme fonctionnels ou potentiellement fonctionnels comprennent, entre autres, des fibres alimentaires (inuline), des oligosaccharides, des polyalcools (erythritol, sorbitol, maltitol, lactitol), des acides gras polyinsaturés ou leurs conjugués (EPA, DHA, CLA), des peptides, des protéines, des glycosides, des isoprénoïdes (caroténoïdes dont le lycopène), des vitamines, des alcools (oryzanol, octacosanol), des phénols (polyphénols ou flavonoïdes du thé), des cholines (lécithines de soja et d'œuf), des minéraux et des bactéries lactiques (Shinohara, 1995). Dès 1991, le législateur japonais autorise la distinction commerciale des aliments fonctionnels par le label FOSHU pour *Foods for Specified Health Use* et en détermine les conditions d'octroi.

Importé en Europe dans les années 1990, le concept d'aliment fonctionnel s'y est développé en prenant, dans l'esprit du public, une signification plus large. Pour le consommateur européen, les aliments fonctionnels représenteraient, en effet, simplement une alternative " plus saine " à l'alimentation classique (Renard, 2000).

Pour les Services fédéraux belges des affaires scientifiques, techniques et culturelles, toutefois, un aliment est considéré comme fonctionnel " si l'on a pu démontrer qu'il influence positivement, et au-delà de son effet nutritionnel classique, une ou plusieurs fonctions de l'organisme de manière à promouvoir le maintien d'un état de bien-être ou de santé, ou de réduction du risque d'une maladie " (SSTC, 2002).

### I.3. Les Prébiotiques

Le concept prébiotique est lié au développement des aliments fonctionnels depuis les années 1990. La première définition officielle a été proposée par Gibson et Roberfroid (1995), un prébiotique est « une substance non digestible qui induit un effet physiologique bénéfique à l'hôte en stimulant de façon spécifique la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de populations bactériennes déjà établies dans le côlon ».

Selon l'AFSSA (2003), un composé prébiotique doit avoir les trois caractéristiques suivantes :

- Ne pas être digéré ni absorbé avant d'atteindre le côlon.
- Être un substrat sélectif d'une ou de plusieurs bactéries de la flore intestinale ayant un rôle bénéfique sur la santé.
- Et donc modifier la composition de la flore intestinale dans un sens favorable à la santé, soit en favorisant la croissance de bactéries bénéfiques, soit en atténuant celle des souches pathogènes.

La majorité des prébiotiques utilisés à l'heure actuelle sont des fibres alimentaires solubles (oligo-saccharides, fructo-oligosaccharides, gomme d'acacia, ...) (AFSSA, 2004). D'autres composés ayant un effet prébiotique sont donnés dans le tableau 3.

### I.4. Les Synbiotiques

Un synbiotique est défini comme un produit qui contient à la fois un ou des prébiotique(s) et un ou des probiotique(s). La présence de prébiotique exerce un effet bénéfique sur la stabilité du (des) probiotique(s) au sein d'un aliment véhicule, ainsi que sur sa survie et son implantation dans le tractus gastro-intestinal (Roberfroid, 2007).

Le terme synbiotique évoque la propriété de synergie et est réservé uniquement aux aliments associant des probiotiques et des prébiotiques à la fois. Dans ces produits, les prébiotiques stimulent sélectivement la croissance des probiotiques. Par exemple, un produit contenant l'oligofructose et une bifidobactérie probiotique est considéré comme un synbiotique. En revanche, lorsqu'un *Lactobacillus* probiotique est associé à l'oligofructose, la combinaison ne forme pas un synbiotique. Cette différence serait due au fait que les bifidobactéries produisent une grande quantité de  $\beta$ -fructosidases, enzymes capables de dégrader sélectivement la liaison entre les fructoses présents dans l'oligofructose (De Verse et Shrezenmeir, 2008).

**Tableau 3 :** Les différents prébiotiques avérés (en gras) et supposés (en italique) (Frank, 2002).

Substance	Composition	Degré de polymérisation	Procédé d'obtention
Fructanes	Glucose, fructose		
- Linéaires :			
o <b>Inuline</b>	- Liaisons béta -2,1	- 10 à 60	Extraction
o <b>Fructo-OligoSaccharides (FOS)</b>	- Liaisons béta -2,1	- 2 à 9	Hydrolyse enzymatique
o <i>Levanes</i>	- Liaisons béta -2,6	- 20-30 (lorsque d'origine végétale)*	Biosynthèse enzymatique
- Branchés (graminanes)	- Liaisons béta-2,6 & béta-2,1	- Non déterminé	
<b>Lactulose</b>	Galactose, fructose, liaisons béta-1,4	2	Synthèse chimique
<i>Oligo (trans)galactosides (TOS)</i>	Glucose, galactose, liaisons béta-1,6	2 à 5	Biosynthèse enzymatique
<i>Oligoxylosides (XOS)</i>	Xylose, liaisons béta-1,4	2 à 9	Hydrolyse enzymatique
<i>Oligosides de soja (Raffinose &amp; stachyose)</i>	Galactose, glucose, fructose liaisons alpha 1,6 et 1,2	3 à 4	Extraction
<i>Isomaltooligosides</i>	Glucose, liaisons alpha-1,6	2 à 5	Hydrolyse enzymatique Bioconversion enzymatique
<i>Oligolaminaranes (béta-glucanes)</i>	Glucose, ( $\pm$ mannitol) liaisons béta-1,3 et 1,6	5 à 25	Hydrolyse enzymatique
<i>D-tagatose</i>	Tagatose	1	Extraction
<b>Amidons résistants</b>	Glucose, liaisons alpha-1,4 et 1,6	> 1000	Extraction

\*: les levanes produits par les microorganismes présentent généralement des poids moléculaires supérieurs à  $10^6$ .

### **I.5. En quoi certains peptides dits « bioactifs » procurent-ils un bénéfice santé ?**

Les maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, l'accident vasculaire cérébral et l'infarctus du myocarde représentent un véritable problème de santé dans le monde. Les tentatives visant à prévenir ces maladies, impliquent souvent la diminution des facteurs de risque tel que l'obésité, la pression artérielle, le tabagisme, la sédentarité et la cholestérolémie (Korhonen et Pihlanto, 2006).

Le lait de vache, riche en nutriments, s'avère très précieux pour la santé humaine selon de nouveaux travaux focalisés sur l'activité de composantes laitières mineures. En effet, en plus des protéines, des minéraux et des vitamines, le lait contient des composés bioactifs. Ces constituants mineurs incluent notamment des immunoglobulines, des hormones, des facteurs de croissance, des cytokines, des nucléotides, des polyamines, des enzymes et des peptides bioactifs (Erdman et al., 2008).

Les protéines du lait jouent un triple rôle : nutritionnel, fonctionnel et biologique dont les retombées bénéfiques sur la santé sont énormes (Korhonen et Pihlanto, 2006). Il y a 5 ans, Hartmann et Meisel (2007) ont rapporté que les protéines du lait produisent des peptides biologiquement actifs libérés par les caséines qui ont des activités biologiques spécifiques dans l'organisme.

Ces peptides bioactifs sont inclus dans les protéines du lait et leur activation nécessite une hydrolyse par les protéases microbiennes qui vont les libérer (Korhonen et Pihlanto, 2006). Les peptides bioactifs sont principalement retrouvés dans les produits laitiers fermentés (tableau 4) comme le yaourt, le lactosérum et le fromage (Hajirostamloo, 2010).

Ces peptides se sont révélés réguler diverses activités biologiques (tableau 5), et sont considérés comme immunomodulateurs, antimicrobiens, antioxydants, antihypertenseurs et hypocholestérolémifiants. Par conséquent, ils ouvrent plusieurs perspectives dans la prévention et le traitement des maladies chroniques (Erdmann et al., 2008).

Les effets biologiques des peptides bioactifs dépendent de leur pouvoir à conserver leur fonctionnalité au contact des sites cibles ; ce qui laisse penser qu'ils doivent être préalablement absorbés au niveau de l'entérocyte avant de regagner les organes périphériques (Vermeirssen et al., 2004).

**Tableau 4** : Produits et ingrédients laitiers dérivant des peptides bioactifs et existant sur le marché mondial (Korhonen et Pihlanto, 2006 ; Patterson et al., 2008).

Nom commercial	Type du produit	Peptides bioactifs	Fonctions	Fabriquant
Calpis	Le lait	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro, Dérivés à partir des $\beta$ -caséines et $k$ -caséines	Réduction de la pression artérielle	Calpis Co, Japon
Evolus	Lait fermenté enrichi en calcium	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro, Dérivés à partir des $\beta$ -caséines et $k$ -caséines	Réduction de la pression artérielle	Valio Oy, Finlande
Biozate	Protéines du lactosérum hydrolysées	Fragments des $\beta$ lactoglobulines	Réduction de la pression artérielle	Davisco, USA
bioPURE-GMP	Protéines du lactosérum	$k$ -caséines $f$ (106-109)	Prévention des caries dentaires, influence la coagulation du sang et protection contre les pathogènes	Davisco, USA
Advitech	Extraits des facteurs de croissance et autres peptides bioactifs du lait		Traitement du psoriasis léger et modéré	Canada
Biolactis	Produits fermentés du lactosérum		Applications alimentaires, nutraceutiques et pharmaceutiques	Canada
Ronald chisolm Ltd	Protéines laitières et dérivés du lactosérum		Applications fonctionnelles et nutraceutiques	Canada

**Tableau 5:** Exemples de peptides bioactifs issus des protéines de lait par action de divers microorganismes et/ou enzymes microbiennes (Hartmann et Meisel, 2007).

Microorganisme utilisé	Précurseur protéique	Séquence peptidique	Activité biologique
<i>Lactobacillus helveticus</i>	$\beta$ -cn, k-cn	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	Inhibiteur de l'ECA
<i>Lactobacillus GG</i> enzymes+pepsine et trypsine	$\beta$ -cn, $\alpha_{s1}$ -cn	Tyr-Pro-Phe-Pro, Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg, Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	Opiacés, inhibiteurs de l'ECA
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	$\beta$ -cn, k-cn	Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met	Antioxydant
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> + digestion avec les pepsines et Corolase PP	$\beta$ -cn	Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe, Tyr-Gln-Glu-Pro-Val- Leu	inhibiteur de l'ECA
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	$\beta$ -cn	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile	inhibiteur de l'ECA

Cn : caséine, ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine

## I.6. Les isomères conjugués de l'acide linoléique: quels effets sur la santé ?

### I.6.1. Le concept de CLA

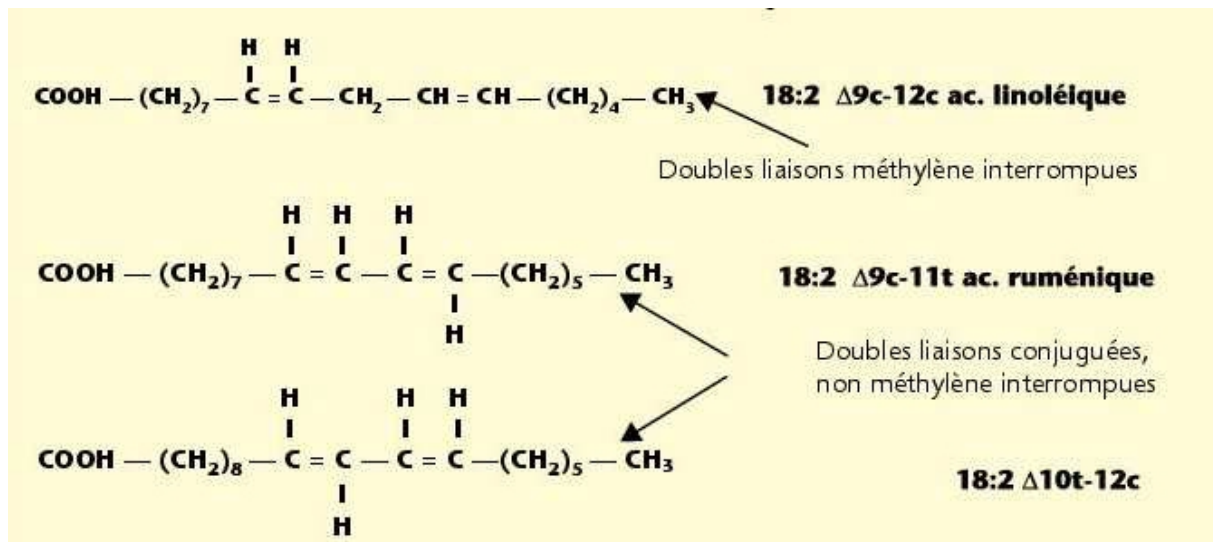
Avant les années 1980, les acides gras diènes conjugués à longues chaînes étaient très peu étudiés. En 1987, la situation a été renversée lorsqu'un principe anti-carcinogénique a été isolé d'un extrait de bœuf grillé : il consistait en une série d'isomères diénoïques conjugués de l'acide linoléique (Ha, 1987). Depuis ce temps, de nombreuses études ont révélé que les «acides linoléiques conjugués» démontraient des effets physiologiques bénéfiques chez plusieurs animaux.

On regroupe sous l'appellation « acides linoléiques conjugués » ou conjugated linoleic acid (CLA), un groupe d'acides gras (AG) octadécadiénoïques conjugués, c'est-à-dire à 18 atomes de carbone et deux doubles liaisons conjuguées de positions et de géométries variables (C18:2) qui sont produits par réarrangement prototropique (appelé aussi communément isomérisation) de l'acide linoléique (AL ou C18:2 *9cis*, *12cis*). Les doubles liaisons sont positionnées d'une manière alternée sans qu'un groupement méthylène (-CH<sub>2</sub>-) n'interrompe ces mêmes liaisons. De ce fait, tous les isomères sont appelés conjugués.

Les CLA possèdent tous la même composition chimique, mais ont des structures géométriques différentes (isomères). En comptant 14 positions ( $\Delta$ 2,4 à  $\Delta$ 15,17) et quatre combinaisons géométriques (*cis,cis*, *cis,trans*, *trans,cis*, et *trans,trans*), 56 isomères sont théoriquement possibles. Actuellement, une vingtaine d'acides octadécadiénoïques conjugués seulement ont été identifiés ; certains de ces isomères se trouvent plus particulièrement dans la viande de ruminants (bœuf, agneau).

Les isomères les plus répandus (figure 1) sont le CLA *9cis,11trans* (CLA-9), aussi appelé acide ruménique (ARm), et le CLA *10trans,12cis* (CLA-10). Ils sont majoritaires dans les aliments consommés par l'homme et seraient les isomères CLA biologiquement actifs. Par exemple, l'acide linoléique (C18:2 *9cis,12cis*) à fortes concentrations dans les aliments favorise la carcinogénèse chez les animaux de laboratoire ; alors que son isomère CLA-9 inhibe la carcinogénèse, même à des concentrations extrêmement basses. Or ces deux acides gras ne se différencient que par la position et la configuration de leur double liaison (Kelly et Bauman, 1996).

Selon Sébédio (2001), une question fondamentale est posée quant à l'intérêt des acides linoléiques conjugués : s'agit-il de nutriments fonctionnels ?



**Figure 1 :** Structures moléculaires simplifiées de l'acide linoléique (AL) et ses deux isomères majeurs (Morin, 2005).

A la différence de l'acide linoléique qui est essentiel et dont les deux doubles liaisons sont séparées par deux liaisons simples, les CLA ont une seule liaison simple qui sépare les deux doubles liaisons. Les CLA ne peuvent pas être synthétisés par le corps humain, même si de faibles concentrations de ces acide gras conjugués pourraient être retrouvées dans le sang et les tissus humains (Song et al., 2005). En revanche, les CLA ne sont pas considérés comme des acides gras essentiels (EFSA, 2010).

Les effets physiologiques bénéfiques des CLA justifient leur utilisation comme nutraceutique ou comme aliment fonctionnel. Plusieurs études ont porté sur l'incorporation des CLA dans plusieurs classes de lipides et sur leur effet sur les fonctions physiologiques et métaboliques (Turini et Martin, 2001).

Chez le rat, l'incorporation des isomères CLA semble se faire dans tous les tissus étudiés, à l'exception du cerveau. Généralement, et lorsque des mélanges équimolaires sont utilisés, c'est l'isomère CLA-9 qui est le mieux incorporé dans les lipides tissulaires, avec une affinité plus importante pour les lipides neutres que pour les autres classes de lipides. Les plus fortes concentrations des tissus en acide linoléique qu'en acide ruménique semblent un facteur favorisant l'incorporation de l'acide linoléique dans les phospholipides plutôt que l'acide ruménique qui est préférentiellement stocké sous forme de lipides neutres (Sébédio et al., 1997 et Banni et al., 2001).

Sur un mélange de 9 isomères conjugués de l'acide linoléique, seul l'acide ruménique est incorporé en partie dans les phospholipides membranaires chez la souris, alors que tous les autres isomères semblent être incorporés dans les triacylglycérols (Ha et al., 1990).

Les données disponibles sur l'apport quotidien en CLA varient largement entre les différents pays (de 15 à 440 mg / j). Hormis l'Australie (1000 mg/j), les apports journaliers universels estimés sont inférieurs à 500 mg/j, et sont plus élevés chez les hommes que chez les femmes.

La prise en compte de la bioconversion endogène chez l'homme de l'acide vaccénique (C18:1 *11trans*) en acide ruménique par la  $\Delta$ -9 désaturase à un taux d'environ 20% (Turpeinen et al., 2002), pourrait modifier à la hausse la dose physiologique réelle du C18:2 *9cis,11trans*. Ceci souligne l'intérêt d'augmenter la teneur en CLA des aliments et également en acide vaccénique, ou d'ingérer des suppléments en CLA afin d'atteindre les taux thérapeutiques (3000 à 6000 mg/ j) (Joseph et al., 2011).

### **I.6.2. Les sources de CLA**

Les CLA comprennent un total de 28 isomères (Collomb et al., 2008), les deux isomères, *9cis,11trans* et *10trans,12cis* ont été identifiés par chromatographie gazeuse sur colonne capillaire (CG) dans les huiles de maïs brutes et raffinées lors des mesures qualitatives et quantitatives (Tokuşoğlu, 2008). L'isomère *9cis,11trans*, la principale forme alimentaire de CLA, représente 80% des CLA du lait (Pariza et al., 2001).

Les principales sources naturelles (Tableau 6) de CLA pour les êtres humains sont les produits de ruminants ; tels que la viande, le lait, et les autres produits laitiers qui en dérivent (Chin et al., 1992). Ceci est dû à la présence de l'acide linoléique isomérase chez les bactéries du rumen qui catalyse l'isomérisation de l'acide linoléique en CLA (Akalin et al., 2007).

Les produits laitiers fermentés contiennent de teneurs plus élevées en CLA comparativement au lait non fermenté. Cependant, certains facteurs influencent leur taux en CLA, en particulier, la variabilité de la teneur en CLA du lait cru, le type et l'âge des cultures de démarrage (starters) utilisées. La présence de protéines de lactosérum et de lipides de différentes polarités influencent également la formation des CLA dans les produits laitiers fermentés (Shantha et al, 1995 ; cités par Lin, 1999).

Les techniques de fabrication des fromages ont une influence sur leur contenu en CLA. En ce qui concerne les fromages fermentés, la quantité d'acide linoléique (le précurseur des CLA) diminue quand les CLA augmentent (Lin et al., 1995). Inversement, les isomères de l'acide oléique présentent une relation positive avec le contenu en CLA.

**Tableau 6 :** Les CLA dans les aliments (Menon et al., 2010).

<b>Aliments</b>	<b>mg/g de graisse</b>	<b>Aliments</b>	<b>mg/g de graisse</b>
<i>Produits laitiers</i>		<i>Viande/ poisson</i>	
Lait condensé	7.0	Agneau	5.8
Colby	6.1	Bœuf hachée	4.3
Matière grasse du beurre	6.1		
Ricotta	5.6	Veau	2.7
Lait homogénéisé	5.5	Dinde hachée	2.6
Babeurre	5.4		
Fromage fondu américain	5.0	Poulet	0.9
Mozarella	4.9	Porc	0.6
Yogurt nature	4.8	Jaune d'œuf	0.6
Yogurt Custard	4.8	Saumon	0.3
Beurre	4.7		
Crème acide	4.6	<i>Huiles végétales</i>	
Cottage	4.5		
Yogurt à faible teneur en gras	4.4	Carthame	0.7
Lait à 2 MG%	4.1	Tournesol	0.4
Cheddar médium	4.1		
Crème glacée	3.6	Arachide	0.2
Parmesan	3	Olive	0.0
Yogurt glacé	2.8		

Or, ces isomères constituent des intermédiaires lors de la bio-hydrogénation microbienne, de l'oxydation ou de l'isomérisation, des acides linoléique et alpha-linolénique.

Le contenu en CLA augmente dans l'équivalent indien du yaourt (*dahi*), quand il est laissé après une nuit à température ambiante (Aneja et Murthi, 1990).

Les huiles végétales sont considérées comme source potentielle des CLA (Tricon et al., 2006 ; cités par Ecker et al., 2009). Les huiles de tournesol, de carthame et de lin, fabriquées par isomérisation alcaline (Nagao et Yanagita, 2008), représentent ainsi de très bonnes sources de CLA (Menon et al., 2010).

Ces acides gras conjugués peuvent également être formés à la suite d'un traitement technologique, comme par exemple l'hydrogénation partielle ou la friture (Berdeaux et al., 1998). Il est important de noter que les CLA produits naturellement sont différents de ceux produit par voie synthétique (Kim et Liu, 2002).

### **I.6.3. Conversion de l'acide linoléique en CLA par les bactéries intestinales**

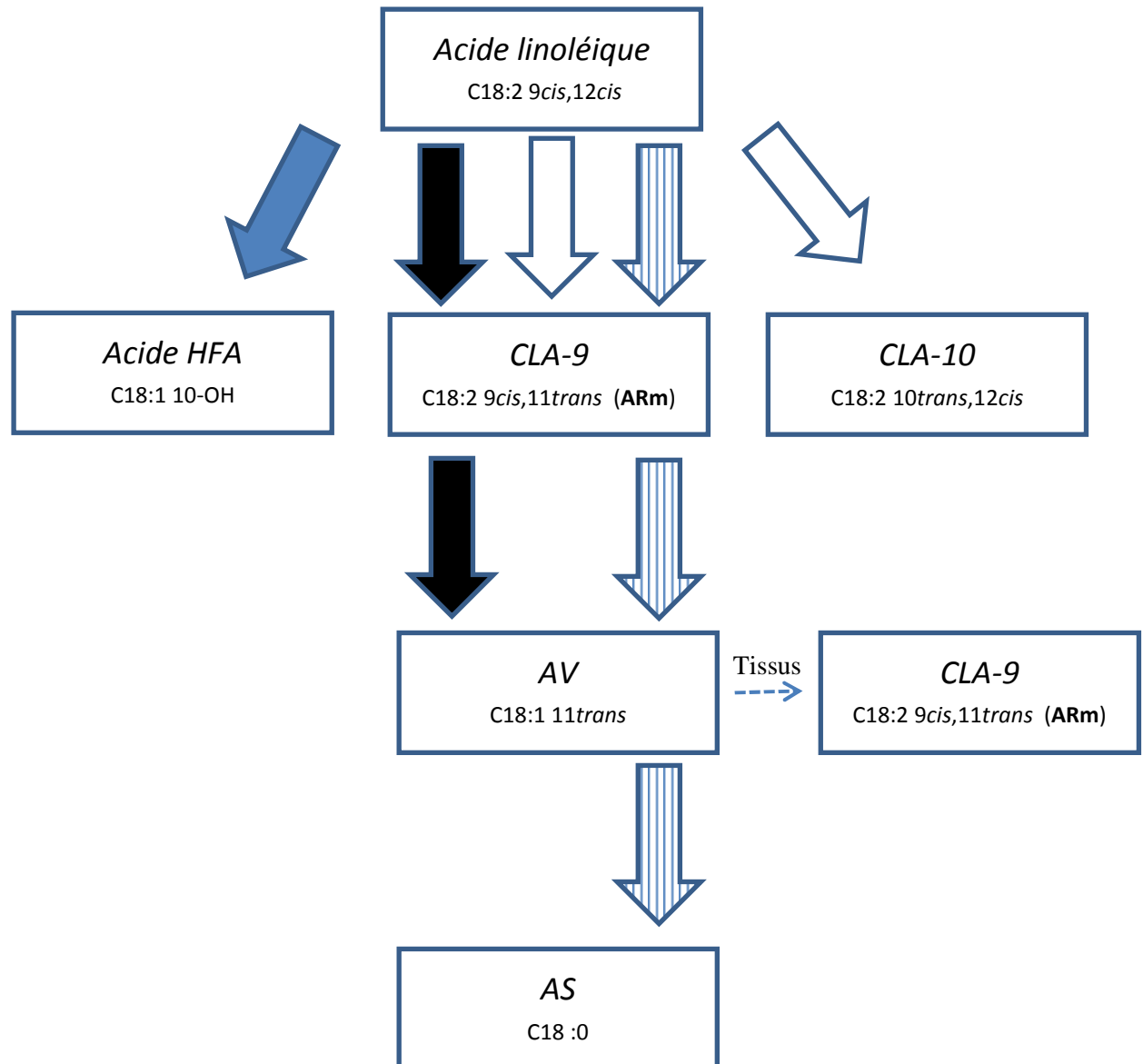
Pendant plusieurs décennies, le métabolisme lipidique au niveau du côlon chez l'homme était expliqué par une simple extrapolation faite à partir des résultats obtenus sur le jus de rumen. Cependant, des études récentes ont largement aidé à la conception de protocoles expérimentaux visant à élucider le métabolisme des acides gras chez les bactéries intestinales d'origine humaine.

Ce type de métabolisme au niveau du gros intestin est représenté essentiellement par des réactions d'hydratation et de bio-hydrogénation des doubles liaisons de la chaîne aliphatique des acides gras mono et polyinsaturés (Hoyles et Wallace, 2010).

Le métabolisme de l'acide linoléique par la microflore intestinale a été clairement démontré plutôt chez le rat (Eyssen et Parmentier, 1974; cités par Hoyles et Wallace, 2010) et ce n'est que grâce aux travaux de Howard et Henderson (1999) que l'action de la microflore humaine a été pour la première fois confirmée.

Historiquement, il a été montré dès 1967 que la bio-hydrogénation de l'acide linoléique par des bactéries du rumen (*Butyrivibrio fibrisolvens*) produit le C18:2 9*cis*,11*trans* (Kepler et Tove, 1967 ; cités par Hoyles et Wallace, 2010).

La bio-hydrogénation de l'acide linoléique (AL) par la microflore intestinale de l'homme (figure 2) se fait principalement par une conversion en acide ruménique qui à son tour est successivement hydrogéné en acide vaccénique (AV, C18:1 11*trans*) puis en acide stéarique (AS, C18 :0).



**Figure 2 :** Métabolisme de l'acide linoléique chez les bactéries fécales de l'homme (d'après Devillard et al., 2007).

*Les différentes flèches indiquent un métabolisme particulier chez différentes espèces bactériennes*

*CLA : isomères conjugués d'acide linoléique.*

*HFA : hydroxy fatty acid.*

*ARm : acide ruménique.*

*AV : acide vaccénique.*

*AS : acide stéarique.*

Alors que les bactéries responsables de la dernière conversion (AV en AS) restent encore inconnues chez l'homme, il est admis que le métabolisme de l'acide linoléique chez les bactéries intestinales de l'homme est identique à celui de la microflore du rumen (Lin et Wang, 2003). Les enzymes des microorganismes du rumen réalisent une bio-hydrogénation des acides linoléique et alpha-linolénique, produisant de l'acide stéarique ; cette opération génère des intermédiaires et des sous-produits, parmi lesquels plusieurs isomères possédant une ou deux doubles liaisons, dont les CLA (Ha, 1987).

La bio-hydrogénation *in vitro* par les microorganismes induit la formation de plusieurs isomères de position *trans*-monoènes, plutôt que la formation d'acide stéarique, comme précédemment postulé. Globalement, si les mammifères fabriquent des isomères *cis*, les bactéries intestinales fabriquent des isomères *trans* (Mosley et al., 2006).

Les principales souches de bactéries identifiées pouvant synthétiser le CLA 9*cis*,11*trans* ou acide ruménique « ARm » sont les bactéries du rumen telle que *Butyrivibrio fibrisolvens* (Léger et Razanamahefa, 2005), des cultures de bactéries lactiques du lait appartenant aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* (Lin et al., 1999) et des bactéries lactiques (*Lactobacillus plantarum* ; *Bifidobacterium breve* ; *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* et subsp. *shermanii*...) venant du tractus gastro-intestinal humain (Ogawa et al., 2005).

Des souches de *Lactobacillus acidophilus* possédant une isomérase fonctionnelle (EC 5.3.1.5, liée à la membrane bactérienne et ayant une affinité absolue au 9*cis*,12*cis* diène à groupement carboxyle libre) (Panghyová et al., 2006), ont été utilisées pour produire des CLA (Lin et al., 2003). La quantité de produit récupérée (14 mg) et le taux d'isomérisation (<20%) sont très faibles (Lin et al., 2003). Les résultats obtenus jusqu'à maintenant ne laissent donc pas croire que des bactéries puissent permettre la préparation de plusieurs grammes d'ARm.

*Lactobacillus acidophilus* a été jugée la plus efficace dans la production de CLA dans les laits fermentés (Lin et al., 1999). La production de CLA chez *L. acidophilus* s'est révélée, d'une part souche-dépendante (Kim et Liu, 2002) et d'autre part, améliorée par la présence de FOS dans le yaourt préparé à partir de la poudre de lait écrémé (Lin, 2003). Ce dernier auteur constate que la seule présence des FOS n'avait pas d'incidence sur la teneur en CLA-9*cis*,11*trans* dans le même type de yaourt ; et qu'il fallait la présence de *L. acidophilus* pour observer une augmentation de la teneur en cet isomère.

Des résultats similaires ont également été obtenus par Akalin et al. (2007) en cultivant deux souches probiotiques *L. acidophilus* (La-5) et *B. animalis* (Bb-12) en présence de 2% de FOS.

#### **I.6.4. Production *in vivo* de CLA par des bactéries probiotiques sélectionnées**

Peu de travaux publiés ont pu reproduire *in vivo* le pouvoir de production de CLA et concrétiser leur effet thérapeutique en utilisant des souches déjà sélectionnées comme étant potentiellement productrices *in vitro* de ces isomères conjugués. L'université des Femmes de Séoul (Corée du Sud) détient jusqu'à présent la seule publication officielle (PMID: 20075628, PubMed – indexé par MEDLINE) sur la possibilité qu'une souche probiotique ( $1.10^{12}$  UFC/j) exogène colonise les intestins (après une semaine d'administration) de l'homme et produise des quantités significatives en CLA (Lee et Lee, 2009).

Cette souche probiotique de *Lactobacillus rhamnosus* PL60 d'origine humaine (fèces de bébés) a aussi démontré un effet anti-obésité chez la souris (Lee et al., 2006). En effet, l'administration ( $1.10^7$  ou  $10^9$  UFC/j) de PL60 pendant 8 semaines à des souris rendues obèses par un régime hypercalorique a montré à la fois une diminution de gain en poids et de la stéatose du foie. Ces effets physiologiques ont été attribués au pouvoir de production de CLA chez cette souche. Dans une autre publication confirmative, Lee et al. (2007) ont démontré que l'effet anti-obésité observé sur les souris obèses (des diminutions significatives dans : le poids, la glycémie et les niveaux sériques de leptine) était dû à la production de l'isomère CLA 10*trans*,12*cis* par *L. rhamnosus* PL60.

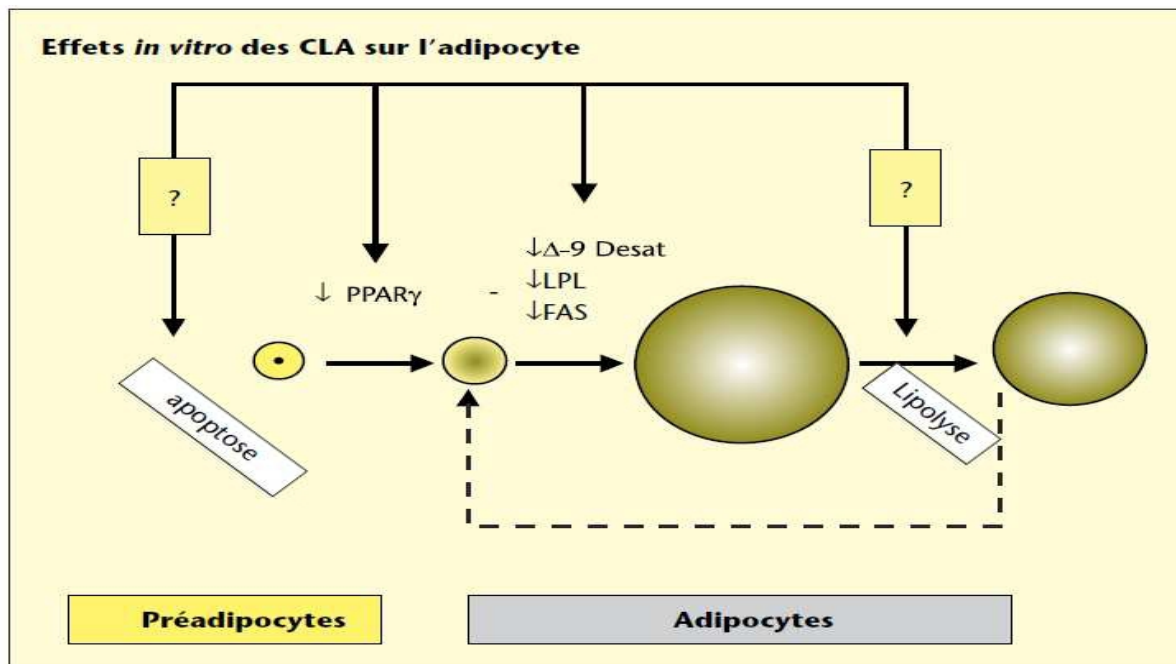
#### **I.6.5. Les effets physiologiques et métaboliques des CLA**

Beaucoup d'études sur les effets physiologiques et métaboliques des CLA ont été réalisées *in vitro*, mais celles qui ont le plus retenu l'attention ont été les études réalisées *in vivo*.

##### **I.6.5.1. Effet anti-obésité**

Les effets des CLA sur l'obésité sont variables selon l'espèce animale (figure 3) (Jahreis et al., 2000; cités par Ashwell et al., 2010). Cependant, l'effet anti-obésité a été attribué à l'isomère *trans*-10, *cis*-12-CLA (Léger et Razanamahefa, 2005).

Les mécanismes cellulaires impliqués dans l'effet bénéfique des CLA ne sont pas clairement établis. L'ensemble des études *in vitro* menées sur des lignées préadipocytaires ou sur des cultures primaires de préadipocytes montre que l'isomère CLA 10*trans*,12*cis* réduit l'entrée des acides gras *via* une forte inhibition de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) (Park et al., 1999). Cet isomère diminue aussi l'entrée du glucose et la voie de la lipogenèse (diminution de la stéaroyl-CoA désaturase 1) (Choi et al., 2000).



**Figure 3 :** Multiples cibles de l'isomère CLA 10*trans*,12*cis* sur la différenciation et le métabolisme de l'adipocyte (d'après Pariza, 2001).

$\Delta$ -9 Desat :  $\Delta$ -9 désaturase

LPL : Lipoprotéine Lipase

FAS : synthase des acides gras (Fatty acide Synthase.)

PPAR $\gamma$  : récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor)

Différentes recherches montrent également que le stockage lipidique dans les adipocytes pourrait aussi être limité par une augmentation de la lipolyse et de l'oxydation des acides gras par les CLA (Evans et al., 2002). En outre, l'isomère C18:2 10*trans*,12*cis* inhibe le processus de différenciation adipocytaire *via* une diminution de l'expression de Peroxisome proliferator-activated receptor PPAR $\gamma$  (Granlund et al., 2003). Ainsi, les multiples effets sur la différenciation et le métabolisme adipocytaire concourent à limiter le stockage lipidique adipocytaire.

Des études *in vitro* suggèrent que l'isomère C18:2 10*trans*,12*cis* provoque une apoptose des préadipocytes (Evans et al., 2002). Toutefois, les résultats *in vivo* ne plaident pas en faveur de cet effet apoptotique puisque le nombre d'adipocytes reste identique chez le rat (Azain et al., 2000). Il est important de noter qu'il n'existe pas de consensus sur un effet bénéfique des CLA sur le contrôle de la masse grasse chez l'homme.

### **I.6.5.2. Propriétés hypocholestérolémiantes**

Les nombreuses études réalisées sur les humains rapportant les effets des CLA (une supplémentation de ~3200 mg/j de 50 :50 du mélange CLA 9*cis*,11*trans* et CLA 10*trans*,12*cis* ou le CLA 10*trans*,12*cis* seul) sur les concentrations de cholestérol sous ses différentes formes ; et qui sont publiées jusqu'à 2011 demeurent controversées et révèlent soit un effet positif non significatif ou encore une absence d'effet (Joseph et al., 2011).

Néanmoins, les premières observations positives dans l'effet hypocholestérolémiant de l'isomère CLA 10*trans*,12*cis* ont été soulignées dans certaines publications sur le hamster (Yeung et al., 2000 ; Sher et al., 2003) ou le rat (Stangl, 2000) comme modèle animal. Le mécanisme par lequel les CLA sont considérés possédant un effet hypocholestérolémiant réside dans le fait qu'ils répriment le transport (l'absorption) du cholestérol de l'intestin, en réponse à un effet préalable bloqueur de l'activité de l'acyl coenzyme A: cholestérol acyltransférase (ACAT) intestinale (Yeung et al., 2000).

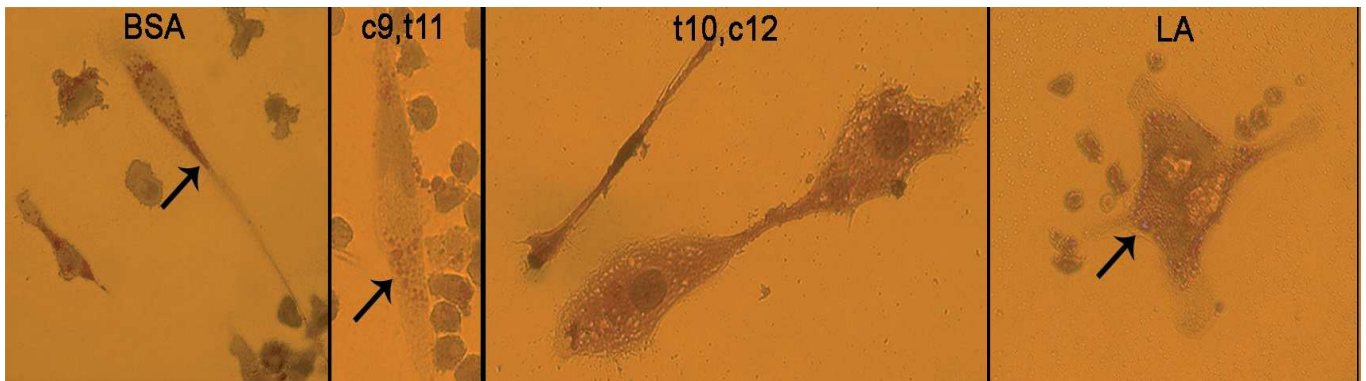
En plus, sachant que l'acide linoléique et les acides gras insaturés de type  $\omega$  3 pourraient moduler l'expression du gène CD36 sur la surface cellulaire des macrophages, ces cellules de globules blancs ont aussi servi de modèle pour mieux appréhender le métabolisme de cholestérol en présence de CLA (figure 4).

Dans l'étude de Ringseis et al. (2008) réalisée sur des macrophages de souris, la présence à la fois de CLA de type 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* réduisent l'accumulation de cholestérol. Cette observation a été expliquée par une élévation de l'expression du CD36 (Cluster de différenciation-36) et de l'ABCA1 (ATP binding cassette protein A1).

Le métabolisme du cholestérol et les influx et les efflux de lipides dans les macrophages sont contrôlés aussi par des récepteurs PPAR  $\gamma$  (Stachowska et al., 2010). Apparemment, les activateurs de type PPAR  $\gamma$  sont susceptibles de réduire l'accumulation de cholestérol dans les macrophage grâce à l'activation de gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol (Ringseis et al., 2008).

### **I.6.5.3. Propriétés antidiabétiques et immunomodulatrices**

Une étude chez le rat *Zucker*, un modèle animal utilisé pour étudier le diabète de type 2, a révélé que 1.5% (p/p) de CLA (mélange d'isomères) régule l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie après 14 jours de traitement (Evans et al., 2002).



**Figure 4 :** Morphologie cellulaire ( $\times 100$ , microscopie confocale) et mise en évidence des granules lipidiques de cholestérol et de triacylglycérol (colorées en rouges) dans les macrophages traitées pendant 2 jours avec BSA (témoin véhicule), 30  $\mu\text{M}$  de C18:2 9*cis*,11*trans*, de C18:2 10*trans*,12*cis* ou d'acide linoléique (d'après Stachowska et al., 2010).

BSA : sérum albumine bovine.

c9,t11 : l'isomère C18:2 9*cis*,11*trans*

t10,c12 : l'isomère C18:2 10*trans*,12*cis*

LA : acide linoléique

*Moins d'accumulation de cholestérol a été observée avec le CLA 10*trans*,12*cis*.*

*Les flèches indiquent l'accumulation des lipides dans les macrophages.*

Les CLA moduleraient la production d'interleukines, hormones du système immunitaire chargées de la communication entre lymphocytes et impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire. *In vitro*, les CLA augmentent l'activité cytotoxique et la prolifération des lymphocytes et aussi l'activité bactéricide des macrophages, mais diminuent la production d'interleukine IL-2 par les lymphocytes et l'activité phagocytaire des macrophages (Chew et al., 1997 ; cités par LeDoux et al., 2007).

#### **I.6.5.4. Effets anti-athérosclérotique et anti-cancérigène**

Plusieurs études sur animaux ont montré que les CLA présentent un effet antiathérogène. Des régimes riches en CLA (généralement un mélange d'isomères ou l'acide ruménique seul) administrés à des lapins provoquent une diminution de la triglycéridémie et du LDL-Cholestérol ainsi qu'une réduction significative des dépôts athéromateux et de l'athérosclérose préétablie (Valeille et al., 2004).

Par ailleurs, toujours chez l'animal, il a été démontré que la consommation de CLA inhibe l'initiation de la cancérogénèse (Pariza et al., 2001) et de la tumorigénèse (Ip et al., 1991 ; cités par Akalin et al., 2007). Selon des recherches récentes, il a été rapporté que les CLA ont des effets anti-cancéreux sur les cellules cancéreuses MCF-7 du sein (Guo et al., 2007 ; cités par Tokuşoğlu, 2008) . De même, le CLA *9cis,11trans* empêche la prolifération des cellules cancéreuses mammaires humaines plus efficacement que l'isomère CLA *10trans,12cis* (Tokuşoğlu, 2008). D'autres isomères de CLA, toutefois, sembleraient posséder un effet puissant contre la propagation des cellules cancéreuses du côlon (Soel et al., 2007 ; cités par Macouzet et al., 2010).

#### **I.6.5.5. Effet antimicrobien des acides linoléique et linoléinique, et des CLA**

Les acides linoléique et linoléinique ont montré une activité bactéricide envers *L. monocytogenes*. Ces deux acides gras diminuent aussi la capacité invasive de ce pathogène sur le modèle cellulaire Caco-2 (Petroni et al., 1998).

L'acide linoléique libre semble être aussi susceptible d'inhiber la croissance des bactéries de rumen productrices de CLA (Kim et al., 2000). La même sensibilité pourrait être observée chez la flore intestinale du tube digestif humain. C'est pourquoi la production de CLA à partir de l'acide linoléique par les bactéries intestinales est considérée aussi comme un mode de détoxification bactérienne (Devillard et al., 2007).

Il a été suggéré que les acides gras exercent leur action antimicrobienne au niveau de la membrane cytoplasmique. Par conséquent, l'activité antimicrobienne d'AL est l'une des difficultés dans le développement à grande échelle de production bactérienne de CLA (Lee et al., 2003; cités par Song et al., 2005) sachant, qu'une concentration élevée en acide linoléique ou des conditions de culture aérobies inhibent la bio-hydrogénation de l'acide linoléique (Kim et al., 2000).

Les mécanismes qui régissent les nombreux effets physiologiques des CLA ne sont pas encore très bien élucidés. De plus, certains effets, tels que l'augmentation de la masse maigre chez l'humain, demeurent controversés chez les scientifiques. Notons qu'il faut être très rigoureux dans l'interprétation des résultats de ces études puisque la plupart ont été réalisées en utilisant un mélange des produits d'isomérisation de l'acide linoléique composé principalement des isomères C18:2 *9cis,11trans* et le C18:2 *10trans,12cis* et non pas avec des isomères purifiés.

## **I.7. La survie des probiotiques dans l'aliment vecteur et aux hostilités digestives**

### **I.7.1. La survie dans l'aliment vecteur**

Il est important que les cellules restent viables dans l'aliment vecteur durant la période de sa conservation afin de livrer un produit consommable contenant une quantité suffisante en cellules probiotiques viables (Shah et al., 1995). *L. acidophilus* croit lentement dans le lait pendant la fabrication du yaourt. Cependant, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produit de grandes quantités d'acide lactique pendant la fermentation et le stockage frigorifique. Cette post-acidification cause une perte considérable de la viabilité des bactéries probiotiques.

L'intensité de la post-acidification est fonction principalement des souches bactériennes utilisées, de la température et du temps de stockage du yaourt. Il en résulte une baisse de pH à des niveaux inférieurs à 3.6 (Dave et Shah, 1997). La viabilité des bactéries probiotiques dans le yaourt entreposé à 4°C durant de longues périodes est peu satisfaisante et ne permet pas de fournir des produits alimentaires à effets bénéfiques sur la santé (Dave et Shah, 1997; Vinderola et al., 2000).

#### **I.7.2.1. Microflore intestinale et environnement digestif**

Selon la définition d'Isolauri et al. (2004), la flore intestinale normale est une collection complexe et en équilibre de microorganismes qui habitent normalement le tractus gastro-intestinal et remplissant un triple rôle dans la nutrition, la physiologie et le contrôle du système immunitaire de l'hôte. Le tractus gastro-intestinal est un écosystème ouvert aux microorganismes exogènes. De par sa surface totale (muqueuse) estimée à 200-300 m<sup>2</sup>, il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement (Holzapfel et al., 1998).

La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée à près de 10<sup>13</sup>-10<sup>14</sup> cellules microbiennes représentant 400 à 500 espèces et sous espèces. Cette microflore représente environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain (Bjorksten, 2004).

D'un point de vue microbiologique, l'environnement gastro-intestinal comprend trois régions principales qui offrent des conditions très différentes pour la survie des différents microorganismes. Dans le premier compartiment, l'estomac, la prolifération microbienne est fortement réduite par la présence d'oxygène apporté par la déglutition et d'une forte acidité. De ce fait, l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acido-tolérants et anaérobies facultatifs comme les lactobacilles, streptocoques, levures, etc.

Dans le deuxième compartiment qui est l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, et iléon), la microflore est constituée essentiellement de bactéries anaérobies facultatives telles que les lactobacilles, les streptocoques et les entérobactéries, et les anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies.

Dans le dernier compartiment représenté par le côlon (dépourvu d'oxygène), le transit digestif est plus lent et la flore microbienne est plus abondante, représentant 35 à 50 % du volume du contenu colique. A ce niveau, les bifidobactéries et les lactobacilles, ainsi que certains entérocoques, *E. coli*, streptocoques et bactéroïdes, se distinguent par leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, comme l'amélioration de la maturation et de l'intégrité de l'intestin, l'antagonisme contre les pathogènes et la modulation de la fonction immunitaire (Rastall, 2004). Toutefois, il faut noter qu'une partie de la flore gastro-intestinale demeure non cultivable et moins explorée.

### **I.7.2.2. La survie des probiotiques à l'acidité stomacale et à la bile**

Pour obtenir un effet notable sur la santé, les microorganismes probiotiques doivent survivre lors de leur transit gastrique, qui est un défi encore plus difficile par rapport aux conditions industrielles. Les conditions acides fortes dans l'estomac humain agissent comme une barrière naturelle de l'hôte et réduisent considérablement le nombre de cellules probiotiques vivantes (Ross et al., 2005). Dans la littérature, plusieurs études ont été consacrées à la viabilité des probiotiques en milieu acide. Le tableau 7 rapporte les résultats de quelques études sur les capacités de survie de certaines souches probiotiques aux conditions gastriques.

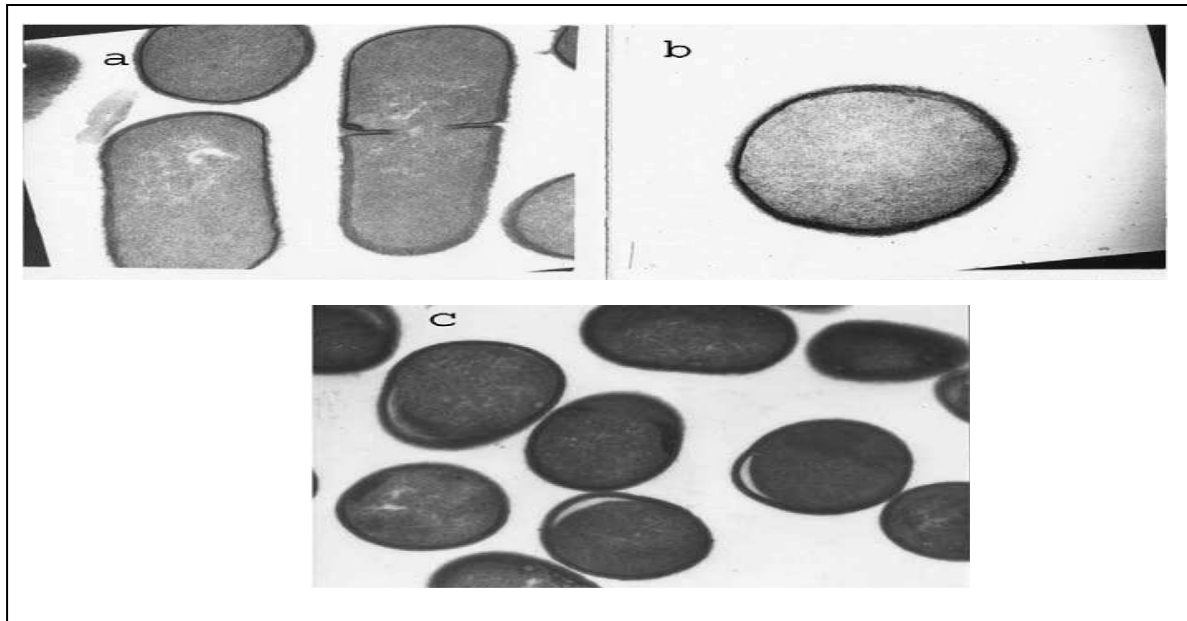
Certaines bactéries sont détruites dès leur passage dans l'estomac comme le cas des ferments de yaourt, alors que d'autres ont une capacité de survie élevée, leur permettant de survivre tout au long du transit et même de s'y multiplier (Conway et al., 1987).

Bien que la toxicité des sels biliaires pour les cellules bactériennes ne soit pas complètement élucidée, des travaux ont montré que ce sont des molécules amphipatiques avec une activité antimicrobienne efficace puisqu'ils agissent en tant que détergents et déforment ainsi les membranes biologiques de la cellule.

Les acides biliaires (figure 5) induisent une perméabilité totale de la membrane, endommagent grièvement l'enveloppe bactérienne et altèrent le transport de glucose.

**Tableau 7** : Effet de l'acidité sur la survie de quelques souches probiotiques.

Souches bactériennes	Population initiale UFC.mL <sup>-1</sup>	Durée d'incubation et degré d'acidité	Effets sur la survie des micro-organismes	Etudes
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	=1.23.10 <sup>9</sup>	0.5 h pH 2.5	Aucune survie de la bactérie après ce temps d'incubation	Sun et Griffiths (2000)
<i>L. acidophilus</i> 2409	=10 <sup>11</sup>	3 h pH 2 et 3	Baisse de 5 log UFC mL <sup>-1</sup> à pH 2	Sultana et al. (2000)
<i>L. casei</i> 2603			Baisse de 2 log UFC mL <sup>-1</sup> à pH 3	
<i>L. acidophilus</i> 05	=10 <sup>10</sup>	1 h pH 1, 2 et 3	Aucune survie à pH 1 et 2	Favaro-trindade et Grosso (2002)
<i>B. lactis</i> Bb12			Baisse d'environ 1.5 log UFC mL <sup>-1</sup> à pH 3	
<i>B. lactis</i> Bb12			Aucune survie à pH 1.	Hansen et al. (2002)
<i>B. breve</i> 15700	=5.10 <sup>9</sup>	2 h pH 1 et 2	Baisse de 1 log UFC mL <sup>-1</sup> pour <i>B. lactis</i> Bb12 à pH 2. Baisse de 5 log UFC mL <sup>-1</sup> pour <i>B. breve</i> .	
<i>B. longum</i> 46			Baisse de 6.5 log UFC mL <sup>-1</sup> pour <i>B. longum</i> .	
<i>B. infantis</i> ATCC 15697			Baisse de 7.5 log UFC mL <sup>-1</sup> pour <i>B. infantis</i> .	
<i>B. bifidum</i> 11			Aucune survie pour <i>B. bifidum</i>	



**Figure 5 :** Observation au microscope électronique (grossissement  $\times 50\,080$ ) de l'aspect des cellules de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 traitées par les sels biliaires **(a)** par l'ATDC (acide taurodésoxycholique), **(b)** par l'ADC (acide désoxycholique), ou **(c)** dans les témoins non traitées (Taranto et al., 2006).

L'analyse du profil lipidique des cellules de bactéries lactiques soumises à l'effet toxique des acides biliaires a révélé des changements dans le ratio phospholipides/glycolipides et aussi dans les quantités d'acides gras membranaires (Taranto et al., 2006).

Etant donné que l'acidité gastrique et les sécrétions bilio-pancréatiques constituent les principaux mécanismes endogènes d'inactivation des bactéries probiotiques ingérées, l'exposition à des mélanges simulant ces conditions a été adoptée comme l'un des principaux tests *in vitro* en vue de la sélection des souches ayant un intérêt probiotique potentiel.

Les aliments vecteurs, par leur effet tampon, ou des systèmes galéniques de protection comme la microencapsulation pourraient aider les cellules probiotiques à mieux survivre aux différentes hostilités rencontrées.

### **I.7.3. Les solutions innovatrices : la microencapsulation comme outil de préservation de la survie**

La microencapsulation consiste à enrober ou immobiliser un microorganisme dans des capsules ayant des tailles allant de quelques micromètres à quelques millimètres (Kirby, 1991).

L'encapsulation consiste à fabriquer une matrice à base d'un gel où les cellules microbiennes sont aléatoirement intégrées et immobilisées. Généralement, les termes «immobilisation» et «encapsulation» sont confondus et utilisés comme synonymes dans la plupart des études au sujet de la microencapsulation de probiotiques (Anal et Singh, 2007).

Le principe de la microencapsulation est de réduire au maximum les pertes de la biomasse probiotique depuis son incorporation dans l'aliment fonctionnel, au cours du transit intestinal, jusqu'aux cellules cibles où le probiotique exerce son action bénéfique chez l'hôte après s'être spécifiquement libéré. En outre, les capsules doivent être suffisamment petites pour éviter des impacts sensoriels négatifs sur l'aliment vecteur.

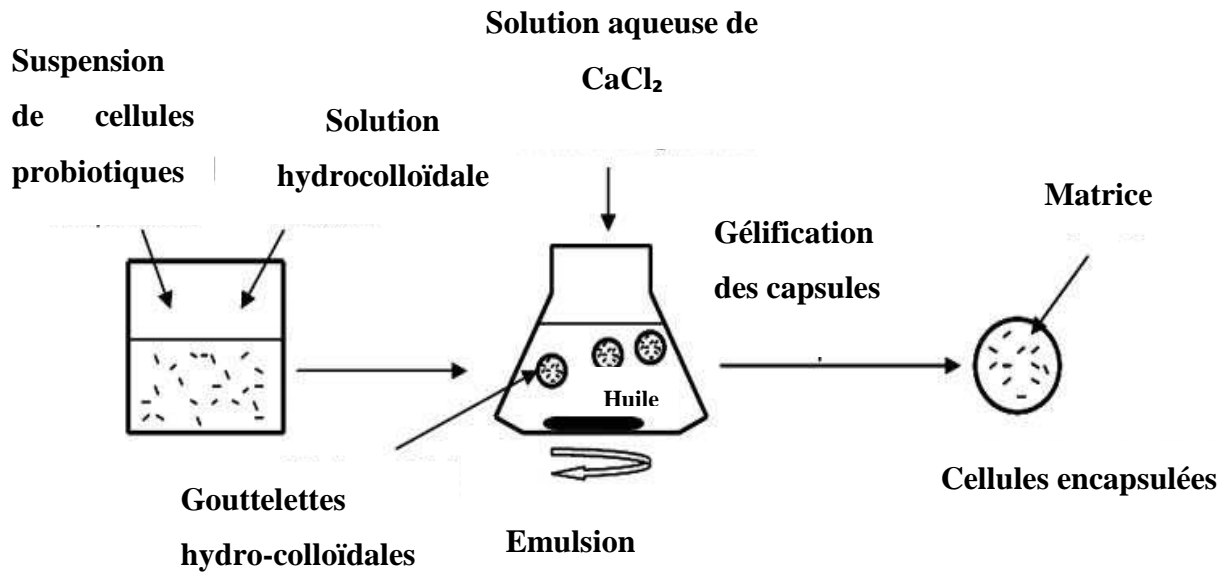
Les probiotiques microencapsulés doivent être élaborés par une technique d'encapsulation qui ne diminuerait pas le nombre de cellules vivantes en dessous du seuil requis pour générer l'effet positif chez le consommateur (Heidebach, 2012). Différentes études ont confirmé l'efficacité de la microencapsulation dans l'augmentation de la capacité de survie des cellules probiotiques à travers leur passage par le système gastro-intestinal (enzymes, acidité et bile) et dans l'aliment vecteur (Krasaekoopt et al., 2003 ; Anal et Singh, 2007; Nazzaro et al., 2009 ; Mohammadi et al., 2011).

#### **I.7.3.1. Techniques d'encapsulation des cellules probiotiques**

La grande majorité des microcapsules produites pour des applications en Techniques d'Immobilisation Cellulaire (TIC) dans les systèmes laitiers sont générées par deux méthodes : la technique de l'émulsion et la technique de l'extrusion.

##### **I.7.3.1.1. Technique d'émulsion**

L'encapsulation de cellules probiotiques par émulsion (figure 6), est la technique la plus appropriée concernant le contrôle et l'ajustement souple de la taille des capsules à former. Dans cette méthode, un petit volume de mélange aqueux hydro-colloïde cellulaire (phase discontinue) est émulsionné dans un plus grand volume d'huile végétale (phase continue).



**Figure 6 :** Microencapsulation par la technique d'émulsion (Heidebach et al., 2012).

Une fois l'émulsion eau dans l'huile formée, le mélange hydro-colloïdes et cellules doit être insolubilisé pour former de petites capsules dans la phase huileuse (Krasaekoopt et al., 2003). Ainsi, la cinétique de gélification n'est pas homogène, ce qui conduit parfois à des capsules de forme irrégulière (Sheu et Marshall, 1993).

La technique d'émulsion a d'abord été développée par Nilsson et al. (1983) comme une méthode générale pour l'immobilisation des cellules vivantes sensibles. Les auteurs ont indiqué qu'en réglant la vitesse d'un agitateur magnétique pendant le processus d'émulsion, des capsules entre 0.1 et 5 mm de diamètre moyen pouvaient être produites à l'époque.

Les principaux paramètres pour contrôler la taille des capsules sont l'apport d'énergie au cours de l'émulsion, l'ajout d'agents émulsifiants et le rapport de viscosité entre la phase de dispersion et la phase continue. Pour l'encapsulation de cellules probiotiques, l'étape d'émulsion est souvent réalisée au moyen d'une barre d'agitation magnétique ou d'un agitateur mécanique direct (Ding et Shah, 2009).

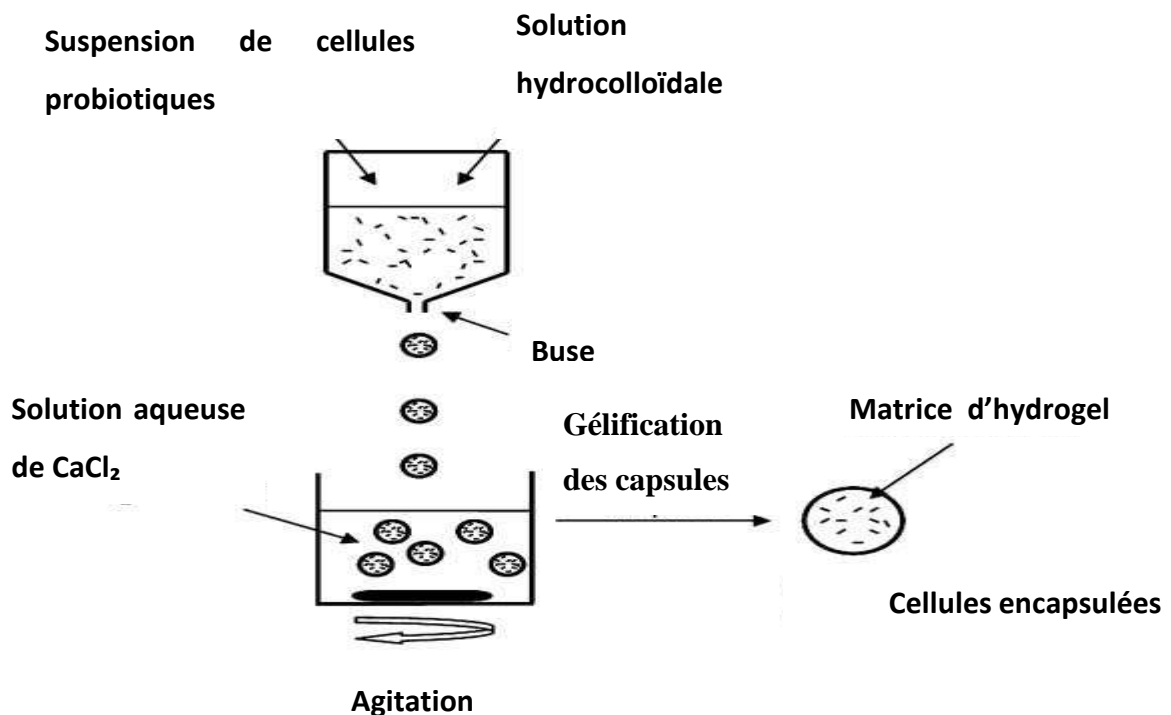
Dans ces cas, les forces de cisaillement et la réduction de taille de particules qui en résulte est plutôt indéfinie. Cependant, avec la méthode d'émulsion, la taille des capsules d'en-dessous de 100  $\mu\text{m}$  est possible lorsque l'agitation mécanique est suffisamment élevée.

### I.7.3.1.2. Technique d'extrusion

La technique d'extrusion (figure 7) consiste à préparer une solution aqueuse d'hydro-colloïdale, y ajouter des microorganismes concentrés et l'extrusion du mélange se fait à travers une buse qui forme des gouttelettes tombant dans une solution de durcissement. Dans le cas de l'alginate de sodium, la gélification est possible en faisant tomber les gouttes dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  (Krasaekoopt et al., 2003). La taille des capsules qui en résulte dépend du diamètre de l'orifice, la distance entre le point du jet et la solution de durcissement, mais aussi de la viscosité du mélange d'hydro-colloïde-cellule (Anal et Singh, 2007). Étant donné que le procédé d'extrusion est facilement disponible dans les TIC, il a été utilisé par certains chercheurs pour la microencapsulation de cellules probiotiques (Krasaekoopt et al., 2003).

### I.7.3.2. Caractéristiques de la capsule

Comme on peut le voir dans la figure 8, on distingue deux types principaux de capsules. Le type réservoir et le type matrice. Le type réservoir a une membrane qui entoure l'agent actif, c'est pourquoi on l'appelle aussi capsule. Dans le cas de la matrice, l'agent actif est dispersé partout dans la matière et peut également être retrouvé à la surface. La combinaison de ces deux types donne un troisième type de capsule: la matrice dans laquelle l'agent actif est recouvert d'une couche (Zuidam et Shimoni, 2009).

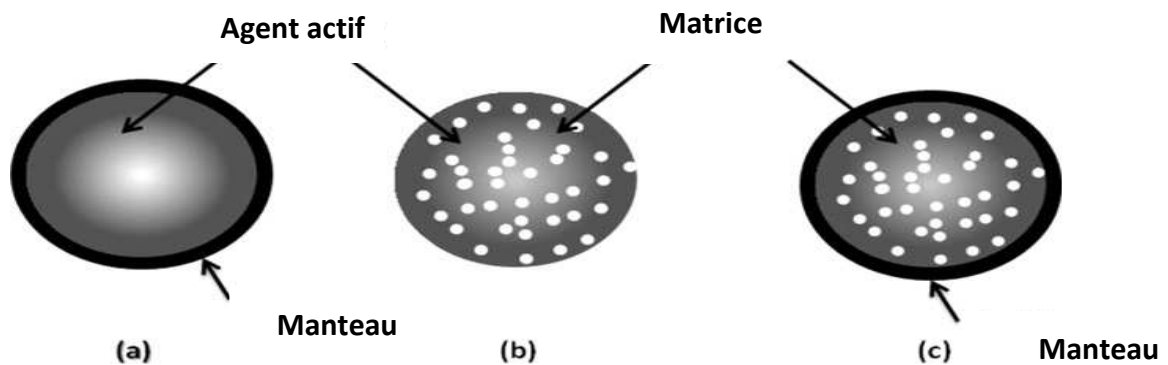


**Figure 7 :** Microencapsulation par la technique d'extrusion (Heidebach et al., 2012).

La taille de capsule désirée pour les applications TIC dépend de la croissance cellulaire souhaitée, des forces mécaniques, et des caractéristiques de séparation des capsules (Lacroix et al., 2005). Dans les applications en TIC, il est préférable d'utiliser des sphères avec une taille comprise entre 1 et 3 mm.

La production de biomasse cellulaire avec des sphères de matrice est principalement contrôlée par la diffusion et les phénomènes de transfert de masse.

Une certaine perte indésirable des cellules dans le milieu environnant arrive une fois que l'espace matriciel est complètement occupé ; ce qui mène à une rupture du gel causée par la croissance cellulaire.



**Figure 8 :** Représentation schématique des différents types de capsule: (a) type réservoir, (b) type matrice, et (c) type enveloppe et matrice (Burgain et Tous, 2011).

Afin de permettre une utilisation efficace des microcapsules de probiotiques dans des produits alimentaires, il faudrait s'assurer que l'hydro-colloïde utilisé comme matériau pour la matrice est non seulement efficace en tant que barrière face aux conditions de pH acide, mais, il doit également pouvoir être digéré au niveau de l'intestin, et en conséquence libérer les cellules probiotiques dans la lumière intestinale (Heidebach et al., 2012).

### I.7.3.3. Polymères pour l'encapsulation

Plusieurs caractéristiques devraient être prises en considération pour utiliser un polymère pour la formation de microcapsules. La sélection de polymère commence par la description de la composition chimique et quantique des unités monomériques.

Les caractéristiques du poids moléculaire doivent aussi faire partie de la documentation délivrée avec le polymère, afin de mieux déterminer les propriétés des capsules à former (de Vos et al., 2009).

### - L'alginate

L'alginate est un polysaccharide polyanionique naturel, qui se trouve dans la paroi cellulaire de toutes les algues brunes. Il peut être extrait de certaines de ces algues (*Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata* ou *hyperborea*) ou également être produit à partir de bactéries (*Azobacter vinelandii*, *Pseudomonas mendocina*).

En 1955, Fischer et Dörfel (Fischer, 1955 ; cité par Vallée, 2007) ont mis en évidence l'existence de deux acides uroniques dans la macromolécule d'acide alginique : l'acide  $\beta$ -D-mannuronique (M) et l'acide  $\alpha$ -L-guluronique (G) associés par des liaisons 1-4 selon un enchainement irrégulier de blocs de trois types :

- Un bloc homopolymère de résidus mannuronates –M-M-M-,
- Un bloc homopolymère de résidus guluronates –G-G-G-,
- Un bloc de résidus mannuronates et guluronates alternés –M-G-M-.

Les utilisations variées de l'alginate concernent ses qualités en tant qu'agent de texture polyvalent (épaississant, gélifiant, stabilisant, réducteur de cristaux et protecteur) dans les domaines agro-alimentaire (glaces de dessert, sauces), cosmétique (soins de visage, dentifrices), pharmaceutique (pommades anti-brûlures, pansements, encapsulation de principes actifs) et des textiles (fixation de colorants) (Mano et al., 2007).

Sa production industrielle a débuté en 1930 par la société américaine Henkel, aujourd'hui leader mondial spécialisé dans la fabrication de colles, d'adhésifs à base d'alginate et de détergents.

Les hydrogels d'alginate sont aussi largement utilisés pour l'encapsulation bactérienne (Rowley et al., 1999). Ils sont désignés les meilleurs en raison de leur simplicité, leur biocompatibilité, leur non-toxicité et leur coût raisonnable (Krasaekoopt et al., 2003).

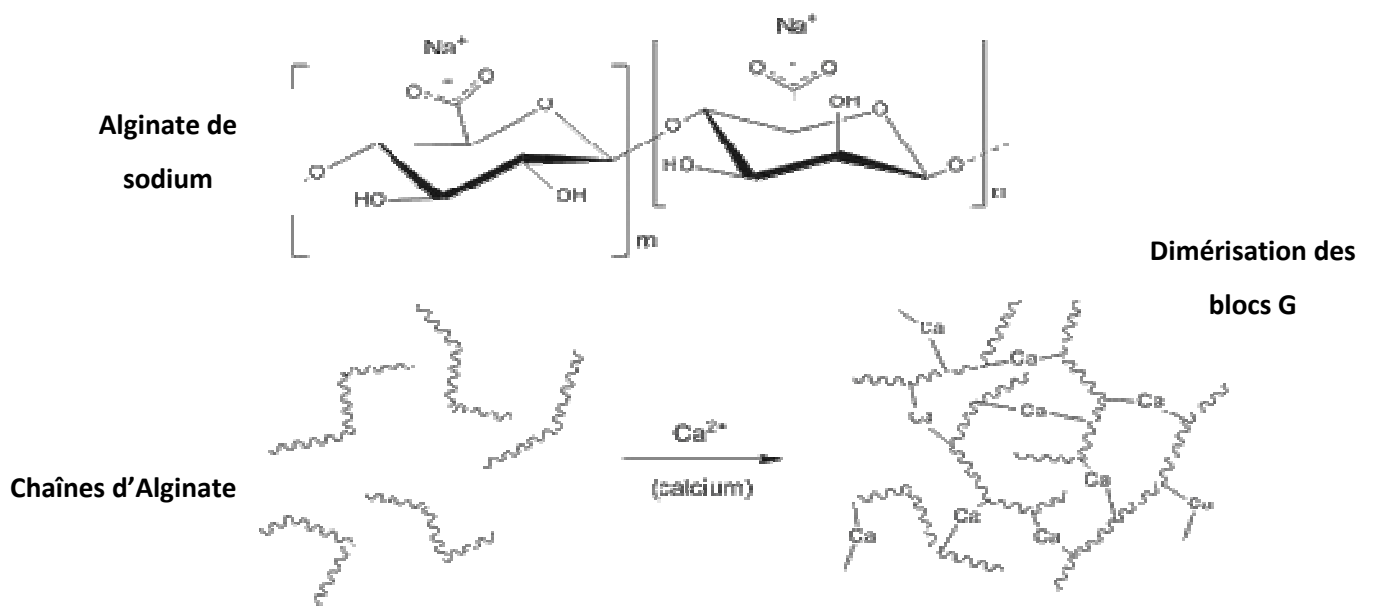
Cependant, quelques inconvénients sont attribués à son utilisation, plus particulièrement, sa sensibilité à l'acidité (Mortazavian et al., 2008). C'est pourquoi les sels d'alginate sont plus appropriés.

L'alginate de sodium, une des combinaisons stables de l'acide alginique (-Na, -K, -NH<sub>4</sub>, -Mg et alginate-Ca), est largement utilisé pour l'encapsulation des bactéries probiotiques, principalement à la concentration de 0.5 à 4 g L<sup>-1</sup> (Krasaekoopt et al., 2004).

Les sels d'alginate ont la propriété de former des gels en présence de cations divalents. Il s'agit d'une gélification ionotrope.

Dans le cas des hydrogels d'alginate de calcium, la formation du gel à partir de poudre d'alginate de sodium (figure 9) est due à la chélation des ions Ca<sup>2+</sup> (présence de solution riche en calcium) et qui déplacent les ions Na<sup>+</sup> dans les cavités électronégatives formées par les groupements carboxylates des résidus guluronates (Blocs G) selon le modèle de boîtes à œufs « egg-box ». Les ions Ca<sup>2+</sup> étant divalents se lient avec deux blocs G par un mécanisme coopératif, ainsi ils passent de l'état désordonné à un état ordonné. La fixation d'un ion Ca<sup>2+</sup> facilite la capture d'un second ion Ca<sup>2+</sup>, et ainsi de suite jusqu'à la dimérisation de tous les blocs G.

Suivant la force des interactions ioniques, le pouvoir chélatant et la taille des cations, un réseau tridimensionnel se forme et l'alginate se gélifie. Les cations monovalents et Mg<sup>2+</sup> ne provoquent pas la gélification de l'alginate. La force du gel dépend de la nature du cation, les gels les plus forts étant obtenus avec Ba<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> (Smidsrod, 1972 ; cité par Vallée, 2007).



**Figure 9 :** Principales étapes de gélification de l'alginate de sodium (d'après Vallée, 2007).

Les capsules d'alginate de calcium ont l'avantage de former facilement la matrice gel autour de la cellule bactérienne, ne pas être toxique, de préparation facile et d'une résolution convenable dans l'intestin. Le gel couvre les cellules bactériennes avec un diamètre de 1-3  $\mu\text{m}$  (Klien et al., 1983).

#### - Les carraghénanes

Le  $\kappa$ -Carraghénane est un polysaccharide utilisé en industrie alimentaire. L'ajout des cellules au polymère se fait à une température de 40 à 50°C. Le refroidissement à la température ambiante permet sa gélification et l'addition d'ions monovalents, tels que le potassium ajouté généralement sous forme de KCl, génère les billes de gel (Krasaekoopt et al., 2003).

#### - L'amidon

L'amidon est un polysaccharide constitué d'un grand nombre d'unités glucose reliées par des liaisons glucosidiques. Il est constitué essentiellement d'amylose, un polymère linéaire de D-glucopyranoses reliés par des liaisons glucosidiques  $\alpha$ - (1-4), et d'amylopectine, un polymère ramifié d'unité de glucose liées par des liaisons glucosidiques de type  $\alpha$ -(1-4) et  $\alpha$ -(1-6) (Sajilata et al., 2006).

L'amidon résistant est une forme d'amidon qui n'est pas digérée par les enzymes pancréatiques (amylases) (Anal et Singh, 2007). D'autre part, cette forme est reconnue d'avoir une fonctionnalité prébiotique que les bactéries probiotiques autochtones pourraient sélectivement y fermenter (Mortazavian et al., 2008).

#### - Le mélange de xanthane-gellane

Le xanthane est un polysaccharide extracellulaire sécrété par *Xanthomonas campestris* composé d'unités pentoses attachées à une chaîne de tri-saccharides (Pinheiro et al., 2010).

La gellane est un polysaccharide microbien dérivé de *Pseudomonas elodea*, constitué de quatre monomères répétés respectivement : glucose, acide glucuronique, glucose et rhamnose (Chen et Chen, 2007).

Le mélange des gommes « xanthane-gellane » a été utilisé avec succès dans la microencapsulation des bactéries probiotiques (Sun et Griffiths, 2000). Contrairement à l'alginate, ce mélange est résistant aux conditions acides, ce qui lui confère – probablement - la qualité du meilleur matériau pour l'encapsulation des bifidobactéries.

Le rapport de concentration entre les deux gommes permettant une microencapsulation optimale est de l'ordre de 1 : 0.75 en faveur du xanthane (Sun et Griffiths, 2000).

#### - **La gélatine**

C'est une gomme qui a été aussi utilisée pour la microencapsulation des microorganismes probiotiques, seule ou mélangée avec d'autres gommes (Hyndman et al., 1993). De nature protéique, la gélatine a la propriété de former un gel thermoréversible. Sa nature amphotère lui confère une habilité d'effets synergiques avec les polysaccharides anioniques tels que la gomme de gellane (Anal et Singh, 2007).

#### - **Le chitosane**

Le chitosane est un polysaccharide linéaire à charges négatives, provenant des groupements aminés obtenus par diacétylation de la chitine. Il est soluble à pH inférieur à 6, et forme une structure de gel par gélification ionotropique. La capacité des polymères de chitosane à améliorer la viabilité des cellules probiotiques est insuffisante sur le plan pratique. En revanche, il est plutôt utilisé à faible concentration (0.4%) pour constituer la « coquille » autour des capsules formées (Mortazavian et al., 2008).

#### - **L'acétate phtalate de cellulose**

L'acétate phtalate de cellulose est utilisé pour la libération spécifique des médicaments dans l'intestin (Mortazavian et al., 2008). Ce composant est insoluble à un pH acide (inférieur à 5) et soluble à un pH supérieur à 6. L'encapsulation des microorganismes en utilisant l'acétate phtalate de cellulose assure une protection aux conditions gastro-intestinales (Fávaro-Trindade et Grosso, 2002).

Divers polymères et macromolécules ont été aussi testés pour la microencapsulation des microorganismes probiotiques. Le tableau 8 résume les principales études récentes dans cette nouvelle filière.

### **I.7.3.4. Avantages de l'encapsulation des microorganismes probiotiques en industrie laitière**

#### **I.7.3.4.1. Préservation et amélioration des propriétés sensorielles de produits à base de cultures probiotiques**

La microencapsulation des microorganismes probiotiques semble permettre la

**Tableau 8** : Les principales études récentes sur la microencapsulation des microorganismes probiotiques.

Les microorganismes probiotiques encapsulés	Nature du gel utilisé	Études
<i>L. acidophilus</i> 2401 et <i>L. cremoris</i> R-704	Caséinate de sodium + FOS + D-glucose + mannitol	Dianawati et al. (2013)
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12	Solution de pullulan	López-Rubio et al. (2011)
<i>Lactobacillus</i> sp	Mélange xanthane-gellane	Jiménez-Pranteda et al. (2011)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-2	Barre de soja	Chen et Mustapha (2011)
<i>L. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103) et <i>L. acidophilus</i> NCFM	Alginate	Sohail et al. (2010)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Gel de protéine	Doherty et al. (2010)
<i>Lactobacillus gasseri</i> et <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Mélange alginate-chitosane	Chávarri et al. (2010)
<i>Lactobacillus casei</i> 431	Mélange caséinate de sodium – gellane	Nag et al. (2010)
<i>L. casei</i>	Mélange alginate-pectine	Sandoval-Castilla et al. (2010)
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	Mélange alginate-chitosane et carboxyméthyl-chitosane	Yan Li et al. (2010)
<i>L. acidophilus</i> et <i>B. bifidum</i>	Alginate	Özer et al. (2009)

préservation et/ou l'amélioration des qualités sensorielles du produit fini.

Adhikari et al. (2000) ont rapporté que des produits fermentés, tels que les yaourts, par les souches starters encapsulées ont une acidité plus douce comparativement à celle des produits contenant ces mêmes bactéries libres ou non encapsulées. Cependant Kailasapathy (2006) a signalé que l'analyse sensorielle a révélé une légère granularité pour les yaourts contenant des microcapsules par rapport à ceux contenant des cellules libres.

Muthukumarasamy et Holley (2006) ont rapporté que 1% de microcapsules de diamètre variant de 2 à 3 mm ne pourraient pas affecter la qualité sensorielle du Salami (saucisson italien). Toutefois, l'équipe de Hansen et al. (2002) a montré que les microcapsules de ce même diamètre affectent négativement les propriétés sensorielles des yaourts, du lait ou de la crème fraîche.

Quant aux fromages, Gobetti et al. (1998), Godward et Kailasapathy (2003) et Ózer et al. (2009) n'ont trouvé aucune différence dans la saveur des fromages contenant des probiotiques libres ou encapsulés.

#### **I.7.3.4.2. Préservation et amélioration de la viabilité des microorganismes probiotiques**

De Vos et al. (2010) ont rapporté une faible viabilité des probiotiques dans les produits laitiers comme les yaourts et les crèmes glacées en raison de la concentration en acides lactique et acétique, le pH bas, la présence du peroxyde d'hydrogène et/ou la teneur élevée en oxygène. L'encapsulation a été adoptée pour préserver et améliorer la viabilité des microorganismes probiotiques dans les produits laitiers et les protéger aux conditions du tractus gastro-intestinal une fois ces bactéries ingérées (Krasaekoopt et al., 2003 ; Picot et Lacroix, 2004).

La viabilité des probiotiques encapsulés dépend principalement des propriétés physico-chimiques de la capsule. En fait, le type et la concentration du matériau de revêtement, la taille des particules, le nombre de cellules initiales et le type de souche bactérienne, sont aussi des paramètres à maîtriser (Chen et Chen, 2007).

Les microcapsules obtenues doivent être insolubles dans l'eau pour préserver leur intégrité dans la matrice alimentaire et dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal et, enfin, les propriétés des matériaux utilisés pour fabriquer les gels devraient permettre la libération progressive des cellules au cours de la lumière intestinale (Ding et Shah, 2007).

D'une manière générale, plusieurs travaux récents ont démontré l'utilité de la technique de microencapsulation dans le maintien de quantités élevées de microorganismes probiotiques viables dans le lait et ses produits dérivés (Sultana et al., 2000 ; Capela et al., 2007 ; Homayouni, et al., 2008 ; Heidebach et al., 2009...).

## **I.8. L'assimilation du cholestérol par les probiotiques: vers une remédiation du problème d'hypercholestérolémie ?**

### **I.8.1. Cholestérol, fonctions biologiques et implications pathologiques**

Le cholestérol est une molécule à double facette. En effet, malgré son importance dans les différentes réactions métaboliques de l'organisme, l'excès du cholestérol peut se révéler nuisible pour la santé. L'hypercholestérolémie est à l'origine de l'athérosclérose, en raison de l'accumulation du cholestérol au niveau des plaques d'athéromes (Jeun et al., 2010).

L'OMS a prédit que d'ici 2030, les maladies cardiovasculaires pourront demeurer les principales causes de décès, pouvant toucher à cette date environ 23.6 millions de personnes dans le monde (OMS, 2009).

Il est aussi admis que le risque de crise cardiaque est trois fois plus élevé chez les sujets souffrant d'hypercholestérolémie comparativement à ceux qui ont un bilan lipidique sanguin normal (Ooi et Liong, 2010).

L'une des principales stratégies préventives pour le traitement des maladies cardiovasculaires est de contrôler la cholestérolémie et la triglycéridémie.

Le cholestérol sérique provient de deux sources :

- Le cholestérol endogène issu de la synthèse hépatique et extra-hépatique,
- Le cholestérol exogène provenant de l'alimentation et des acides biliaires (Calpe-Berdiel et al., 2009).

C'est pourquoi l'homéostasie du cholestérol est reflétée par le rapport entre les quantités de cholestérol absorbée et synthétisée (Matthan et al., 2009).

La répartition du cholestérol dans les différents organes est identique chez la plupart des espèces de mammifères et sa concentration est inférieure à 1 mg. L<sup>-1</sup> de tissus frais. Le cholestérol et les autres lipides sanguins sont peu solubles en solution aqueuse et sont transportés dans le sang fixés à des protéines appelées « apoprotéines ». Les lipoprotéines qui en résultent forment un mélange extrêmement hétérogène avec des compositions chimiques, des propriétés physiques et des fonctions métaboliques très différentes.

## **I.8.2. Mécanismes bactériens régulant le taux de cholestérol**

### **I.8.2.1. Action des probiotiques**

La recherche de microorganismes assimilant le cholestérol a été entamée il y a plus de 40 ans. Toutefois, les voies de dégradation de celui-ci par les différents microorganismes probiotiques ne sont pas complètement élucidées.

Sharper et al. (1963 ; cités par Liong et Shah, 2005a) avaient observé que les hommes des tribus Samburu et des guerriers Masai en Afrique, avaient des cholestérolémies normales que ces auteurs ont trouvé corrélées à leur régime alimentaire constitué exclusivement de laits fermentés. Plus tard, Mann (1974; cités par Liong et Shah, 2005a) venait confirmer cette hypothèse et en reliant l'aspect thérapeutique du lait fermenté à la présence de souches lactiques du genre *Lactobacillus*. Ces travaux ont suscité un intérêt considérable dans la possibilité d'effets bénéfiques générés par la consommation de produits fermentés contenant des lactobacilles ou des bifidobactéries probiotiques sur le métabolisme des lipides.

Les premiers travaux *in vitro* sur l'assimilation de cholestérol par les bactéries lactiques ont été entamés par Gilliland et al. (1984) sur *Lactobacillus acidophilus*. Ces auteurs ont suggéré que la quantité de cholestérol indisponible du milieu de culture était assimilée par le lactobacille ; et que ce phénomène était étroitement lié à la croissance cellulaire et à la présence de sels biliaries.

Plusieurs recherches soutenues ont été réalisées par Klaver et Van der Meer depuis 1993, afin de mieux comprendre ce mécanisme d'assimilation bactérienne de cholestérol. Ces auteurs avaient conclu que la disparition de cholestérol du milieu de culture n'est pas due à une assimilation directe de la molécule, mais plutôt à une co-précipitation avec les sels biliaries déconjugés dans un environnement acide.

Tahri et al. (1995) ont étudié l'action réductrice du cholestérol chez les bifidobactéries et ont observé qu'il existe une forte affinité de liaison entre la paroi cellulaire des souches bifides et la molécule de cholestérol. Cette liaison a été considérée comme étant une assimilation qui dépendrait, selon les auteurs, de la croissance des souches.

Par ailleurs, la présence de sels biliaries dans le milieu de culture est indispensable pour l'expression de toute activité significative réductrice de cholestérol de la part des bifidobactéries. De ce fait, ces auteurs ont suggéré que le mécanisme bactérien réducteur de

cholestérol est l'union des deux effets : assimilation bactérienne directe de cholestérol et/ou co-précipitation avec les sels biliaires déconjugés.

Le cholestérol est attaché aux parois des cellules bactériennes par des phénomènes physiques résultants des propriétés chimiques et structurelles du peptidoglycane de la paroi cellulaire (Kimoto-Nira et al., 2007).

Une année après, l'étude effectuée par Tahri et al. (1996) a essayé de répondre à la question suivante : « Est-ce que l'inhibition de la déconjugaison des sels biliaires influence l'assimilation bactérienne de cholestérol ? ». Leurs résultats ont confirmé les observations de Klaver et Van der Meer (1993). Par ailleurs, l'équipe de Tahri a montré qu'en absence des cellules bactériennes, le cholestérol se précipite partiellement dans un milieu de culture additionné de sels biliaires déconjugés à pH 5.5, mais se dissout dès que le pH remonte à 7.

Il faudrait noter que la co-précipitation *in vitro* du cholestérol avec les acides biliaires déconjugés ne pourrait pas avoir toujours lieu *in vivo*, car le pH du petit intestin est supérieur à 6 (Pereira et Gibson, 2002a).

Par ailleurs, De Smet et al. (1994) ont montré que les bactéries lactiques à activité enzymatique BSH (bile salt hydrolase ou Cholylglycine hydrolase) ont la capacité d'abaisser la cholestérolémie en affectant le métabolisme des sels biliaires chez l'hôte. La BSH est l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse des sels biliaires conjugués à la glycine et/ou à la taurine en résidus d'acides aminés et sels biliaires libres (Tahri et al., 1995).

La bile est composée principalement de sels biliaires produits par le foie et secrétés directement dans le duodénum. L'hydrolyse des acides biliaires conduit à la formation des sels biliaires, la glycine et/ou la taurine. Dans l'intestin, ces sels biliaires jouent un rôle important dans l'émulsion et la solubilisation des lipides (Liong et Shah, 2005b). L'acide cholique, le principal acide biliaire libre se trouvant dans l'intestin, est produit par la déconjugaison des sels biliaires libres, les acides taurocholique et glycocholique (Kurdi et al., 2003).

La plupart des sels biliaires déconjugés échappent à la circulation entéro-hépatique étant donné qu'ils sont moins solubles et faiblement réabsorbés comparativement à leurs homologues conjugués, et sont, par conséquent, excrétés dans les selles. Cette perte en sels biliaires diminue ainsi l'émulsification et le niveau d'absorption du cholestérol exogène. Afin de compenser cette perte, le cholestérol du corps serait utilisé pour fabriquer les sels biliaires perdus par déconjugaison bactérienne (Reynier et al., 1981).

Une étude *in vivo* sur des rats axéniques (Chikai et al., 1987) a confirmé cette hypothèse selon laquelle la déconjugaison des sels biliaires par *Bifidobacterium longum* augmentait leur excrétion fécale. Cette thérapie pourrait être considérée comme une alternative biologique aux interventions médicales ou chirurgicales dans le traitement de l'hypercholestérolémie (Sridevi et al., 2009).

Noh et al. (1997) ont supposé que le cholestérol pourrait aussi être assimilé par les bactéries probiotiques durant leur croissance par incorporation de la molécule dans la paroi cellulaire.

Cependant, Usman et Hosono (1999) n'ont pas trouvé de corrélation significative entre la résistance bactérienne vis-à-vis de la bile et le pouvoir à lier le cholestérol à la membrane cellulaire. Des souches de *Lactobacillus gasseri* affichent de grandes différences dans le pouvoir de liaison, ce qui pourrait être expliqué par les différences observés dans les propriétés chimiques et structurales de la paroi bactérienne.

Les résultats de Dilmi-Bouras (2006) montrent que certaines souches de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* résistent bien aux sels biliaires et assimilent une quantité appréciable du cholestérol. En effet ces résultats confirment les travaux de ce même auteur avec d'autres souches de ferments classiques de yaourt.

*In vivo*, *L. bulgaricus* s'est montré capable de diminuer l'hypercholestérolémie chez le lapin (Dilmi-Bouras et Saadoun, 2002). Des résultats similaires ont rapporté la même observation sur le rat en utilisant *L. casei* (Oyetayo et al., 2003 ; Bertazzoni et al., 2004). Chez l'homme (Tableau 9), il a été aussi trouvé que l'administration de *L. reuteri* à des volontaires pendant 7 jours diminue la cholestérolémie et la triglycéridémie par 38 et 40%, respectivement, et augmente le rapport HDL / LDL de 20% (Taranto et al., 1998).

Des patients présentant une hyperlipémie et ayant consommé *L. sporogenes* avaient en moyenne une réduction de 32% de la cholestérolémie et de 35% du cholestérol-LDL et ceci durant une période d'administration de 3 mois (Mohan, 1990).

D'autres travaux suggèrent aussi que des souches de *L. paracasei* ont un rôle dans la réduction significative du cholestérol total et celui de type LDL. Cette réduction est le résultat d'une assimilation directe du cholestérol ou d'une production de substances inhibant sa synthèse (Dilmi-Bouras et al., 2007).

Le cholestérol peut être converti dans l'intestin en coprostanol, qui est directement excrété dans les selles.

**Tableau 9** : Détails de quelques études évaluant l'effet hypocholestérolémiant des produits laitiers fermentés aux probiotiques (d'après Pereira et Gibson, 2002a).

Etudes	- Type de produit. - Période de prise.	Sujets	Le projet étudié	Taux de lipides sanguins
De Rodas et al. (1996).	- Yaourt avec <i>L. acidophilus</i> ATCC 43121 - 14 jours	33 porcs	Animaux recevant un régime gras	-11.8% CT
Sessions et al. (1998).	- 200 mL de lait fermenté (starters de yaourt) - 3 mois	78 hommes et 76 femmes hyperlipidiques	Etude en double aveugle contre placebo.	= CT = C- LDL
Larsen et al. (2000).	- 450 mL de lait fermenté (starters de yaourt) - 8 semaines	20 hommes et 50 femmes obèses ou présentant un surpoids Ages de 18 à 55 ans	Etude en double aveugle contre placebo	-8.4% C- LDL
Hikucki-Hayakawa et al. (2000).	- Yaourt avec <i>L. casei</i> , souche Shirota, produit Yakult®	Hamsters	/	-30% TG

= : pas de changement.

CT: Cholestérol total ; C- LDL : cholestérol de type LDL, Low Density Lipoprotein ; TG: triglycérides.

Cette conversion du cholestérol en coprostanol par les populations bactériennes humaines a été identifiée pour la première fois par les chercheurs de l'INRA de Jouy-En-Josas (Gérard et al., 2007). Cette conversion bactérienne se déroule selon deux voies :

- a- La voie indirecte implique la formation intermédiaire du 4-cholesten-3-one et coprostanone,
- b- La voie directe implique la conversion directe du cholestérol en coprostanol par la réduction de la double liaison (5-6).

En effet, le coprostanol n'est pas comme le cholestérol, il est moins absorbé par les intestins de l'être humain (Sekimoto et al., 1983 ; Lichtenstein, 1990). Une relation inverse a été observée entre le niveau du cholestérol sérique et le rapport coprostanol / cholestérol dans les fèces (Sekimoto et al., 1983). Gérard et al. (2007) considéraient cette conversion comme un moyen pour réduire la cholestérolémie et, par ce biais diminuer le risque cardiovasculaire chez l'homme.

Des études récentes sur le pouvoir d'assimilation du cholestérol par les bactéries lactiques probiotiques mettent en évidence le site moléculaire de cette action réductrice de cholestérol. *In vitro*, Lye et al. (2010b) ont confirmé que des souches de *Lactobacillus* (*L. bulgaricus*, *L. casei* et *L. acidophilus*) étaient toutes capables d'incorporer le cholestérol dans leurs membranes cellulaires et aussi de le convertir en coprostanol. La majorité du cholestérol assimilé a été incorporé dans les queues phospholipidiques et les têtes polaires de la bicouche membranaire. Alors que dans une culture cellulaire Caco-2, Huang et Zheng (2010) ont indiqué que des facteurs solubles dans les surnageants de *L. acidophilus* ATCC 4356 cultivé en présence de sels biliaries et de cholestérol étaient capables d'inhiber le facteur Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) qui, lorsqu'il est faiblement exprimé, entraîne une réduction marquée dans la réabsorption intestinale de cholestérol.

Vasiljevic et Shah (2008) suggéraient que l'assimilation de cholestérol *in vivo* par les bactéries probiotiques est due à la production d'hydroxy-méthylglutarate qui inhibe l'hydroxy- méthylglutaryl CoA réductase ; une enzyme nécessaire à la synthèse du cholestérol.

### **I.8.2.2. Action des prébiotiques**

Jusqu'à présent, l'inuline et l'oligofructose sont de loin les prébiotiques les plus étudiés, tant du point de vue nutritionnel que technologique. De nombreux autres glucides

pourraient revendiquer l'appellation prébiotique, certains oligosaccharides sont au moins partiellement hydrolysés et absorbés dans l'appareil gastro-intestinal supérieur, mais rapidement et complètement fermentés dans le côlon (Roberfroid, 2007).

Le mécanisme d'action des fructo-oligosaccharides (tableau 10) dans la diminution du taux des lipides se traduit par une augmentation des quantités de produits issus de leur fermentation, notamment le propionate (acides gras à courte chaîne). Il semblerait que le propionate est véhiculé *via* la veine porte vers le foie, où il régule la synthèse hépatique du cholestérol (Chen et al., 1984, Levrat et al., 1994).

Dans le cas d'une hypertriglycéridémie, les oligofructoses et l'inuline induisent une inactivation de toutes les activités enzymatiques lipogènes, diminuant ainsi la synthèse hépatiques *de novo* acides gras (Fiordaliso et al., 1995, Kok et al., 1996). Diverses fibres insolubles ou solubles ont la capacité de se lier avec les sels biliaires *in vitro* (Langkilde et al., 1993). Des augmentations de l'excrétion fécale des sels biliaires ont, en effet, été observées après l'ingestion de différents types de fibres.

D'autres prébiotiques pourraient aussi avoir des retombées positives sur la cholestérolémie chez l'homme ou l'animal. Ainsi, Andersson (1993) a rapporté que le mécanisme hypocholestérolémiant des pectines, diffère de celui de l'inuline et se traduit par une augmentation de l'excrétion fécale de cholestérol et de stérols.

### **I.8.2.3. Action des synbiotiques**

L'hypothèse que la consommation de laits fermentés enrichis en probiotiques puisse moduler le taux de cholestérol sanguin chez l'homme est toujours à l'étude. Par ailleurs et sur modèle animal, la fermentation des fructo-oligosaccharides par *Lactobacillus acidophilus* a provoqué une suppression de la synthèse des triglycérides et du cholestérol-VLDL au niveau du foie, aboutissant à une diminution marquée de la triglycéridémie, et dans une moindre mesure, de la cholestérolémie (Bengmark, 2000).

Chez le rat, l'administration du raffinose et de *Lactobacillus acidophilus* réduit significativement la triglycéridémie et résulte en une augmentation de la synthèse hépatique du cholestérol-HDL et du butyrate, l'acide gras à courte chaîne qui représente la source privilégiée (absorbé par le côlon) d'énergie nécessaire au renouvellement des cellules coliques (Tortuero et al., 1997). Le butyrate stimule également la prolifération des cellules épithéliales et favorise l'absorption du  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  (Delzenne et Roberfroid, 1994).

**Tableau 10 :** Sommaire de quelques études *in vivo* sur l'effet des fructo-oligosaccharides (FOS) sur le métabolisme lipidique (d'après Pereira et Gibson, 2002a).

Etudes	- Type de produit. - Dose (g/jour). - Période de prise.	Sujets	Le projet étudié	Taux de lipides sanguins
Yamashita et al. (1984)	Oligofructose 8 14	28 patients diabétiques non insulinodépendants.	En double aveugle	-8% CT -10% C- LDL = TG
Canzi et al. (1995)	Inuline 9 28	12 hommes normolipidiques (23 ans).	08 semaines consécutives (4-semaines placebo et 4 semaines- inuline)	-5% CT -27% TG
Jackson et al. (1999); Williams (1999)	Inuline 10 56	54 sujets présentant une Hyperlipidémie modérée (35 à 70 ans).	Randomisé en double aveugle contre placebo	= CT = C-LDL = C -HDL -19% TG
Causey et al. (2000)	Inuline 20 21	12 hommes présentant une Hyperlipidémie modérée (27 à 49 ans).	Randomisé en double aveugle sans vidange gastrique	= CT = C-LDL = C-HDL -14% TG

= : pas de changement.

CT: Cholestérol total ; C- LDL : cholestérol de type LDL, Low Density Lipoprotein ; C- HDL : cholestérol de type HDL, High Density Lipoprotein TG: triglycérides.

Les bactéries lactiques, une fois établies dans l'intestin, fermentent les hydrates de carbones indigestes en produisant les acides gras à courtes chaînes. Ces derniers diminuent le taux lipidique sanguin ; soit par l'inhibition de la synthèse hépatique de cholestérol, soit par la redistribution de celui-ci du plasma vers le foie (Pavlović et al., 2012).

La production des acides gras à courtes chaînes (AGCC) dans le côlon est de l'ordre de 100 à 450 mM/j et dont les proportions relatives à l'acétate, le propionate et le butyrate sont de l'ordre de 60, 20 et 15%, respectivement (St-Onge et al., 2000). En effet, la quantité produite en AGCC varie selon la nature du sucre indigeste (prébiotique), et est fonction du pouvoir fermentaire des souches probiotiques. L'acétate semble être hypercholestérolémiant et s'oppose à l'action du propionate qui est hypocholestérolémiant (St-Onge et al., 2000). Le propionate augmenterait également la concentration du cholestérol-HDL par action sur le facteur qui stimule la synthèse des apo-lipoprotéines (Schoonjans et al., 1996).

Chez le porc hypercholestérolémique, les combinaisons synbiotiques, constituées d'une souche probiotique de *L. acidophilus* et de FOS, d'inuline ou de mannitol, diminuent la triglycéridémie, la cholestérolémie et le taux de cholestérol-LDL (Liong et al., 2007).

#### **I.8.2.4. Action des hydrolysats protéiques du lait**

Des études *in vitro* récentes ont rapporté que des cultures de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb 12) pouvaient indisponibiliser 48% du cholestérol hydrosoluble rajouté dans le milieu de culture ; voire 87% si des hydrolysats de caséines bovines hydrolysées par la trypsine étaient rajoutés ; alors qu'une préparation témoin non inoculée additionnée de ces mêmes hydrolysats n'a eu aucun effet sur le cholestérol. De même, les fractions peptidiques individuelles séparées par chromatographie d'exclusion des hydrolysats de caséines formés par la trypsine réduisent la disponibilité du cholestérol de 2.7 à 50% (Alhaj et al., 2010).

Un certain nombre d'hypothèses ont été émises pour expliquer les effets hypocholestérolémiants des bactéries probiotiques et des peptides bioactifs issus de leurs activités protéolytiques. Selon Belitz et al. (2009), l'effet d'indisponibilisation du cholestérol par des hydrolysats de caséines tryptiques pourrait être dû à l'interaction des résidus de lysine et d'arginine avec le cholestérol. En effet, le contenu des résidus de ces deux acides aminés dans la caséine est approximativement de 12.3 mol%.

Sur le plan mécanistique, il a été suggéré que des liaisons hydrogène pourraient être établies entre les groupements hydroxyles de la molécule cholestérol et les groupements

guanidinium des résidus d'arginine (Li et al., 2001). Les mêmes ponts d'hydrogène peuvent être formés entre les groupes  $\epsilon$ -amino de la lysine et les groupements hydroxyles du cholestérol. Apparemment, l'arginine a le potentiel de former deux ponts d'hydrogène par chaîne.

La lysine, par sa part, ne peut former qu'un seul pont et sa liaison avec le cholestérol n'est de ce fait, pas aussi stable que celle formée par l'arginine. Sur le plan moléculaire, une séquence de reconnaissance et d'interaction (ATVLNYYVWRDNS) a été identifiée dans les liaisons cholestérol - résidus d'acides aminés arginine, tyrosine, valine ou leucine (Li et al., 2001).

*In vivo*, Nagaoka et al. (2001) a supposé que les hydrolysats trypsiques de la  $\beta$ -lactoglobuline sont considérées hypocholestérolimians chez le rat par diminution de la solubilité des micelles de cholestérol, le rendant ainsi moins réabsorbé.

Il a été aussi démontré que les caséines et les hydrolysats de lait caillé ont un potentiel de réduire le cholestérol sérique chez le rat. En effet, une consommation modérée de 80 g/j de lait caillé peut favoriser la réduction du taux de cholestérol. L'effet hypocholestérolémiant pourrait être attribué à l'action des bactéries présentes dans le lait fermenté, productrices d'acides gras à courtes chaînes (l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique) (Athiththan et al., 2009).

Le calcium alimentaire, dont les laits fermentés et les fromages en constituent une source d'excellence, pourrait avoir un effet séquestrant des acides biliaires et donc, possédant un probable pouvoir hypocholestérolémiant (Ma et al., 2011).

Le lait et certains produits laitiers fermentés par les souches *Bifidobacterium* sp et *Lactobacillus* sp ont été trouvés capables de faire diminuer la cholestérolémie par le biais d'un ou de plusieurs mécanismes à la fois. Afin de mieux comprendre l'effet réducteur de cholestérol par les aliments fonctionnels, il est primordial d'identifier les agents actifs en premier, puis de comprendre leurs mécanismes d'action biochimique, souvent associés (Chen et al., 2011).

## **I.9. Conclusion**

La brève étude bibliographique présentée dans ce chapitre montre clairement la diversité des paramètres relatifs à l'action bactérienne régulatrice du taux de cholestérol et

dont certains sont même capables d'agir en synergie. Ainsi, l'action régulatrice est très difficilement attribuable à un seul facteur et, de ce fait, le pouvoir assimilateur de cholestérol chez les bactéries lactiques devrait être étudié plutôt en conditions uniques à un seul paramètre tout en veillant qu'elles soient dépourvues des autres.

Par ailleurs, la survie du probiotique est un critère obligatoire dont il faut s'assurer pour espérer un effet sur la santé de l'hôte. L'encapsulation aux sels d'alginate a fait ses progrès dans ses utilisations sur une panoplie de souches probiotiques. Ces biogels sont jusqu'à maintenant réputés être les meilleurs tant sur le plan de leur innocuité, et leur efficacité d'utilisation. L'association d'autres matrices alimentaires aux alginates serait susceptible de renforcer l'effet protecteur recherché pour préserver la survie de la bactérie probiotique non seulement dans son aliment véhicule conservé pendant plusieurs semaines, mais aussi dans le tube digestif de l'hôte.

Le lait fermenté est de loin le meilleur aliment véhicule des probiotiques. Cette matrice alimentaire complexe a prouvé aussi ses qualités hypocholestérolémiantes, il y a très longtemps (Chen et al., 2011). Toutefois, les mécanismes avec lesquels le lait fermenté bénéficie de cette image d'« alicament » contre des maladies chroniques lipidiques (Ma et al., 2011) ne sont pas encore clairement établis.

Nous retenons également que l'association de prébiotique et de probiotiques (synbiotiques) procure de multiples effets sur la santé. L'effet résultant sur le métabolisme bactérien du cholestérol est l'un de ces multiples effets dont l'exploration suscite de l'intérêt. Si l'action de prébiotique résultant de l'inuline et des fructo-oligosaccharides est bien établie dans la littérature, il y'a, en revanche, celle de nombreux autres glucides indigestes à tester.

A l'instar de l'action hypocholestérolémiante des peptides bioactifs du lait largement relatée dans la littérature, celle des hydrolysats des caséines du lait issus spécifiquement de l'action des probiotiques est une nouvelle piste convergente vers cette action mais qui n'a pas encore révélé tous ses secrets car très peu étudiée jusqu'à présent. C'est pourquoi l'exploration de cette piste en utilisant de nouvelles souches lactiques candidates au statut probiotique pourrait apporter du nouveau en matière du pouvoir des bactéries à réduire le taux de cholestérol chez l'hôte.

Pour ce qui est de l'action des CLA produits par les probiotiques sur le cholestérol, les recherches réalisées jusqu'à maintenant restent très timides et les difficultés de reproduire et

de conserver l'effet positif sur les modèles animaux les plus proches -sur le plan énergétique- de l'homme, consisteraient les principales entraves dans la prononciation « précoce » d'une allégation santé spécifique en tant que bio-outils de lutte contre l'hypercholestérolémie.

Cela ne diminue guère l'utilité de multiplier les études préliminaires *in vitro* dans le but de choisir les souches les plus potentiellement définies productrices de CLA sur milieux synthétiques ou lait. Ceci pourrait aussi être considéré désormais comme le début de la définition de « l'ère des probiotiques », les meilleurs outils biologiques à effet polyvalent sur la santé du consommateur.

# **CHAPITRE II :**

**Pouvoir d'assimilation de cholestérol  
chez quatre souches lactiques.**

## **CHAPITRE II :**

### **Pouvoir d'assimilation de cholestérol chez quatre souches lactiques.**

#### **II.1. Introduction**

Dans ce premier chapitre expérimental, nous allons explorer le pouvoir d'assimilation bactérienne de cholestérol et nous utilisons quatre souches lactiques à cet effet.

Comme nous l'avons bien souligné dans la partie théorique, plusieurs mécanismes d'action ont été décrits comme impliqués dans l'indisponibilisation du cholestérol par les bactéries probiotiques ; en l'occurrence l'assimilation du cholestérol par les cellules bactériennes lors de leur croissance (Pereira et Gibson, 2002b), sa fixation à la surface cellulaire (Noh et al., 1997), l'incorporation de la molécule de cholestérol dans la membrane cellulaire (Kimoto et al., 2002), par déconjugaison des sels biliaires (Kurdi et al., 2003), par co-précipitation du cholestérol avec les acides biliaires déconjugés en présence des fibres (Marlett, 1997), par production des acides gras à courte chaîne en fermentant les oligosaccharides (Hara et al., 1994) ou encore par la conversion du cholestérol en coprostanol (Gérard et al., 2007; Lye et al., 2010b).

Pereira et Gibson (2002b) ont établi une formule permettant de calculer spécifiquement la quantité de cholestérol assimilé, tout en prenant en considération la quantité de cholestérol restante dans le milieu de culture et celle indisponibilisée dans les lots témoins. La mesure était considérée comme une assimilation car cette activité bactérienne est quantifiée par rapport au poids sec du culot bactérien ayant séjourné en présence de cholestérol. Cette formule a efficacement été utilisée par plusieurs auteurs (Alhaj et al., 2010 ; Lye et al., 2010a et b ; Lye et al., 2012...) dans l'estimation du pouvoir d'assimilation de cholestérol chez des souches à statut probiotique.

#### **II.2. Matériels et Méthodes**

##### **II.2.1. Matériels**

###### **II.2.1.1. Souches utilisées**

- *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus*: ferment lactique LB 340, levain concentré lyophilisé pour ensemencement direct (Danisco, Sassenage, France).

- *Streptococcus thermophilus*: ferment lactique TA 040, levain concentré lyophilisé pour ensemencement direct (Danisco, Sassenage, France).

Les deux souches ont été décrites comme ayant des bénéfices santé (tableau 11).

-. *Lactobacillus rhamnosus*: il s'agit d'une souche expérimentale notée LBRE-LSAS provenant de la collection du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS, Université de Mostaganem) où elle a été isolée à partir de selles de bébés sains et ne recevant aucune antibiothérapie, nourris exclusivement au sein et âgés de 2 à 3 semaines. La souche a été caractérisée génétiquement (séquençage 16S RNA) au Laboratoire de sécurité alimentaire par les bactéries lactiques et les probiotiques (Madrid, Espagne).

- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*: souche probiotique de référence, connue commercialement sous la désignation Bb-12 (Chr. Hansen, Hørsholm, Danemark).

Les cultures ont été maintenues vivantes à  $-70^{\circ}\text{C}$  dans des cryotubes (Pro-Lab Diagnostics, UK). 72 heures avant le début de chaque expérience, les cultures sont revivifiées dans leur milieu approprié (Merck, MRS pour LB340, MRS-Cystéiné pour LBRE-LSAS et Bb12 et M17 pour TA040) par une série de trois transferts successifs. Chaque réactivation était réalisée à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 h sous conditions d'aérobiose (LB340 et TA040) ou d'anaérobiose (LBRE-LSAS et Bb12, Jarre d'anaérobiose + Anaérocult A) selon les exigences de la souche considérée.

Dans toutes les expériences, les cultures étaient ensemencées en phase exponentielle de croissance (18 h) à une densité cellulaire de l'ordre de  $5 \cdot 10^6$  à  $10^7$  UFC.  $\text{mL}^{-1}$ .

### **II.2.1.2. Les sels biliaires et le cholestérol**

La bile utilisée est une mixture de sels biliaires d'origine bovine (Merck, Allemagne). Le cholestérol utilisé est le « polyoxyéthanyl-cholesteryl sébacate » qui est une forme hydrosoluble (Sigma, France) pour culture.

### **II.2.1.3. Les milieux de culture**

- Bouillon MRS : le bouillon MRS (De Man, Rogosa et Sharpe (De Man et al., 1960), (Merck, VM10661) a été utilisé pour la réactivation de la souche LB340.

**Tableau 11:** Caractéristiques des souches bactériennes utilisées dans cette étude (Wang et al., 2005; Foligne et al., 2007).

Caractéristiques	<i>L. rhamnosus</i> LBRE-LSAS	<i>B. lactis</i> Bb12	<i>S. thermophilus</i> TA 040	<i>L. bulgaricus</i> LB 340
Croissance à				
15–45 (°C)	+/+	+/+	-/+	-/+
Fermentation du lactose	+	+	+	+
Tolérance à l'acidité	**	****	*	–
Tolérance à la bile	**	****	****	–
Tolérance aux enzymes digestives	**	***	–	–
Production d'exopolysaccharides	–	–	*	–
Adhésion à la muqueuse intestinale	HT29 **** Caco-2****	HT29 **** Caco-2****	HT29 *** Caco-2****	HT29 * Caco-2 *
Effets santé	Inhibe la plupart des bactéries responsables de toxi-infections: adhère à la muqueuse intestinale et réduit chez la souris l'incidence des symptômes liés à <i>Shigella dysenteriae</i> (Riazi et al., 2009, communication personnelle).	Diminue les fréquences des diarrhées de voyageurs causées par les rotavirus; effet inhibiteur vis-à-vis d' <i>Helicobacter pylori</i> .	Augmentation de l'induction de IL-10 ( <i>in-vitro</i> ).	Colonise le côlon et améliore l'imperméabilité de la barrière intestinale aux pathogènes. Aide dans l'abaissement des allergies dues aux aliments.

- Bouillon M17 : le bouillon M17 (Terzaghi et Sandine, 1975), (Merck) est utilisé pour la réactivation de la souche TA 040.
- MRS-cystéiné (MRS-C): c'est le milieu MRS additionné de L-chlorhydrate de cystéine à 0.05% (Dave et Shah, 1996) utilisé pour la réactivation des souches LBRE-LSAS et Bb12.
- Bouillon MRS au thioglycollate de sodium (MRS-THIO) : c'est le MRS additionné de thioglycollate de sodium (Sigma, France) à la concentration de 2% (p/v) qui a été utilisé comme milieu réactionnel. Dans cette étude, les deux milieux MRS-THIO avec (MRS-THIO+G, 20 g.L<sup>-1</sup>) ou sans (MRS-THIO-G) glucose ont été utilisés dans la mesure du pouvoir d'assimilation de cholestérol.

## II.2.2. Méthodes

### II.2.2.1. Manipulations pré-culturelles

Avant de procéder aux cultures, la pureté et l'identité des souches bactériennes ont été vérifiées par les méthodes morphologiques et biochimiques usuelles. L'ajustement de la concentration cellulaire de l'inoculum a été effectué à l'aide d'une cellule de Thoma. La formule de dénombrement est la suivante :

$$X = 4 \cdot 10^6 \cdot n$$

Où: X: nombre de cellules dans 1 mL de suspension bactérienne.  
n : nombre de cellules dénombrées dans un carré.

### II.2.2.2. Détermination du taux d'assimilation de cholestérol

Le taux d'assimilation *in vitro* de cholestérol par les souches bactériennes a été déterminé selon le protocole de Danielson et al. (1989) et modifié par Pereira et Gibson (2002b).

- Le MRS-THIO (contenant 2% thioglycollate de sodium) est additionné de 65 – 85 µg mL<sup>-1</sup> de cholestérol hydrosoluble (concentration finale fonction de sa solubilité) stérilisé par filtration sur une membrane millipore (0.22 µm).
- Ajouter la bile à une concentration finale de 0.3% (p/v) (Gilliland et al., 1984).
- Ajouter à chaque tube 1% d'inoculum d'une culture bactérienne jeune de 18 h.

- Incuber les tubes à 37°C pendant 24 et 48 h en anaérobiose (jarre d'anaérobiose avec système générateur de CO<sub>2</sub>, Anaérocult).
- Centrifuger les cultures après 24 ou 48 h d'incubation (2000 × g / 10 min à 4°C).
- Séparer les surnageants, prendre les culots lavés à l'eau distillée stérile et faire leur dessiccation à 80°C jusqu'à l'obtention d'un poids stable.
- La quantité de cholestérol restante dans le bouillon MRS a été déterminée par méthode enzymatique (kit enzymatique commercial bioMerieux Corporation, Marcy l'Etoile, France), après son extraction au chloroforme (chloroforme-eau, 1v/1v), à 505 nm à l'aide de spectrophotomètre (OPTIZEN MECASYS 7, Daejeon, Corée de Sud).
- Les cultures témoins (milieux non inoculé par la culture microbienne et inoculé mais non incubé) doivent aussi être soumises aux mêmes conditions de l'expérience.

Les souches bactériennes sont comparées entre-elles selon leur pouvoir d'assimilation de cholestérol, exprimé par leur pouvoir spécifique d'épuiser le cholestérol du milieu de culture après une incubation de 24 ou 48 h et qui est calculé selon la formule proposée par Pereira et Gibson (2002b)

$$\text{Cholestérol (mg. g}^{-1}\text{)} = [ B - T ] / W$$

Où :

B : La quantité de cholestérol dans le milieu témoin en mg.

T : La quantité de cholestérol dans le milieu de culture en mg.

W : Le poids sec des cellules après 24 ou 48 h d'incubation en g.

### **II.2.2.3. Traitement statistique des résultats**

Le traitement statistique des résultats obtenus est réalisé par l'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le logiciel STATISTICA (data analysis software system, version 8.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA, 2008). La différence est considérée significative à  $P < 0.05$ .

La comparaison de moyennes a été réalisée par le test de Tukey. Tous les résultats représentent les moyennes issues de trois expériences indépendantes (n=9).

## **II.3. Résultats et discussion**

Les résultats relatifs au pouvoir d'assimilation de cholestérol chez les quatre souches lactiques étudiées *L. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. lactis* Bb12, *L. bulgaricus* LB340 et

*S. thermophilus* TA040 sur milieu MRS-THIO additionné de 0.3% de sels biliaries sont illustrés dans les figures 10 et 11. Les valeurs obtenues sont exprimées en mg de cholestérol assimilé par g de cellules sèches.

Une variation très importante ( $P < 0.05$ ) a été observée entre les différentes souches dans leur pouvoir à assimiler en anaérobiose le cholestérol en présence de 0.3% de bile et en absence de glucose. Après 24 heures d'incubation (fig.10) sur milieu MRS-THIO-G, le cholestérol a été assimilé par toutes les cultures bactériennes testées. *S. thermophilus* et *B. lactis* ont affichés les valeurs les plus élevées ( $P < 0.05$ ) de l'ordre de 8.67 et 4.32 mg.g<sup>-1</sup>, respectivement, suivies de *L. bulgaricus* et *L. rhamnosus* dont les valeurs affichées respectives étaient de l'ordre de 3.47 et 2.31 mg.g<sup>-1</sup>.

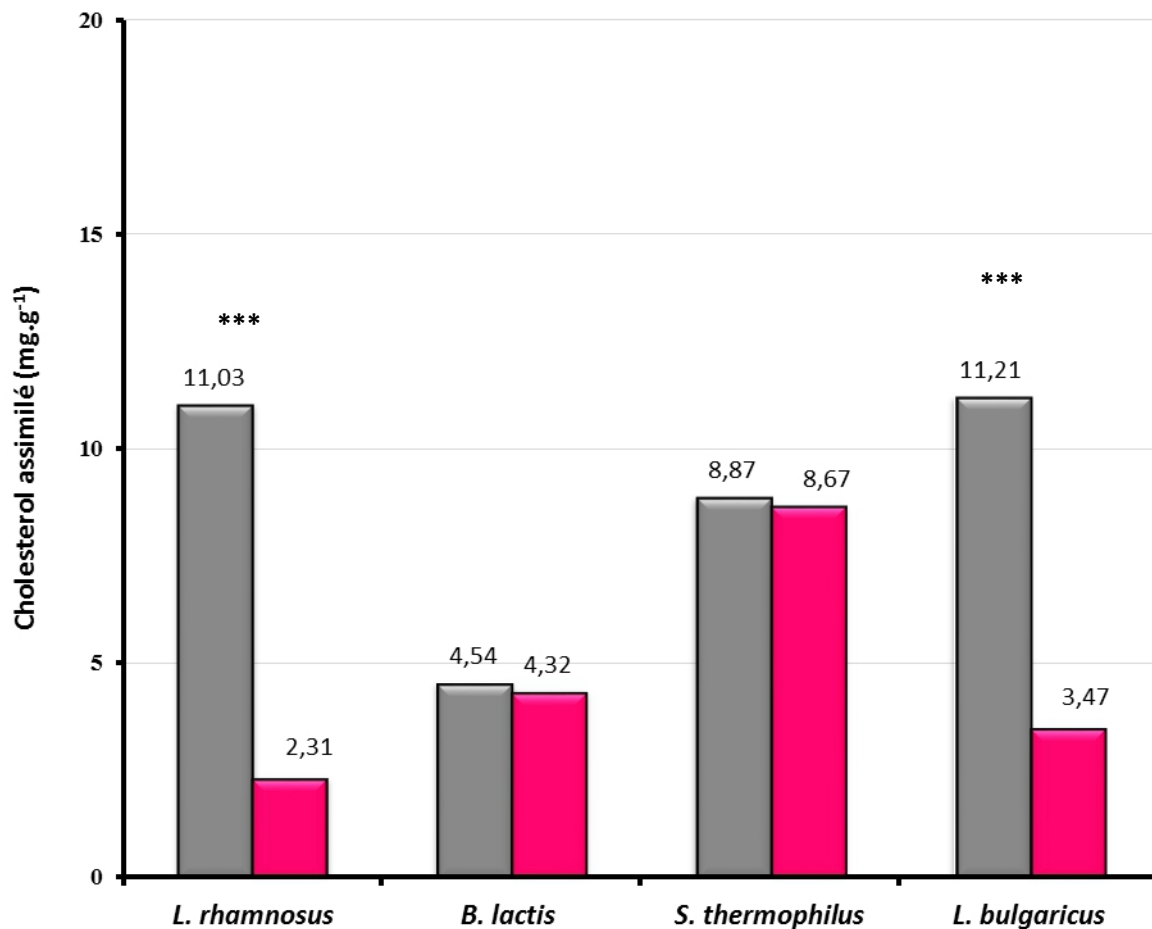
Cette aptitude à assimiler le cholestérol diminue significativement ( $P < 0.05$ ) sur ce même milieu (MRS-THIO-G) chez toutes les souches lorsque l'incubation est prolongée à 48 h (fig.11). Ainsi cette diminution est de l'ordre de 52.81% chez *S. thermophilus*, 87.27% chez *L. rhamnosus*, 90.77% chez *B. lactis* et de 89.33% chez *L. bulgaricus*. Les quantités de cholestérol assimilés respectives étaient de l'ordre de 1.8, 1.03, 0.55 et 0.37 mg.g<sup>-1</sup>.

L'inaptitude des souches bactériennes testées à assimiler davantage de cholestérol pourrait être attribuée à l'absence de source glucidique (milieu MRS-THIO-G dépourvu de glucose) qui empêcherait toute croissance active. Le milieu MRS-THIO-G était préparé sans l'addition de glucose, la source énergétique universelle pour la plupart des microorganismes par excellence (Corcoran et al., 2004).

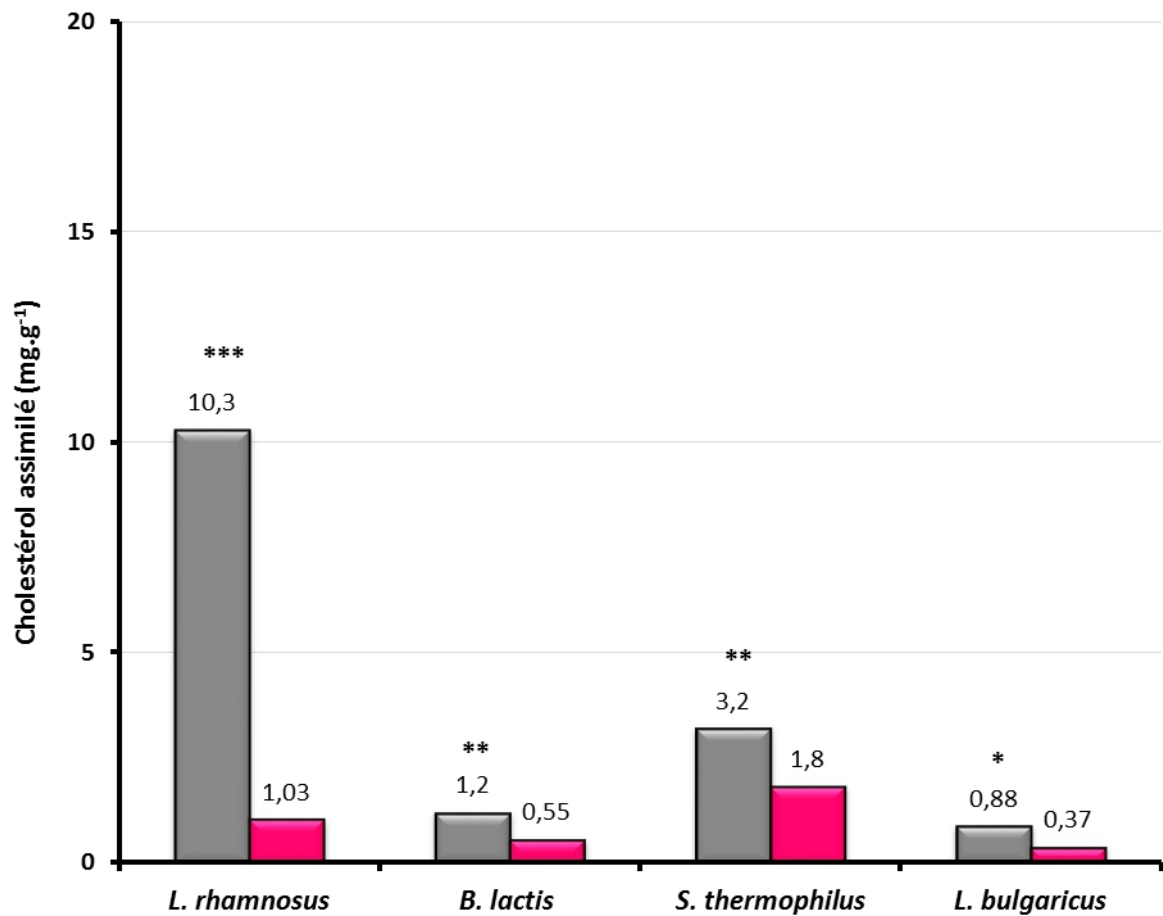
Il est admis que le pouvoir d'assimilation de cholestérol est corrélé avec la phase de croissance bactérienne active (Gilliland et al., 1984 ; Pereira et Gibson, 2002b).

En plus de cette assimilation de cholestérol au cours de la vie exponentielle des cellules, il y a une autre possibilité de diminution du cholestérol du milieu de culture par son indisponibilisation *via* adsorption (interaction de surfaces) sur les résines formées par les acides aminés de la paroi des cellules mortes (Liong et Shah, 2005a ; Kimoto-Nira et al., 2007).

Toutefois, même si les cellules probiotiques mortes pourraient conserver à un certain degré une caractéristique bénéfique sur la santé, la viabilité bactérienne demeure une condition incontournable dans l'attribution du statut probiotique (AFSSA, 2003). C'est pourquoi d'ailleurs, peu de travaux se sont intéressés à estimer le pouvoir d'assimilation de cholestérol chez des cellules probiotiques mortes (Liong et Shah, 2005a et b).



**Figure 10:** Cholestérol assimilé (en  $\text{mg.g}^{-1}$  de cellules sèches) par *L. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. lactis* Bb12, *S. thermophilus* TA 040 et *L. bulgaricus* LB340 cultivées **24** h en présence de bile (0.3%, p/v) soit sur le milieu MRS glucosé (**MRS-THIO+G**, 2% p/v) (■) soit sur le milieu MRS sans glucose (**MRS-THIO-G**) (■). L'inoculum est de  $5 \cdot 10^6$  à  $10^7$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  et est utilisé à 1% provenant d'une culture jeune (18 h). Le cholestérol a été ajouté à une concentration finale de 65- 85  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$  et \*\*\* :  $P < 0.001$ . Les comparaisons sont faites en comparant les résultats du milieu MRS-THIO+G à ceux de MRS-THIO-G.



**Figure 11:** Cholestérol assimilé (en  $\text{mg.g}^{-1}$  de cellules sèches) par *L. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. lactis* Bb12, *S. thermophilus* TA 040 et *L. bulgaricus* LB340 cultivées 48 h en présence de bile (0.3%, p/v) soit sur le milieu MRS glucosé (MRS-THIO+G, 2% p/v) (■) soit sur le milieu MRS sans glucose (MRS-THIO-G) (■). L'inoculum est de  $5 \cdot 10^6$  à  $10^7$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  et est utilisé à 1% provenant d'une culture jeune (18 h). Le cholestérol a été ajouté à une concentration finale de 65- 85  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$  et \*\*\* :  $P < 0.001$ . Les comparaisons sont faites en comparant les résultats du milieu MRS-THIO+G à ceux de MRS-THIO-G.

Les quantités de cholestérol indisponibilisé par *S. thermophilus* et *B. lactis* sont relativement élevées par rapport à celles notées chez les autres souches ; ce qui pourrait être lié à l'expression de l'activité protéolytique de ces souches en l'absence de source glucidique. Il faudrait ajouter à cela la faible croissance des streptocoques sur milieu à base de glucose (Giraffa et al., 2001 ; Riazi et Ziar, 2008).

Cette hypothèse semble se vérifier selon les résultats obtenus dans ce travail avec le milieu MRS glucosé (MRS-THIO+G) (fig. 10 et 11) après 24 h d'incubation, où les deux souches démontraient des pouvoirs d'assimilation de cholestérol (8.87 et 4.54 mg.g<sup>-1</sup>, notés respectivement chez *S. thermophilus* et *B. lactis*) qui ne diffèrent guère ( $P > 0.05$ ) de ceux obtenus en l'absence de glucose dans le milieu. Ces résultats pourraient être interprétés comme une conséquence de l'effet stimulant de la bile sur l'activité protéolytique, qui elle-même, serait une réaction de la cellule bactérienne à son effet toxique ; ce dernier est variable selon la souche, la source de carbone ou d'azote présente dans le milieu (Patel et al., 2004).

Contrairement à ces deux souches protéolytiques, les lactobacilli *L. rhamnosus* et *L. bulgaricus* assimilent plus de cholestérol en présence de glucose dans le milieu MRS après 24 h d'incubation, soient 11.03 ( $P < 0.05$ ) et 11.21 ( $P < 0.05$ ) mg.g<sup>-1</sup>, respectivement.

Plusieurs auteurs ont signalé le pouvoir élevé des souches appartenant au genre de *Lactobacillus* sp (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*...) à assimiler le cholestérol *in vitro* et *in vivo* (Chiu et al., 2006 ; Ziarno, 2007 et Kumar et al., 2013 sous presse) et c'est peut-être la raison pour laquelle, une des perspectives thérapeutiques modernes de l'hypercholestérolémie serait l'utilisation d'aliments nutraceutiques contenant les lactobacilles (Lye et al., 2012).

Dans ce travail, la prolongation de la durée d'incubation à 48 h induit une diminution ( $P < 0.05$ ) dans ce pouvoir d'assimilation de cholestérol chez toutes les souches étudiées, 10.3 ( $P > 0.05$ ), 1.2, 3.2 et 0.88 mg.g<sup>-1</sup>, notés respectivement chez *L. rhamnosus*, *B. lactis*, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*. Ces valeurs représentent des diminutions respectives de l'ordre de 6.61, 73.56, 63.92 et 92.14% dans les pouvoirs bactériens initiaux (24 h) et assimilateurs de cholestérol. Ceci a été aussi confirmé par les allures décroissantes des surfaces traduisant la réponse au facteur temps, tel qu'il est illustré dans la figure 12.

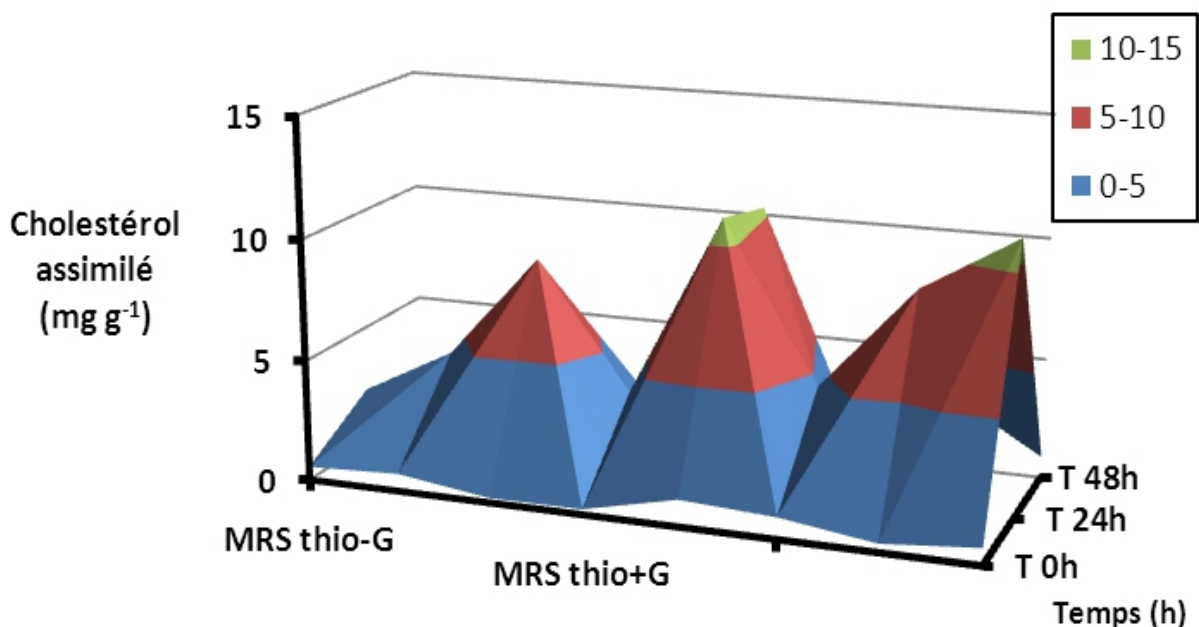
Il est important de noter que la variabilité d'expression bactérienne en termes d'assimilation de cholestérol chez les quatre bactéries lactiques, et plus particulièrement chez les deux lactobacilles, pourrait être reliée plutôt à la souche bactérienne elle-même. Ainsi, il s'avère que la composition de peptidoglycane en acide lipoteïchoïque, en acide aminé D-alanine et

en D-glucose, conditionnerait l'activité biologique des bactéries. De plus, la nature de l'acide lipoteïchoïque est récemment trouvée souche-dépendante (Lebeer et al., 2012).

Sachant que les lactobacilles assimilent principalement le cholestérol par incorporation dans la membrane cellulaire (Lye et al., 2010b), nous suggérons une particularité souche-dépendante chez les deux lactobacilles dans l'expression de leur pouvoir assimilateur de cholestérol.

D'une manière générale, toutes les souches assimilent moins de cholestérol si leur culture est augmentée à 48 h et ceci est valable dans le MRS-THIO avec ou sans glucose (fig. 12).

Ces observations laissent aussi penser que c'est au cours de la vie exponentielle que les bactéries assimilent le plus le cholestérol. Un tel constat a été rapporté par la majorité des études réalisées dans ce sens (Gilliland et al., 1984 ; Noh et al., 1997 ; Pereira et Gibson, 2002b). Par ailleurs, la formule donnée par Pereira et Gibson (2002b) reflète le pouvoir d'assimilation de cholestérol considéré dans le poids du culot bactérien ayant séjourné en présence de cholestérol, ceci pourrait être estimé, selon notre point de vue, comme étant le cholestérol assimilé (ou incorporé dans la membrane cellulaire) et le cholestérol indisponibilisé par adsorption sur la paroi cellulaire.



**Figure 12** : Pouvoir d'assimilation de cholestérol des souches lactiques cultivées 48 h dans le milieu MRS-THIO (2% thioglycollate de sodium) avec ou sans glucose.

En présence d'agents toxiques (i.e., bile) qui altèrent la perméabilité cellulaire, les molécules amphipathiques comme le cholestérol pourraient être incorporées dans la membrane où elles sont utilisées dans la synthèse des phospholipides ; ou bien également des phospho-glycérolipides accumulés à l'intérieur de la cellule bactérienne (Denich et al., 2003). Le cholestérol a une structure tridimensionnelle plane qui lui permet une interaction hydrophobe très favorable avec les phospholipides au sein de la bicouche lipidique membranaire. D'ailleurs, c'est cette caractéristique qui lui confère la majorité de ses fonctions biologiques (Tabas, 2002).

#### **II.4. Conclusion**

Nous considérons que l'assimilation du cholestérol par incorporation et adsorption dans la paroi des bactéries lactiques constituent des voies d'indisponibilisation de cette molécule chez l'hôte et qui pourraient contribuer vraisemblablement à la réduction de sa cholestérolémie. Cette activité bactérienne d'indisponibilisation de cholestérol présente une grande variabilité inter-souches et demeure intrinsèque à la souche considérée.

Les résultats de cette expérience ont montré aussi que les souches starters de yaourt assimilent plus de cholestérol que la souche à statut probiotique avéré (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12).

En outre, les différents comportements bactériens observés dans les deux milieux MRS-THIO avec ou sans glucose, laissent apparaître que les sources glucidiques ou azotées seraient les clefs dans la modulation sélective de l'expression bactérienne en présence de la bile qui, bien que toxique, est indispensable à l'établissement du pouvoir d'assimilation de cholestérol chez les bactéries. Par ailleurs, la viabilité de la bactérie est une condition primordiale dans l'efficacité de cette action bactérienne d'assimilation de cholestérol.

# **CHAPITRE III :**

**Effets du polysorbate 80 « E 433 »**

**sur la survie des starters**

**du yaourt exposés aux conditions**

**digestives simulées.**

## CHAPITRE III :

### Effets du polysorbate 80 « E 433 » sur la survie des starters du yaourt exposés aux conditions digestives simulées.

#### III.1. Introduction

La majorité des bactéries sont naturellement peu ou pas tolérantes à l'acidité et/ou à la bile. Si la plupart des études se sont focalisées sur l'amélioration de la survie de *L. acidophilus* ou de souches du genre *Bifidobacterium* sp, très peu de travaux se sont intéressés à la survie des starters du yaourt au cours du transit intestinal. De nombreux chercheurs soulignent l'incapacité des starters de yaourt à survivre au cours de ce transit et que leur origine non intestinale est y la cause principale (Morelli, 2000; Chou et Weimer, 1999). Par opposition, Elli et al. (2006) et García-Albiach et al. (2008) avaient confirmé que les bactéries du yaourt, particulièrement *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, étaient retrouvées dans les selles de sujets sains après une courte période d'administration.

Même si les souches starters ne sont pas les seules qui présentent cet inconvénient (Morelli, 2000), il serait intéressant de proposer de nouvelles approches protectrices des souches à effets positifs sur la santé. Dans le présent chapitre, nous nous sommes intéressés à l'amélioration de la de survie de deux souches lactiques, starters du yaourt : *Streptococcus thermophilus* TA 040 et *Lactobacillus bulgaricus* LB 340, aux conditions digestives simulées. Pour ce faire, nous avons choisi d'ajouter l'additif alimentaire E 433 « le polysorbate 80 », appelé aussi communément tween 80, parce qu'il constitue une bonne source d'acide oléique, acide gras rapporté comme susceptible de protéger les lactobacilles des effets néfastes de conditions de culture défavorables (Ananta et al., 2004). Ainsi, les principaux objectifs ciblés dans ce chapitre sont:

- ⇒ Les effets du polysorbate 80 sur l'expression de l'activité enzymatique Bile Salt Hydrolase (BSH) des souches starters du yaourt.
- ⇒ L'évaluation de la résistance des souches lactiques au pH acide, aux sels biliaires ou à l'acide cholique en absence et en présence de polysorbate 80.
- ⇒ La mise en évidence des changements induits par le polysorbate 80 dans la fraction lipidique cellulaire en liaison avec la présence de la bile dans le milieu de culture.

## III.2. Matériels et Méthodes

### III.2.1. Matériels

#### III.2.1.1. Souches utilisées

Les starters du yaourt *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB 340 et *Streptococcus thermophilus* TA 040 ont été fournies par la firme *Danisco* (France). Dans tout le chapitre, les désignations Lb et St seront utilisées pour se référer respectivement à *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*.

Les cultures ont été maintenues vivantes à -70°C dans des cryotubes (Pro-Lab Diagnostics, UK), réactivées par 1% d'inoculum dans le milieu approprié (Merck, MRS pour Lb et M17 pour St) dans une série de trois transferts successifs. Chaque réactivation était réalisée à 37°C pendant 24 h sous conditions d'aérobiose. Dans toutes les expériences, les cultures étaient ensemencées en phase exponentielle de croissance (18 h) à une densité cellulaire de l'ordre de  $5 \cdot 10^6$  à  $10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup>, sauf indication particulière.

#### III.2.1.2. Polysorbate 80

L'émulsifiant, le polysorbate 80 (Monooléate de sorbitane polyoxyéthylène 80, E433, A and Z Food Additives Co., Ltd. Chine), nous a été aimablement fourni par la firme *Danisco* (Alger, Algérie) et a été utilisé à une seule concentration finale de 1% (p/v) dans toutes les expériences réalisées.

### III.2.2. Méthodes

#### III.2.2.1. Détermination de l'activité enzymatique BSH en présence de polysorbate 80

Le protocole de Du Toit et al. (1998) a été suivi dans l'estimation de l'activité enzymatique Bile Salt Hydrolase, et qui consistait à :

- Imprégner pendant une nuit des disques stériles de papier filtre (1cm de diamètre) dans une culture jeune (18 à 24 h) de la souche à tester.
- Liquéfier les milieux gélosés *Streptococcus Thermophilus* agar (ST-agar pour St) ou MRS-agar (pour Lb) et ajouter à chaque milieu la bile ou l'acide cholique (Sigma, France) stérile (0.3% p/v) et 1% (p/v) polysorbate 80.
- Ajouter à chaque flacon de CaCl<sub>2</sub> à 0.37% (p/v) (Merck).

- Placer les disques ayant séjournés dans les cultures bactériennes sur la surface des milieux MRS ou ST, mis en boîtes de Pétri.
- Les boîtes contenant le MRS ou le ST-agar non additionnés de sels biliaires ou d'acide cholique avec ou sans l'ajout de 1% de polysorbate 80 sont considérées comme témoins.
- Incuber en anaérobiose à 37°C pendant 72 h.
- Mesurer le diamètre de la zone de précipitation.
- Chaque souche était testée trois fois.

### III.2.2.2. Tolérance des souches lactiques au pH acide (2.5) en présence ou en l'absence de polysorbate 80

- 25 mL de MRS (sans tween 80) ou M17 des cultures de 18 h obtenues par ensemencement à 1% (v/v) sont centrifugés à  $7000 \times g$  à 4°C pendant 15 min, rincées avec un volume équivalent d'une solution froide de Ringer et récentrifugées ( $7000 \times g$  à 4°C pendant 15 min).
- Résuspendre les culots obtenus dans des volumes équivalents de MRS ou M17 contenant (échantillon) ou non (témoin) 1% de polysorbate 80 et préalablement ajustés à pH 2.5 avec du HCl 1N.
- Les mélanges réactionnels ont été incubés en anaérobiose à 37°C pendant 120 min sous agitation modérée.
- Prélever 1 mL de chaque échantillon bactérien à des intervalles de temps de 0, 15, 30, 45, 60 et 120 min pour déterminer la survie bactérienne par étalement sur milieu de culture adéquat. Les milieux MRS-agar acidifié à pH 5.4 (MRS-ac-agar) et M17-agar (Merck), ont été utilisés pour le dénombrement des lactobacilli et des streptococci, respectivement. Les boîtes étalées ont été incubées à 37°C pendant 48-72 h sous conditions d'anaérobiose (Ashraf et Shah, 2011).

La tolérance de la culture associée (Lb+St), en présence (échantillon) ou en l'absence (témoin) de polysorbate 80, a aussi été étudiée selon ce même protocole (Pereira et Gibson, 2002b) avec les légères modifications suivantes :

- L'inoculum mixte consistait en un mélange de 1% comprenant les deux souches lactiques en rapports cellulaires similaires (1 : 1) comme cela a été décrit dans nos travaux antérieurs (Ziar, 2007).
- Les milieux MRS-agar acidifié (pH 5.4, MRS-ac agar) et *Streptococcus Thermophilus*-agar ont été utilisés pour le dénombrement des lactobacilli et des streptococci,

respectivement. Les boîtes étalées étaient incubées à 37°C pendant 24 - 48 h sous conditions d'aérobiose (Ashraf et Shah, 2011).

### III.2.2.3. Exploration de l'effet du polysorbate 80 sur la tolérance bactérienne vis-à-vis de la bile ou de l'acide cholique.

Cette manipulation a été conduite selon le protocole de Kimoto et al. (2000). Les bouillons utilisés étaient M17 et ST pour « St » et MRS modifié pour « Lb ».

- Les milieux ST, M17 (5 g. L<sup>-1</sup> lactose) et MRS modifié (3 g. L<sup>-1</sup> glucose, sans tween 80) préparés et stérilisés par autoclavage (121°C/15 min) ont été répartis dans des tubes à raison de 5 mL.
- La bile à une concentration finale de 0.3% (v/v) et le polysorbate 80 à une concentration finale de 1% (p/v) ont été ajoutés aux bouillons. Le pH de tous les milieux a été ajusté à 6.8.
- Chaque bouillon (5 mL) étaitensemencé par une culture jeune de 24 h à raison de 0.05 mL de souche (concentration finale de 5. 10<sup>6</sup> à 10<sup>7</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>) à tester et incubé à 37°C pour imiter les conditions de l'intestin, bien que la température optimale des souches lactiques soit de 42°C.
- Après 24 h d'incubation, la croissance bactérienne en présence et en absence de polysorbate 80 était estimée (log UFC. mL<sup>-1</sup>) par étalement sur milieu de culture adéquat. Les milieux MRS-agar acidifié à pH 5.4 (MRS-ac-agar) et M17-agar (Merck), ont été utilisés pour le dénombrement des lactobacilli et des streptococci, respectivement. Les boîtes étalées ont été incubées à 37°C pendant 48-72 h sous conditions d'anaérobiose (Ashraf et Shah, 2011).

Dans une autre expérience, la bile était remplacée par l'acide cholique et le même protocole a été reproduit avec la modification suivante :

- Selon les recommandations de Walker et Gilliland (1993), l'acide cholique à la concentration finale de 0.3% (p/v) était dissout dans une solution tamponnée de phosphate de sodium à 0.1 M, pH 7.5 (afin d'éviter la diminution du pH).
- Les témoins étaient les mêmes préparations avec la bile ou l'acide cholique mais sans l'ajout de polysorbate 80.

#### III.2.2.4. Détermination de l'effet de polysorbate 80 sur la composition cellulaire en acides gras des bactéries starters en présence de la bile.

- **Préparation du culot bactérien**

- 100 mL de MRS (sans tween 80) ou M17 fraîchement préparés étaient autoclavés à 121°C pendant 15 min.
- Ajouter la bile à 0.3% (p/v) et le polysorbate 80 à 1% (sans polysorbate 80 dans le témoin).
- Inoculer les bouillons avec une culture jeune de 24 h à 1% (v/v) et incubé à 37°C en anaérobiose.
- Après 24 h d'incubation, les cultures ( $DO_{620} \sim 3.0$ ) étaient centrifugées à  $1840 \times g$  à 4°C pendant 20 minutes.
- Rincer le culot bactérien deux fois avec l'eau MilliQ stérile.

- **Extraction des lipides**

- Les lipides sont extraits (Folch et al., 1957) avec le mélange de (chloroforme-méthanol-eau salée à 0.73% p/v dans les proportions 8v/4v/3v).
- Verser le mélange dans une ampoule à décanter, agiter pendant 15 à 20 min dans un agitateur orbital et laisser décanter à température ambiante.
- La phase chloroformique est séparée de l'homogénat.

- **Préparation des esters méthyliques**

- A un volume d'échantillon obtenu, ajouter un volume de HCl 2 N dans le méthanol.
- Chauffer à 85°C dans un bain-Marie pendant 1 heure.
- Ajouter un même volume d'hexane à froid, et agiter 10 min.
- Prélever la phase d'hexane et la filtrer sur sulfate de sodium anhydre (Stoffel et al., 1959).

- **Chromatographie phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras**

- L'hélium était utilisé comme gaz vecteur (37 p.s.i.; 255 kPa).
- La température initiale du four (75°C à l'injection) augmente linéairement d'abord de 10°C /min jusqu'à 180°C puis 2°C/min jusqu'à 220°C.
- La chambre de l'injecteur était isotherme à 240°C et celle du détecteur à 230°C.
- Les esters méthyliques des acides gras ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention à ceux d'étalons.

- Les données collectées étaient enregistrées et traitées sur système informatique Minichrom PC system (VG Data System, USA).

### III.2.3. Traitement statistique des résultats

Chaque expérience a été indépendamment répétée trois fois dans un dispositif en randomisation totale et les résultats obtenus ont été soumis à l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel STATBOX (version 6.1, France).

La comparaison de moyennes a été réalisée par le test de Student-Newman-Keuls au seuil de 5% pour comparaison multiple. La différence est considérée significative à  $P < 0.05$ .

## III.3. Résultats et Discussion

### III.3.1. L'activité enzymatique BSH

La majorité des souches présentant une activité BSH proviennent de l'environnement intestinal dans lequel elles sont exposées aux sels biliaires. Cela implique le rôle crucial de cette enzyme dans le maintien de la survie bactérienne à l'effet létal de la bile.

Pereira et al. (2003) et Belgey et al. (2006) suggèrent que l'activité de la BSH devrait être aussi prise comme critère de sélection des bactéries probiotiques ayant un pouvoir hypocholestérolémiant.

Les résultats reportés dans le tableau 12 illustrent l'effet de l'addition du polysorbate 80 sur cette activité enzymatique exprimée chez les starters lactiques *L. bulgaricus* LB 340 et *S. thermophilus* TA040 en présence de la bile ou du principal acide biliaire conjugué l'acide cholique.

En présence de la bile, les diamètres des zones de précipitation sont de l'ordre de 2.5 et 3.3 mm en moyenne autour des disques imprégnés par les cultures de streptocoques, notées respectivement en absence et en présence de polysorbate 80.

En présence d'acide cholique, cette zone est représentée par une précipitation (5.1 mm en moyenne) plus importante ( $P < 0.05$ ) en présence de polysorbate 80 comparativement au témoin (3 mm en moyenne sans polysorbate 80).

La traduction de ces résultats indique que la souche St réagit à la présence de bile ou d'acide cholique en adaptant sa synthèse de BSH. La présence de polysorbate 80 dans le milieu de culture fait réagir la souche thermophile qui augmente sa synthèse de BSH à 32%

( $P < 0.05$ ) en présence de bile et de 70% ( $P < 0.05$ ) en présence d'acide cholique par rapport au témoin (sans polysorbate 80).

En revanche, cette réaction de défense est quelque peu différente chez la deuxième souche lactique, *L. bulgaricus* LB 340. En effet, dans le cas de Lb, l'acide cholique inhibe la synthèse de BSH qui est 25 fois plus inhibée ( $P < 0.05$ ) par l'acide cholique. Autrement dit, la souche St se défend mieux que Lb vis-à-vis de la bile et de l'acide cholique.

Cependant, l'effet du polysorbate 80 sur cette réaction de défense vis-à-vis des sécrétions biliaires se fait plus ( $P < 0.05$ ) sentir chez les lactobacilles que chez les streptocoques.

**Tableau 12** : Effet du polysorbate 80 (1% : v/v) sur l'activité enzymatique de la BSH chez les souches starters de yaourt en présence de 0.5% (p/v) bile ou acide cholique.

	Milieu de culture contenant	Diamètre De précipitation (mm)
<i>S. thermophilus</i> TA 040	<i>Bile</i> (-E 433)	2.5 ± 0.71d
	<i>Acide Cholique</i> (-E 433)	3 ± 0.45d
	<i>Bile</i> (+E 433)	3.3 ± 0.5de
	<i>Acide Cholique</i> (+E 433)	5.1 ± 0.3f
<i>L. bulgaricus</i> LB 340	<i>Bile</i> (-E 433)	1.25 ± 1.6c
	<i>Acide Cholique</i> (-E 433)	0.05 ± 0.05a
	<i>Bile</i> (+E 433)	3.4 ± 0.35e
	<i>Acide Cholique</i> (+E 433)	0.1 ± 0.11b

<sup>a-f</sup> : Les différentes lettres signifient des différences significatives ( $P < 0.05$ ).

Les valeurs représentent les moyennes ± SD de 3 déterminations (n=3).

En effet, le polysorbate 80 pousse les lactobacilles à augmenter leur synthèse de BSH de 172% ( $P < 0.05$ ) en réaction à la présence de bile et de 900% ( $P < 0.05$ ) en réaction à la présence d'acide cholique.

Selon Belgey et al. (2006), la zone de précipitation est due aux acides biliaires déconjugés par la BSH et complexés par le  $\text{CaCl}_2$  présent dans le milieu de culture. La BSH hydrolyse la liaison amide et libère la taurine ou la glycine du noyau stéroïde et des acides biliaires déconjugés.

En effet, l'activité enzymatique de la BSH a été détectée principalement chez la microflore intestinale, à savoir les genres *Lactobacillus* sp (Dashkevicz et Feighner, 1989; McAuliffe et al., 2005), *Bifidobacterium* sp (Grill et al., 1995 ; Kim et al., 2004 et 2005), *Enterococcus* sp (Franz et al., 2001; Wijaya et al., 2004) et *Clostridium* sp (Coleman et Hudson, 1995 ; Pereira et al., 2003). Par contre, peu d'études se sont intéressées à cette activité de BSH chez le genre *Streptococcus* sp (Belgey et al., 2006).

Dans la présente étude, nous utilisons une souche *S. thermophilus* naturellement tolérante à la bile (Foligne et al., 2007). Cela pourrait expliquer la production assez importante en BSH chez cette souche.

La majorité des études réalisées dans le but d'améliorer la survie bactérienne aux hostilités digestives prennent en considération seulement l'effet de la bile (Liong et Shah, 2005a et b), et parfois aussi celui de l'acidité gastrique (Corcoran et al., 2007). Par conséquent, peu de travaux se sont intéressés à optimiser la production bactérienne de BSH (Sridevi et al., 2009); même si cette dernière représente un des outils les plus importants chez les bactéries lactiques pour faire face aux effets délétères de la bile.

Il est important de souligner qu'à ce jour, il n'existe pas -à notre connaissance- des travaux publiés sur l'utilisation du polysorbate 80 comme agent modulateur de la BSH. Nos résultats sont en faveur d'un effet stimulateur du polysorbate 80 sur la production de BSH chez les souches starters du yaourt et ceci pourrait être lié à sa richesse en acide oléique (renfermant plus de 70%).

### **III.3.2. Effet du polysorbate 80 sur la survie des starters du yaourt à l'acidité gastrique simulée.**

Le tableau 13 montre les résultats de la survie (biomasse en  $\text{Log UFC. mL}^{-1}$ ) des starters lactiques, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB 340 et *Streptococcus*

*thermophilus* TA 040, en cultures pure et associée sur milieu MRS ou M17 et durant une exposition de 0 à 2 h à l'acidité gastrique simulée (pH 2.5).

Il apparaît que dès les premières 15 min d'exposition la survie de ces souches en absence de polysorbate 80 (témoins) accuse une diminution de l'ordre de 0.48 à 0.61 unité log ( $P < 0.05$ ) quand elles sont cultivées séparément (cultures pures) et de seulement ( $P > 0.05$ ) 0.21 unité log en moyenne pour ces deux souches lorsqu'elles sont cultivées ensemble (culture associée) (tableau 13). En effet, ces deux bactéries ont révélé une très bonne relation symbiotique et une capacité de résistance à l'acidité dans le lait fermenté (Ziar, 2007 ; Riazi et Ziar, 2008 ; Riazi et Ziar, 2012). Par contre le polysorbate 80 n'a manifesté aucun effet significatif ( $P > 0.05$ ) d'amélioration de la survie de ces souches en cultures pures (diminution de 0.43 à 0.58 unité log) ou associées (diminution de 0.16 unité log en moyenne).

Après 45 min de séjour en conditions acides, la viabilité des deux souches lactiques semble être affectée ( $P < 0.05$ ) étant donné les pertes en biomasse enregistrées (0.64 à 0.74 unité log en cultures pures et 0.24 à 0.64 unité log en cultures associées) en absence de polysorbate 80 (témoins).

En revanche, l'ajout de ce dernier diminue ( $P < 0.05$ ) l'effet létal de l'acidité à l'égard des bactéries et dont les pertes en biomasse n'ont pas dépassées 0.54 et 0.17 unité log en moyenne et ceci dans les cultures pures et associées, respectivement.

Après 120 min d'exposition à l'acidité et en absence de polysorbate 80 (témoins), il apparaît que la souche St résiste mieux ( $P < 0.05$ ) en culture pure (perte de biomasse de l'ordre de 1.52 unités log) qu'en culture associée (perte de biomasse de l'ordre de 1.94 unités log) avec la souche Lb (tableau 13). Cette dernière était plus affectée ( $P < 0.05$ ) au pH 2.5 comparée à St et où les diminutions en biomasse du lactobacille au même niveau étaient de l'ordre de 4.54 et 3.7 unités log en culture pure et associée, respectivement.

De telles observations sont analogues à celles rapportées par Foligne et al. (2007) quand ils avaient démontré que le lactobacille LB340 était plus sensible à la bile que le streptocoque TA040.

En présence de polysorbate 80, la supériorité de St par rapport à Lb à résister à l'acidité reste inchangée et caractérisée par une préservation de biomasse significativement

**Tableau 13** : Effet du polysorbate 80 (E 433) sur la survie des souches starters du yaourt à l'acidité gastrique simulée (pH 2.5).

Souche		Temps	Nombre de cellules viables (Log UFC. mL <sup>-1</sup> ) à temps « t » (min).				
			t0	t15	t45	t60	t120
<i>St</i> Pure	- E 433		6.80 ± 0.81a	6.32 ± 1.00a	6.16 ± 0.07a	5.74 ± 0.05d	5.28 ± 1.56e
	+ E 433		6.70 ± 0.21a	6.27 ± 0.30a	6.23 ± 0.24b	6.12 ± 0.34 <sup>e</sup>	5.62 ± 1.16f
<i>Lb</i> Pure	- E 433		6.79 ± 1.14a	6.18 ± 0.12a	6.05 ± 0.17a	4.39 ± 0.20a	2.25 ± 0.20a
	+ E 433		6.82 ± 0.81a	6.24 ± 1.00a	6.20 ± 0.81b	5.08 ± 1.56b	4.32 ± 0.11c
<i>St (+Lb)</i> Associée	- E 433		6.95 ± 0.81a	6.74 ± 0.81b	6.71 ± 0.14c	5.12 ± 0.08b	5.01 ± 0.46d
	+ E 433		6.95 ± 0.81a	6.78 ± 1.00b	6.79 ± 0.41d	6.18 ± 0.07 <sup>e</sup>	6.04 ± 0.31g
<i>Lb (+St)</i> Associée	- E 433		6.83 ± 0.11a	6.61 ± 0.51b	6.19 ± 0.46ab	5.22 ± 0.46c	3.13 ± 0.81b
	+ E 433		6.83 ± 0.11a	6.68 ± 0.20b	6.66 ± 0.31c	6.02 ± 0.25 <sup>e</sup>	5.72 ± 0.21f

<sup>a-g</sup> : Les comparaisons sont faites dans la même colonne. Différentes lettres signifient des différences significatives (P<0.05).

Les valeurs représentent les moyennes ± SD de 3 déterminations (n=3).

plus élevée ( $P < 0.05$ ). Les pertes en biomasse étaient de l'ordre de 1.8 et 1.01 unités log en cultures pures et associées, respectivement.

Le caractère souche-dépendant de la résistance à l'acidité des souches revient à Conway et al. (1987) qui avait suggéré que les cultures microbiennes destinées à être sélectionnées pour leur qualité probiotique, devraient être choisies fonction de leur capacité de résistance à l'acidité. Par exemple, Pereira et Gibson (2002b) ont montré que les souches *Lactobacillus pentosus* et *Streptococcus thermophilus* DSM 20617 étaient les plus sensibles à l'acidité (pH 2) et ceci dès les 15 min d'exposition par rapport aux souches *L. fermentum* KC5b, *L. delbrueckii* JCM1002 et *L. johnsonii*, qui étaient les plus tolérantes et dont la perte en biomasse dépasse le seuil de 0.28 à 0.48 unité log après 120 min d'exposition.

### III.3.3. Effet du polysorbate 80 sur la tolérance bactérienne à la bile et à l'acide cholique.

L'effet de polysorbate 80 sur la tolérance des starters lactiques à la bile et à l'acide cholique est exprimé en termes de quantités de biomasse (Log UFC. mL<sup>-1</sup>). Les résultats obtenus sont reportés dans les tableaux 14 et 15.

Le polysorbate 80 à 1% ne révèle aucun effet sur la croissance de St en présence de 0.3% (p/v) de bile dans les bouillons M17 ou ST (tableau 14).

Ceci pourrait être dû, d'une part, au fait que *S. thermophilus* résiste naturellement à l'effet délétère de la bile ajoutée à 0.3% (tableau 14), et d'autre part, à la concentration (1%) de polysorbate 80 utilisée qui ne semble pas influencer sa tolérance à la bile ( $P < 0.05$ ) dans les milieux M17 et ST. Ces résultats sont en accord avec ceux de Pereira et al. (2002b) qui ont observé que les vitesses de croissance de la souche *S. thermophilus* DSM 20617 étaient identiques en absence (0%) ou en présence de bile (0.2 ; 0.4%).

En outre, et par comparaison aux résultats avec la bile, *S. thermophilus*, cultivée sur milieu M17 en présence de 0.3% (p/v) d'acide cholique (tableau 14), révèle une croissance modérée et faible ( $P > 0.05$ ) en présence et en absence de 1% de polysorbate 80, respectivement. Nos résultats révèlent aussi que l'acide cholique, et comparativement à la bile, présente plus ( $P < 0.05$ ) d'effets délétères sur le pouvoir de croissance des streptocoques. Ces observations sont en partie en accord avec ceux de Noriega et al. (2006) qui ont trouvé

**Tableau 14** : Effet du polysorbate 80 sur la croissance (Log UFC. mL<sup>-1</sup>) de *Streptococcus thermophilus* TA040 en présence de bile ou d'acide cholique.

<i>Streptococcus thermophilus</i> TA040	+ la bile		+ l'acide cholique	
	+ polysorbate 80	- polysorbate 80	+ polysorbate 80	- polysorbate 80
Milieu M17	7.67 ± 0.04c	7.64 ± 0.01c	7.08 ± 0.03b	5.67 ± 0.01a
Milieu ST	7.87 ± 0.01b	7.88 ± 0.02b	7.23 ± 0.02a	7.94 ± 0.02c

<sup>a-c</sup> : Les comparaisons sont faites dans la même ligne. Différentes lettres signifient des différences significatives (P<0.05).

Les valeurs représentent les moyennes ± ET de 3 déterminations (n=3).

**Tableau 15** : Effet du polysorbate 80 sur la croissance (Log UFC. mL<sup>-1</sup>) de *Lactobacillus bulgaricus* LB340 en présence de bile ou d'acide cholique.

<i>Lactobacillus bulgaricus</i> LB 340	+ la bile		+ l'acide cholique	
	+ polysorbate 80	- polysorbate 80	+ polysorbate 80	- polysorbate 80
Milieu MRS*	7.45 ± 0.37c	4.56 ± 0.01b	7.64 ± 0.16d	2.14 ± 0.10a

<sup>a-d</sup> : Les comparaisons sont faites dans la même ligne. Différentes lettres signifient des différences significatives (P<0.05).

Les valeurs représentent les moyennes ± ET de 3 déterminations (n=3).

\* MRS sans tween 80

que les sels conjugués dérivant de l'acide cholique sont très toxiques pour les bactéries par comparaison à ceux issus de la déconjugaison de la bile.

Sur milieu ST et en présence de 0.3% d'acide cholique (tableau 14), le polysorbate 80 manifeste un effet plutôt négatif sur la croissance de souche *S. thermophilus* qui affiche une bonne biomasse en absence de cet additif ( $P < 0.05$ ). Ces résultats montrent aussi qu'il y a absence d'effet positif du polysorbate 80 en milieu ST et ceci comparativement aux données enregistrées dans le milieu M17 ( $P < 0.05$ ). Dans la littérature, il a été démontré que la présence d'une source de carbone facilement métabolisable (ici le saccharose dans le milieu ST) par les bactéries, pourrait supprimer l'effet toxique des sels biliaires à leur égard (De Smet et al., 1995; Patel et al., 2004).

Ces observations laissent aussi penser qu'il y a probablement une absence de synergie entre les effets protecteurs générés par la présence à la fois de saccharose et de polysorbate 80 dans le milieu ST.

La croissance de *Lactobacillus bulgaricus* sur milieu MRS modifié à 0.3% (p/v) glucose et 0.3% de bile (p/v) a été aussi étudiée, en absence et en présence de polysorbate 80 (tableau 15).

Nos résultats révèlent que le polysorbate 80 exerce un effet positif ( $P < 0.05$ ) sur la croissance de Lb en présence de bile (tableau 15).

Cependant, en présence de l'acide cholique (0.3%), l'addition de polysorbate 80 semble être nécessaire à la survie de cette souche ( $P < 0.05$ ) qui semble être grièvement affectée en absence de cet ingrédient dans le milieu de culture. Ces résultats concordent avec ceux d'Ananta et al. (2004) qui ont montré que l'acide oléique améliore la viabilité des lactobacilles sous conditions défavorables comme la congélation et le séchage.

De leur côté, Kimoto et al. (2002) ont constaté que la présence d'une source d'acide oléique comme le tween 80 réduit la perméabilité cellulaire induite par la bile chez les lactocoques. Cet effet protecteur résulte, selon les mêmes auteurs, de la formation de micelles bile + Tween réduisant ainsi le niveau d'adhérence des molécules de bile sur la membrane cellulaire et offrant par conséquent, plus de stabilité à la bactérie.

#### **III.3.4. Effet de polysorbate 80 sur la composition cellulaire des starters de yaourt cultivés en présence de la bile.**

Les esters méthyliques des fractions lipidiques cellulaires de *L. bulgaricus* LB340 et *S. thermophilus* TA040 ont été préparés et analysés par CPG. Les résultats des tableaux 16 et 17

rapportent la composition en acides gras de ces souches en présence et en absence du polysorbate 80 et en réponse de la présence de la bile à 0.3% dans leur milieu de culture. Les profils chromatographiques obtenus sont donnés en annexe.

Nous avons remarqué que l'addition de la bile au milieu de culture était associée avec un changement dans la composition en acides gras des membranes cellulaires des deux souches. Les acides gras prédominants chez la souche Lb cultivée sans polysorbate 80 (tableau 16) sont : C16 :1 ; C18 :0 ; C18 :1 ; C18 :2. Les résultats trouvés par Taranto et al. (2006) chez *L. reuteri* CRL 1098 cultivée en présence de 5 mM de sels biliaries, sont –dans l'ensemble- en accord avec le profil lipidique trouvé chez Lb dans la présente étude. Ces auteurs ont remarqué que c'est les acides gras hexadécanoïque (C16 :0), octadécanoïque (C18 :0), octadécénoïque (C18 :1) qui prédominent chez ce lactobacille.

Dans la présente expérimentation, l'effet du polysorbate 80 se manifeste par la prédominance des acides gras C18 :1 et C19 :0 ( $P < 0.05$ ) dont l'accumulation est importante avec une tendance de la souche Lb à synthétiser les acides gras type cyclopropane (C19 :0 et C19 :1) aux dépens des acides linoléique, linoléinique et stéarique.

Cette augmentation ( $P < 0.05$ ) de C18 :1 et C19 :1 est accompagnée d'une diminution ( $P < 0.05$ ) des acides gras saturés. La modification observée pourrait être expliquée par un contrôle des mécanismes métaboliques régulant ces acide gras chez cette souche (Smittle et al., 1974).

Selon Corcoran et al. (2007), la concentration de l'acide palmitique du milieu de culture sans Tween 80, est plus élevée que celle en sa présence. Ces auteurs ont corrélé l'épuisement en cet acide gras à sa probable utilisation dans la synthèse *de novo* acides gras indispensables à la cellule. Cette explication pourrait éclaircir en grande partie nos données (tableau 16) qui concernent l'acide palmito-oléique.

En outre, les cellules de Lb témoins (sans polysorbate 80) sont déficientes en acide gras type oléate par comparaison aux cultures cultivées en présence de polysorbate 80 où le pourcentage calculé en cet acide gras est six fois supérieur ( $P < 0.05$ ). Nos résultats indiquent, d'une part qu'il existe une probable incorporation de l'acide oléique (étant donné qu'il représente la fraction la plus élevée dans le polysorbate 80) dans les lipides membranaires.

**Tableau 16:** La composition cellulaire en acides gras (%) de *L. bulgaricus* LB340 cultivée<sup>#</sup> en présence de 0.3% bile et avec ou sans l'ajout de polysorbate 80.

Acide gras*	Souche Lb	
	- polysorbate 80	+ polysorbate 80
C14 : 0	0.11	2.33
C16 : 1	6.51	4.13
C18 : 0	4.88	5.33
C18 : 1	6.31	37.46
C18 : 2	13.17	3.49
C19 : 0	/	10.27
C19 : 1	/	2.27
C20 : 0	0.48	2.08
C20 : 1	2.15	1.50

\*D'autres acides gras trouvés  $\leq 1\%$

Le contenu total et approximatif en acides gras chez LB340 est de l'ordre de 0.015 mg. mL<sup>-1</sup>.

<sup>#</sup> MRS sans tween 80

D'autre part, une possibilité de conversion d'oléate en acide gras cyclopropane C19. Ces observations corroborent avec ceux de Budin-Verneuil et al. (2005) et Corcoran et al. (2007).

D'une manière générale et dans le présent travail, l'addition du polysorbate 80 au milieu de culture induit une forte augmentation du ratio acides gras insaturés/ acides gras saturés qui passe de 0.8 à 2.78 dans le profil lipidique cellulaire de *L. bulgaricus*.

Les résultats relatifs à la souche St (tableau 17) cultivée en présence de la bile révèlent une modification dans la composition lipidique cellulaire de cette souche en présence de polysorbate 80, et ceci par comparaison à sa culture témoin (absence de polysorbate 80). Les taux d'acides gras C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C19:1 et C20:0 ont tendance à augmenter significativement ( $P < 0.05$ ) en présence de bile et de polysorbate 80, traduisant une probable utilisation de cet additif alimentaire dans la biosynthèse de ces acides gras. Par ailleurs, la disparition du C20:1 pourrait aussi contribuer à cette augmentation.

Apparemment, l'acide oléique ne présente pas un facteur essentiel ( $P > 0.05$ ) à la survie des streptococci en présence de bile, étant donné qu'il a été détecté à un faible pourcentage (2.73 à 3.74%) dans la fraction lipidique cellulaire de la souche St cultivée en milieu M17 additionné ou non de polysorbate 80. Ceci va de même sens que nos résultats du test de tolérance relatif à cette souche vis-à-vis de la bile, où sa résistance enregistrée n'était pas influencée par la présence de polysorbate 80.

En ce qui concerne les acides gras type cyclopropane, les résultats obtenus ont montré une augmentation ( $P < 0.05$ ) du taux de C19:1 aux dépens du C19:0. D'une manière générale, l'addition du polysorbate 80 au milieu de culture induit une légère élévation du ratio acides gras insaturés/ acides gras saturés qui passe de 1.16 à 1.38.

Kankaanpaa et al. (2004) ont rapporté que l'incorporation des acides gras polyinsaturés à la fraction lipidique cellulaire pourrait augmenter l'hydrophobicité de la membrane, améliorant ainsi le pouvoir d'adhésion des souches bactériennes aux cellules épithéliales.

**Tableau 17** : La composition cellulaire en acides gras (%) de *S. thermophilus* TA 040 cultivée en présence de 0.3% bile et avec ou sans l'ajout de polysorbate 80.

Acide gras *	Souche St	
	- polysorbate 80	+ polysorbate 80
C14: 0	4.59	6.59
C16 : 0	0.7	1.28
C16 : 1	2.25	4.44
C18 : 0	2.23	4.47
C18 : 1	2.73	3.74
C18 : 2	6.63	5.38
C18 : 3	10.17	9.81
C19 : 0	15.19	/
C19 : 1	5.18	17.19
C20 : 0	6.16	8.57
C20 : 1	10.32	/

\*D'autres acides gras trouvés  $\leq 2\%$ .

Le contenu total et approximatif en acides gras chez TA040 est de l'ordre de 0.011 mg. mL<sup>-1</sup>.

### III.4. Conclusion

Dans la présente expérience, nous avons tenté d'améliorer les capacités de survie de deux bactéries starters de yaourt aux hostilités digestives en utilisant un additif alimentaire, le polysorbate 80 (E433), largement utilisé en industrie laitière pour ses qualités émulsifiantes. L'activité enzymatique BSH, la résistance au pH acide et à l'effet toxique de la bile ou de l'acide cholique ont aussi été étudiés étant donné leur lien étroit avec l'expression du pouvoir d'assimilation de cholestérol chez les bactéries. En outre, une analyse CPG a été réalisée pour mettre en évidence tout changement induit par la présence de la bile et de polysorbate 80 dans les profils lipidiques cellulaires bactériens et qui nous permettrait d'apprécier son effet sur la cellule bactérienne.

Les résultats obtenus suggèrent un effet stimulateur du polysorbate 80 sur la production de BSH chez les souches starters de yaourt. Après 120 min d'exposition des souches aux conditions gastriques simulées (pH 2.5) et en présence de polysorbate 80, nous avons enregistré une protection de la biomasse, en cultures pures et associées. Sous conditions intestinales simulées, *S. thermophilus* résiste à l'effet délétère de la bile ajoutée à 0.3%, mais le polysorbate 80 à 1% ne semble pas influencer sa tolérance à la bile dans les milieux M17 ou ST. Avec la même concentration en acide cholique, cette souche a révélé une croissance modérée à faible en présence et en absence de 1% de polysorbate 80, respectivement. Nos résultats démontrent aussi que l'acide cholique, et comparativement à la bile, présente plus d'effets délétères sur le pouvoir de croissance des streptocoques.

En revanche, une bonne viabilité de la souche Lactobacille en présence de bile et de polysorbate 80 a été observée. Par ailleurs, en présence d'acide cholique (0.3%), l'addition de polysorbate 80 semble être nécessaire à la survie de cette souche qui s'avère très sensible à cet acide biliaire.

Tous ces effets positifs engendrés par l'ajout de polysorbate 80 pourraient être attribués à son contenu en acide oléique. Cela a été bien montré par l'analyse CPG réalisée sur les profils en acides gras des deux souches cultivées en présence de la bile et avec ou sans l'addition de l'ingrédient actif le polysorbate 80, présumé avoir des effets protecteurs à l'égard de nos souches. L'analyse CPG a révélé qu'effectivement, une incorporation de l'acide oléique exogène dans la fraction lipidique bactérienne de *L. bulgaricus* ou *S. thermophilus* a été observée quand ces deux souches sont cultivées en présence de la bile et de polysorbate 80. Cette incorporation s'était traduite par une quantité significativement élevée en cet acide chez le lactobacille.

Par ailleurs, l'addition du polysorbate 80 modifie aussi les proportions en d'autres acides gras qui sont en étroite relation avec la quantité d'acide oléique présente. Les inter-conversions observées ont touché : les acides octadécanoïques (C18), leurs dérivés méthyliques cycliques (C19: cyc) et les acides C20-21. D'une manière générale, la présence du polysorbate 80 dans le milieu de culture augmente le ratio d'acides gras insaturés / saturés chez la bactérie exposée à l'effet toxique de la bile.

# **CHAPITRE IV :**

**Effet de la microencapsulation sur la**

**survie *in vitro* de *Lactobacillus***

***rhamnosus* LBRE-LSAS et**

***Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis***

**Bb12 dans le yaourt mixte et dans des**

**conditions digestives simulées.**

## CHAPITRE IV :

### **Effet de la microencapsulation sur la survie *in vitro* de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 dans le yaourt mixte et dans des conditions digestives simulées.**

#### **IV.1. Introduction**

L'efficacité d'un probiotique à procurer des bénéfices santé sur l'hôte dépend, entre autre, de sa capacité à survivre aux hostilités digestives lors de son transit par le tube digestif. L'aliment vecteur peut, certes, exercer un léger effet protecteur sur ce probiotique ; mais cela reste au deçà des niveaux requis. C'est pourquoi, il y a nécessité de rechercher des moyens de protection des cellules en vue d'en augmenter la survie et leur permettre d'arriver en nombre suffisant au côlon, environnement naturel de leur expression (Riaz et Masud, 2013).

Classée dans la catégorie GRAS (Generally Recognized As Safe) par la FDA (Food and Drug Administration) sous le code n°21CFR184.1724, la poudre déshydratée d'alginate de sodium reste plus utilisée dans l'encapsulation des probiotiques en raison surtout de sa non-toxicité, son abondance, son utilisation large en alimentation et son coût raisonnable (Smidsrod et Skjak-Braek, 1990). Par ailleurs, l'ajout de prébiotiques semble renforcer l'effet protecteur procuré par les sels d'alginate à l'égard de la survie des bactéries dans l'aliment vecteur et aux conditions gastro-intestinales (Chen et al., 2005).

Dans ce chapitre, nous présentons la technique de microencapsulation dans un gel mixte d'alginate de calcium-amidon résistant de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12, ainsi que l'effet de cette microencapsulation sur leur survie d'une part, aux conditions digestives simulées, et d'autre part dans l'aliment vecteur représenté par le yaourt mixte (contenant une souche bénéfique et les deux starters du yaourt).

Ainsi, les principaux objectifs visés dans cette étude sont :

- ⇒ L'estimation de la résistance mécanique des capsules fabriquées à l'action destructive de l'alpha amylase salivaire en simulant la partie supérieure du tube digestif.

- ⇒ L'évaluation de la survie des souches encapsulées aux conditions gastriques et intestinales simulées et en présence d'ingrédients alimentaires reconstituants le bol alimentaire.
- ⇒ La détermination de leur taux de survie, de post-acidification et de production d'exopolysaccharides (EPS) en co-habitation avec les starters dans le yaourt (mixte) entreposé à 4°C.

## IV.2. Matériels

- *Lactobacillus rhamnosus*: souche expérimentale LBRE-LSAS provenant de la collection du laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem).

- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* : souche probiotique de référence, connue commercialement sous la désignation Bb-12 (Chr. Hansen-Danemark).

Les ferments lactiques *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus* LB340 et *Streptococcus thermophilus* TA 040 représentent les starters du yaourt.

- Lait écrémé : c'est une poudre de lait écrémé (0% matière grasse) importée (Medium Heat 281L) de Connacht Gold Coopérative Ltd (Irlande).

- Alginate de sodium : la poudre d'alginate de sodium E401 (GRINDSTED R. Alginate FD 120059912 Material no, Danisco-France) nous a été aimablement offerte par la firme Danisco à Alger.

- Amidon modifié (amidon résistant AR) : il s'agit de l'amidon modifié type Hi-Maize<sup>TM</sup> 260- RS2 qui nous a été aimablement offert par la firme Danisco à Alger.

- Les milieux de culture

- Bouillon MRS- cys : Le bouillon MRS De Man, Rogosa et Sharpe (De Man et al., 1960), référence E. Merck, 64271 Darmstadt, Allemagne, additionné de L-chlorhydrate de cystéine à 0.05% a été utilisé pour la réactivation des souches LBRE-LSAS et Bb12.
- Bouillon M17 : le bouillon M17 (Terzaghi et Sandine, 1975), (Merck) est utilisé pour la réactivation de la souche TA 040.

- Bouillon MRS : le bouillon MRS De Man, Rogosa et Sharpe (De Man et al., 1960), (Merck, VM10661) a été utilisé pour la réactivation de la souche LB340.
- MRS cystéiné gélosé (MRS- cys agar) : Il s'agit du milieu MRS-cys bouillon additionné de 15g d'agar –agar, et réparti dans des flacons et autoclavé 15 min à 121°C.
- MRS acidifié agar (MRS- ac agar) : C'est le milieu MRS acidifié avec du HCL 1N à pH 5.4 et solidifié par l'ajout de 10g d'Agar-Agar qui a été utilisé pour le dénombrement de la souche lactique *L. bulgaricus* LB340 (Ashraf et Shah, 2011).
- M17 gélosé : Il s'agit du milieu M17 bouillon additionné de 12g d'agar –agar, réparti dans des flacons et autoclavé 15 min à 121°C et qui a été utilisé pour le dénombrement de la souche lactique *S. thermophilus* TA 040 (Ashraf et Shah, 2011).
- Milieu ST pour les Streptocoques (*Streptococcus thermophilus* agar) : C'est le milieu décrit pour le dénombrement des streptocoques en culture mixte avec les bactéries lactiques (Ashraf et Shah, 2011).

Dans le cas des cultures mixtes, le milieu sélectif MRS-LP à pH 6.8 a été utilisé pour le dénombrement de Bb12 ou LBRE-LSAS. Ce milieu consiste à ajouter dans un litre de MRS cystéiné le mélange LP (lithium-propionate): chlorure de lithium (3 g), propionate de sodium (2 g) et l'acide propionique (5 mL) (Vinderola et Reinheimer, 1999).

#### - Préparation et ajustement de l'inoculum

72 h avant de commencer chaque expérience, les cultures sont revivifiées par une série de trois inoculations successives dans 10 mL de milieu adéquat et incubées à 37°C pendant 24 h dans une jarre d'anaérobiose avec un système générateur de CO<sub>2</sub> (Anaérocult) pour *L. rhamnosus* ou de *B. animalis* subsp. *lactis*. Les starters de yaourt *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* sont incubées en aérobiose.

L'ajustement de l'inoculum s'effectue à l'aide de cellule Thoma de la même manière qu'au chapitre précédant.

## IV. 3. Méthodes

### IV.3.1. Technique d'encapsulation des cellules bactériennes

L'encapsulation des bactéries a été réalisée selon le protocole de Capela et al. (2006) modifié dans ce travail.

- Dans un bécher stérile verser 100 mL d'huile végétale (Tournesol) et y rajouter 1mL de polysorbate 80 (E 433; A and Z Food Additives Co. Ltd, Chine).
- Préparer un mélange constitué du culot (5000 ×g, ZENTRIFUGEN D- 78532 Tuttlingen, Allemagne) obtenu de 80 mL de culture de 24 h de LBRE-LSAS ou Bb12, lavé deux fois avec 20 mL de solution saline et dont la charge microbienne est ajustée à  $5 \times 10^{10}$  cellules. mL<sup>-1</sup> dans 10 mL d'une solution d'amidon résistant (AR) stérile (2%, p/v) et 1.8% (p/v) d'alginate de sodium (\*).
- Agiter le mélange et faire tomber doucement des microgouttelettes de 1 mL du mélange réalisé en étape (\*) sur l'huile en se servant d'une seringue stérile et dont l'aiguille est à 27.5 G.
- Le mélange doit être agité entre 200 à 400 tours pendant 20 min.
- Ajouter doucement par coulage sur les parois, une solution stérile de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M (100 à 200 mL) jusqu'à rupture de l'émulsion.
- Après 15 min d'agitation, séparer les capsules formées d'alginate de calcium-AR de la phase aqueuse.
- Rincer 2 fois avec une solution saline stérile (0.9 % NaCl + 5% glycérol) et puis conserver dans des tubes stériles hermétiquement clos 48 h à 4°C.

#### IV.3.2. Préparation du yaourt

- Quatre types de batch au lait écrémé (à 18% p/v, stérilisé par tyndallisation dans un bain- Marie, Digital WATER, LWB-IIID, JLB TECH Corée, à une température de 80°C pendant 30 min), ont été constitués incluant les bactéries *L. rhamnosus* ou *B. animalis* Bb12 encapsulées ou libres avec les starters de yaourt.
- L'inoculum est calculé de façon à ce que la concentration bactérienne finale de chaque souche soit  $10^7$  cellules. mL<sup>-1</sup>. Il est de l'ordre de 3 % (v/v, ajoutées dans un rapport de 1 :1 :1) et propagé individuellement dans des flacons contenant le lait écrémé. La bactérie *L. rhamnosus* LBRE-LSAS ou *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 est additionnée en début de la fermentation au même moment que les starters.
- La fermentation du lait est effectuée à 42°C en aérobiose.
- Une fois le pH à la coagulation atteint la valeur de 4.7, les tubes contenant le lait fermenté sont rapidement portés dans un bain glacé, puis le lait fermenté est conservé à 4°C.

### IV.3.3. Analyses microbiologiques

- La biomasse est déterminée par ensemencement en masse dans le milieu approprié de 1 mL de la dilution adéquate.
- Pour dénombrer les cellules encapsulées : prendre 1g de yaourt et le diluer dans 99 mL de tampon phosphate de sodium (PBS, pH=7, 0.2 M), agiter vigoureusement 20 min à 4°C pour la libération totale des cellules de leurs capsules d'alginate (Godward et Kailasapathy, 2003).
- Les échantillons de lait contenant les bactéries libres (témoins) sont engagés dans le même protocole que les bactéries encapsulées. Ainsi, des dilutions décimales permettant le dénombrement, sont réalisées par la suite dans la solution de DS (0.1% eau peptonnée additionnée de cystéine-HCl). Les dilutions sont homogénéisées par agitation vigoureuse de plus de 15s au minimum en utilisant un vortex (VWR-W3 S40, Allemagne).
- La survie des souches dans le lait fermenté entreposé à 4°C est déterminée trois fois, est calculé à partir de colonies appropriées obtenues après incubation sur milieu adéquat et exprimé en log UFC. g<sup>-1</sup>.
- La première analyse est effectuée 24 h après la fin de la fermentation (analyse J1), puis après chaque semaine de la conservation frigorifique à 4°C (quatre semaines d'entreposage).
- Le comptage de *L. bulgaricus* est réalisé sur milieu MRS acidifié (MRS-ac) à pH 5.4 (24 h à 42°C). L'incubation des boîtes inoculées est faite en aérobiose. En culture mixte avec *L. rhamnosus* ou la souche bifide probiotique, le milieu différentiel ST est utilisé pour dénombrer les streptocoques à côté du M17 (24 h à 37°C) (tableau 18).

### IV.3.4. Analyses physico-chimiques

#### IV.3.4.1. pH

- La cinétique de l'activité post-acidifiante des cultures réalisées est aussi suivie pendant 28 jours par la mesure hebdomadaire du pH en utilisant un pH-mètre digital (wtw, pH-mètre 330, Weilheim; Allemagne).

**Tableau 18** : Différents types de cultures réalisées et conditions de culture.

Culture bactérienne	Conditions d'incubation	Milieux utilisés
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	24 h à 42°C en aérobiose	MRS-ac
<i>S. thermophilus</i>	72 h à 37°C en aérobiose	M17
	24 h à 37°C en aérobiose	ST
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ou	72 h à 37°C en anaérobiose	MRS-cys
		MRS-LP
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>		

#### IV.3.4.2. Dosage des exopolysaccharides (EPS)

- Les protéines de 50 mL du lait dilué (1 :1) à l'eau Milli-Q sont précipitées par l'ajout de 4 mL de trichloroacétique (TCA 20%, p/v) (Sigma Chemical Co.) et séparées par centrifugation à 3313× g / 30 min à 4 °C.
- Le surnageant subi un ajustement de son pH à 6.8 avec du NaOH 40% (p/v) avant d'être porté à ébullition (100°C) pour dénaturer les enzymes du lactosérum. Ces dernières sont éliminées sous forme de culot par centrifugation à 3313× g / 30 min à 4 °C.
- Un volume d'éthanol absolu froid est ajouté à un volume de surnageant afin de précipiter les glucides pendant une nuit à 4°C.
- Le précipité est séparé par centrifugation à 3313× g / 30 min à 4 °C et est repris dans 10 mL d'eau Milli-Q avant de subir à une sonication pendant 1 h à la température ambiante et dialysé (membrane de dialyse d'un poids moléculaire d'exclusion de 13000 Da) contre l'eau Milli-Q à 4°C pendant 2 semaines avec renouvellement de l'eau de contre-dialyse 2 fois par jour.
- Ajouter à chaque tube contenant 1 mL d'échantillon (dialysat) 1 mL de phénol (5%, v/v) et 5 mL d'acide sulfurique pur (100%).
- Laisser réagir à 25°C pendant 15 min à l'obscurité.
- La quantité d'EPS et de lactose est déterminée par mesure de la densité optique à 488 nm en utilisant un spectrophotomètre (OPTIZEN MECASYS 7, Corée du sud).

- Les témoins sont traités dans les mêmes conditions que les échantillons.
- Le glucose (Sigma, France) est utilisé pour faire la courbe d'étalonnage et les résultats sont exprimés en mg. L<sup>-1</sup> d'équivalent glucose (Dubois et al., 1956).

#### **IV.3.4.3. Mesure de la viscosité**

- La viscosité est mesurée trois fois pour chaque échantillon de lait fermenté en utilisant un viscosimètre thermostaté type VT550 (SNB-1 Digital Viscometer, Xi'an Heb Biotechnology Co., Ltd. Chine).
- Les mesures durent 5 min à une vitesse constante de rotation et une vitesse de cisaillement de l'ordre de 64 s<sup>-1</sup> à 25°C
- La viscosité apparente du gel est arbitrairement prise après 10 secondes de mesure.

#### **IV.3.5. Effet de l' $\alpha$ - amylase salivaire sur l'intégrité des microcapsules-alginate calcium-Amidon résistant formées**

L'intégrité des microcapsules-alginate calcium-Amidon résistant formées a été vérifiée selon le protocole de Haider et Hussain (2008) modifié dans ce travail.

- Préparer des solutions stériles (par filtration stérilisante à l'aide de filtres Whatman polysulfoné, 0.22 $\mu$ m) d' $\alpha$ -amylase salivaire (Alpha- amylase de salive humaine, Sigma, Schnellendorf, Allemagne) à raison de 0, 50, 75, 150 et 250 U (Unité Enzymatique) dans le tampon acétate de sodium (0.1 M, pH 5.6).
- Incuber 4 h à 37°C, 1 mL d'une culture bactérienne encapsulée (concentration finale 1.10<sup>8</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>) dans 9 mL de la solution enzymatique, avant d'en prélever 100  $\mu$ L du milieu réactionnel que l'on étale sur milieu MRS-cys.
- Dénombrer les cellules viables après une incubation des boîtes de Pétri pendant 48 h à 37°C en anaérobiose.
- La préparation sans ajout d'alpha amylase a été considérée comme témoin (100%) pour le calcul des pourcentages de cellules libérées de leurs capsules.

#### **IV.3.6. Mesure de la tolérance des souches encapsulées vis-à-vis du jus gastrique et de la bile (modèle gastro-intestinal simulé)**

La tolérance des souches encapsulées vis-à-vis du jus gastrique et de la bile a été déterminée dans le modèle gastro-intestinal simulé, décrit par Martoni et al. (2007).

#### ❖ **Modèle gastrique simulé (MGS)**

- Préparer 100 mL d'une suspension alimentaire ajustée à pH 2 présentant le modèle gastrique simulé « MGS » contenant : amidon 3 g. L<sup>-1</sup>, pectine 2 g. L<sup>-1</sup>, extrait de levure 3 g. L<sup>-1</sup>, mucine 4 g. L<sup>-1</sup>, peptone 1 g. L<sup>-1</sup>, glucose 0.4 g. L<sup>-1</sup> et cystéine-HCl 0.5 g. L<sup>-1</sup>.
- Inoculer 100 µL de cellules (*L. rhamnosus* LBRE-LSAS ou *B. animalis* Bb12) encapsulées ou libres à 1.10<sup>8</sup> UFC. mL<sup>-1</sup> de concentration finale.
- Incuber à 37°C en anaérobiose (Anaérocult; Merck, Darmstadt, Allemagne) et sous agitation modérée de 100 tours/min pendant 2 h.
- Après incubation, centrifuger (3200 ×g / 10 min) la suspension et laver le culot deux fois avec du tampon phosphate de sodium.
- Le milieu isotonique témoin à l'égard de MGS est préparé avec 100 µL de cellules encapsulées dans 100 mL d'une solution de NaCl (0.86% p/v, pH 6.5) et incuber pendant 2 h à 37°C (Xiao et al., 2003).
- La survie bactérienne a été évaluée à partir du culot bactérien après 2 h de séjour en MGS.

#### ❖ **Modèle intestinal simulé (MIS)**

- Le culot lavé après séjour en MGS est résuspendu dans la même préparation alimentaire réajustée à pH 6.5 (modèle intestinal simulé, MIS), additionnée de 0.5% (p/v) de bile et 2.4 g. L<sup>-1</sup> de bicarbonate de sodium « \* ».
- Incuber la préparation MIS pendant 16 h à 37°C en anaérobiose.
- La même préparation sans l'étape incubation (c'est à dire, jusqu'à l'étape « \* ») est utilisée comme témoin.

#### ❖ **Le dénombrement des cellules viables**

- Les cellules encapsulées ayant survécu au stress acide de l'estomac et du milieu intestinal sont dénombrées avant et après libération dans le tampon PBS comme précédemment décrit (IV.5.3).
- Prendre 100 µL de la dilution adéquate et l'étaler sur milieu MRS-cys.

### **IV.3.7. Traitement statistique des résultats**

Le traitement statistique des résultats obtenus est réalisé par l'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le logiciel STATISTICA (data analysis software system, version 8.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA, 2008). La différence est considérée significative à P<0.05.

La comparaison de moyennes a été réalisée par le test de Tukey. Tous les résultats représentent les moyennes issues de trois expériences indépendantes (n=9).

## IV.4. Résultats et discussion

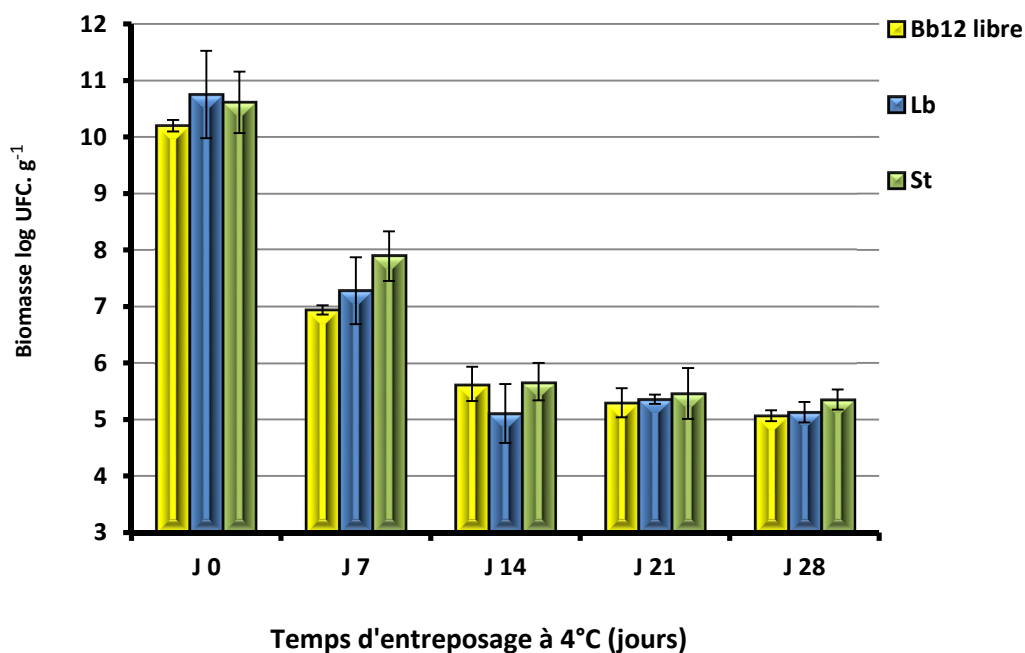
### IV.4.1. Y-a-t-il un effet positif de la microencapsulation à l'alginate-Ca-AR sur la viabilité et l'activité post-acidifiante des souches bénéfiques dans le yaourt mixte?

#### IV.4.1.1. Effet de l'encapsulation sur la viabilité et l'activité post-acidifiante de *B. lactis* Bb12 dans le yaourt mixte entreposé 28 jours à 4°C.

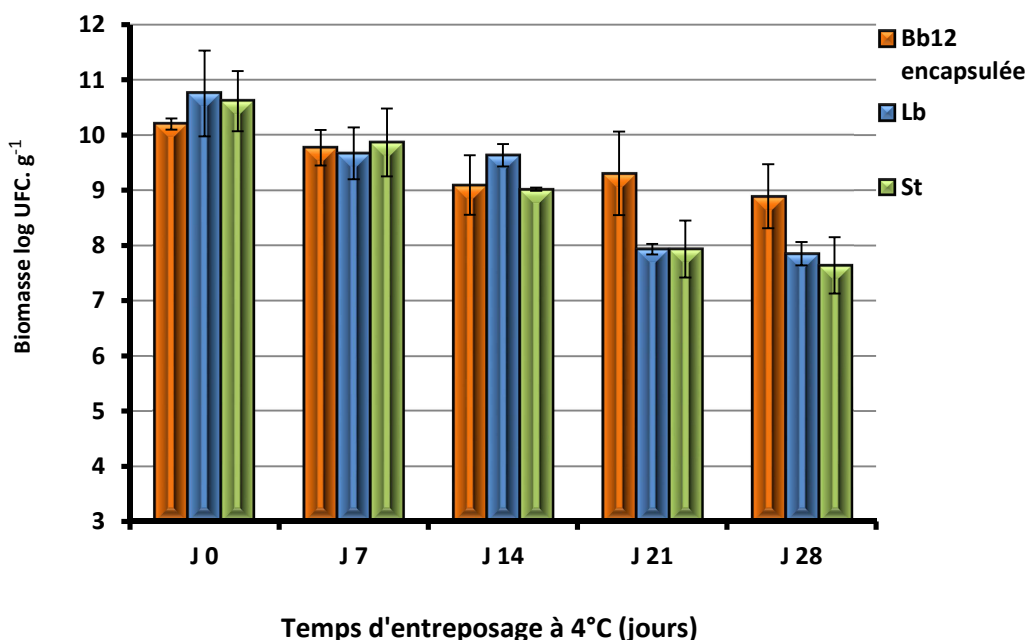
Les résultats relatifs à la quantité de biomasse de *B. lactis* Bb12 libre ou encapsulée et celles des souches starters (non sujettes à l'encapsulation) dans le yaourt mixte entreposé au froid (4°C, 4 semaines) sont représentés dans les figures 13 et 14.

Ces résultats ont montré qu'il n'y a pas de différence statistique ( $P > 0.05$ ) dans la quantité de biomasse de Bb12 encapsulée ou libre au début de la conservation frigorifique. Toutefois, à partir du 7<sup>ème</sup> jour de stockage à 4°C (fig. 13) cette différence devient nettement visible car la biomasse diminue significativement ( $P < 0.05$ ) dans la culture témoin (cellules de Bb12 libres). Cette diminution a été chiffrée à 2.32, 2.53 et à 3.44 unités log, pour les cellules libres de *B. lactis* Bb12, de *S. thermophilus* (TA040) et de *L. bulgaricus* (LB340), respectivement. Ces pertes ne représentent que 0.5 unité log pour *B. lactis* Bb12 encapsulée (fig. 14) et sont significativement ( $P < 0.05$ ) réduites comparativement à la culture témoin et de l'ordre de 0.24 unité log en moyenne pour les souches lactiques classiques (fig. 14).

Dans la culture témoin (Bb12 libre avec les deux starters de yaourt), la perte en biomasse était plus prononcée ( $P < 0.05$ ) au 14<sup>ème</sup> jour et a continué à augmenter jusqu'à la dernière semaine de stockage. Les valeurs de biomasse finales (après 4 semaines) étaient seulement de 5.23 log UFC. g<sup>-1</sup> pour la souche Bb12 libre et entre 5.12 à 5.35 log UFC. g<sup>-1</sup> pour les starters du yaourt (non sujettes à l'encapsulation). Cette perte pourrait être due à l'activité post-fermentaire génératrice d'acide lactique chez les starters. Par ailleurs, l'acide acétique produit par les bifidobactéries aurait un effet inhibiteur considérable sur la capacité de survie des lactobacilli et/ou des streptococci (Samona et al., 1996).



**Figure 13 :** Viabilité (log UFC. g<sup>-1</sup>) de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 libre et des starters du yaourt *S. thermophilus* « St » et *L. bulgaricus* « Lb » libres au cours de l'entreposage à 4°C du yaourt. L'inoculum utilisé était à 3% (v/v) et composé des trois souches associées dans un rapport = 1. Les valeurs représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes ± SD (n=9).



**Figure 14 :** Viabilité (log UFC. g<sup>-1</sup>) de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 encapsulée et des starters du yaourt *S. thermophilus* « St » et *L. bulgaricus* « Lb » libres au cours de l'entreposage à 4°C du yaourt. L'inoculum utilisé était à 3% (v/v) et composé des trois souches associées dans un rapport = 1. Les valeurs représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes ± SD (n=9).

De même, la littérature montre que dans le yaourt, la composition de la culture starter pourrait affecter significativement la survie des bactéries probiotiques au cours de l'entreposage au froid (Dave et Shah, 1997). Dave et Shah (1997) et Kailasapathy et Rybka (1997) ont souligné une faible viabilité des cellules probiotiques dans le yaourt entreposé au froid et remettent en cause la responsabilité de l'acidité accentuée générée au cours du stockage dans ce constat.

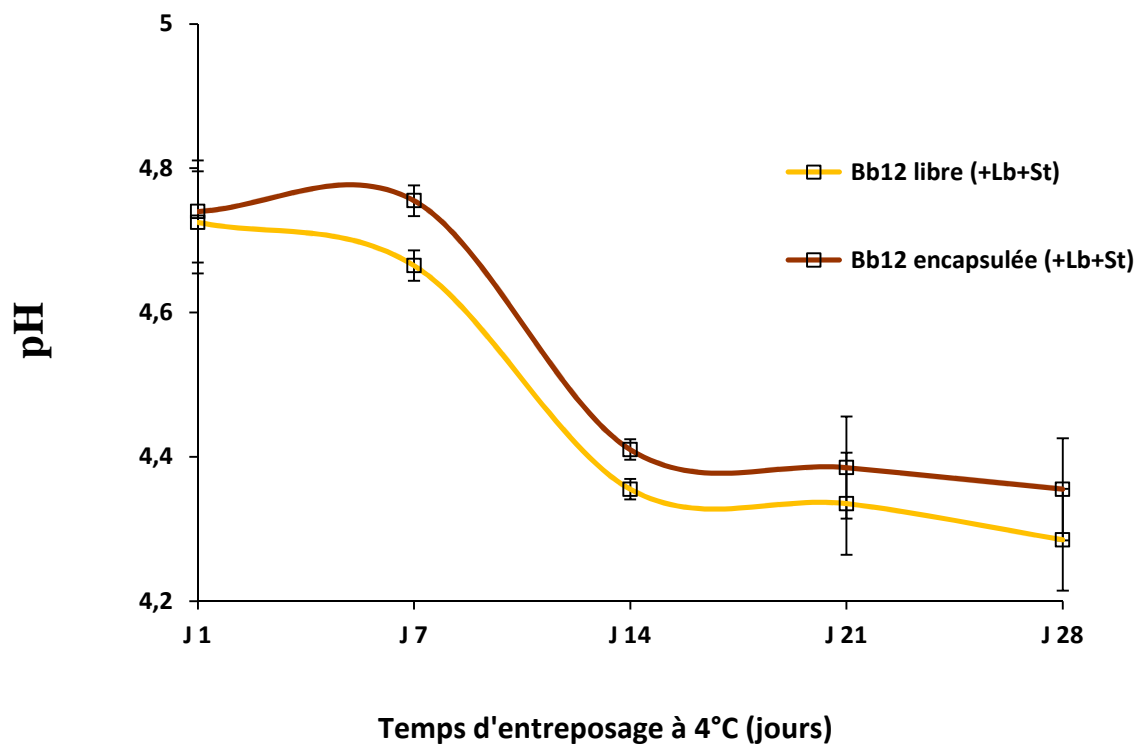
Dans la présente étude, la quantité de biomasse persistante de la souche bifide encapsulée était significativement ( $P < 0.05$ ) élevée par comparaison à la culture témoin. La microencapsulation réalisée semble exercer un effet protecteur vis-à-vis de la souche probiotique et de même les starters lactiques non sujettes à l'encapsulation, en minimisant les pertes en biomasse. Dans la culture associée « Bb12 encapsulée et starters de yaourt libres », toutes les souches ont affiché une meilleure viabilité après 4 semaines d'entreposage à 4°C avec une biomasse de plus de 7.5 log UFC. g<sup>-1</sup> pour les starters non encapsulés du yaourt, et de plus de 8.8 log UFC. g<sup>-1</sup> pour la souche bifide (fig. 14). Cette dernière valeur reste très élevée au niveau requis par la législation (FAO/OMS, 2002), et permet de calculer une amélioration de 3.8 unités log dans la capacité de cette souche à survivre dans l'aliment vecteur.

Dans une étude de Kailasapathy (2006), la survie de la souche bifide *B. lactis* DD920 encapsulée dans le yaourt entreposé 7 semaines à 4°C, était supérieure d'une unité logarithmique à celle du témoin. De même, Adhikari et al. (2000) ont rapporté une différence significative dans la biomasse de souches *B. longum* B6 et ATCC 15708 immobilisées par le κ-carraghénane ou libres dans le yaourt entreposé 30 jours à 4.4°C.

Ces observations font de la microencapsulation une méthode efficace pour la protection de cellules bactériennes dans un environnement hostile (Kailasapathy, 2002).

Dans le présent travail, l'évolution du pH au fil de la période d'entreposage à 4°C des yaourts mixtes obtenus par une culture associée de souche bifide libre (témoin) ou encapsulée (échantillon), avec les deux bactéries lactiques *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, est illustrée dans la figure 15.

Au bout du 14<sup>ème</sup> jour d'entreposage, le pH diminue de 4.72 à 4.35 dans les yaourts mixtes avec la souche bifide libre et de 4.89 à 4.41 dans ceux avec Bb12 encapsulée ( $P < 0.05$ ). Les pH finaux enregistrés à la fin de l'entreposage frigorifique étaient acides ( $P < 0.05$ ), de l'ordre de 4.28 et 4.35, notés respectivement dans les yaourts mixtes avec Bb12 libre et encapsulée.



**Figure 15 :** Evolution du pH des yaourts mixtes entreposés à 4°C contenant la souche *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 libre ou encapsulée avec les starters du yaourt *S. thermophilus* « St » et *L. bulgaricus* « Lb ». L'inoculum utilisé était à 3% (v/v) et composé des trois souches (1 : 1 : 1). Les valeurs représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes  $\pm$  SD (n=9).

Sodini et al. (2002) avaient également souligné que le pH final du yaourt mixte à bactéries probiotiques et ferments lactiques après 5 semaines d'entreposage, était plus acide (pH de 4.12 à 4.15) si le mélange de ferments lactiques utilisé contenait la souche *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Par ailleurs, Shah et al. (1995) ont aussi rapporté une activité post-acidifiante élevée chez les starters du yaourt *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* à 4°C, en produisant de l'acide lactique par fermentation du lactose.

En comparant les deux valeurs de pH finaux des yaourts mixtes avec Bb12 encapsulée et libre (fig. 15), il apparaît que celui (4.35) enregistré à la fin de l'entreposage à 4°C du yaourt mixte avec Bb12 encapsulée était déjà atteint par le yaourt à Bb12 libre au bout de 14 jours d'entreposage seulement. Cette observation illustre l'effet de la microencapsulation sur l'activité post-acidifiante de la souche *B. lactis* Bb12 au cours de l'entreposage du yaourt

mixte à 4°C pendant 4 semaines. Elle contribue au maintien de l'acidité recherchée pour les yaourts.

#### **IV.4.1.2. Effet de l'encapsulation sur la viabilité et l'activité post-acidifiante de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS dans le yaourt mixte entreposé 28 jours à 4°C.**

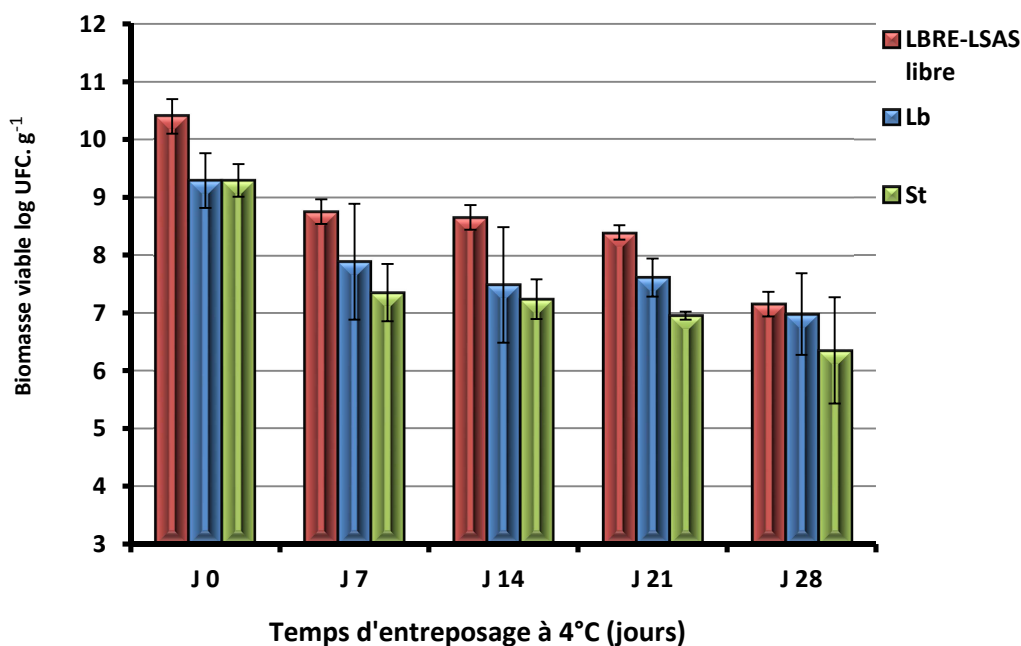
L'encapsulation de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS n'a pas d'effet mesurable sur sa viabilité au cours des premiers jours d'entreposage à 4°C du yaourt mixte qui la contient (fig. 16 et 17). Sa biomasse demeurait au-delà de 10 log UFC. g<sup>-1</sup> après le premier jour d'entreposage. A ce niveau, la biomasse des starters de yaourt est au-dessus de 9 log UFC. g<sup>-1</sup>. Ces niveaux élevés de survie pourraient être reliés aux grandes quantités de biomasse accumulées à la fin de fermentation.

Encapsulée ou pas, *L. rhamnosus* LBRE-LSAS enregistre des pertes significatives (P<0.05) après le 14<sup>ème</sup> jour d'entreposage à 4°C des yaourts mixtes qui les contiennent. Cette perte a également touché *S. thermophilus* mais, pas *L. bulgaricus* (fig. 17) dont la biomasse passe de (P>0.05) 8.86 log UFC. g<sup>-1</sup> au 7<sup>ème</sup> jour à 8.72 log UFC. g<sup>-1</sup> seulement au 21<sup>ème</sup> jour d'entreposage à 4°C.

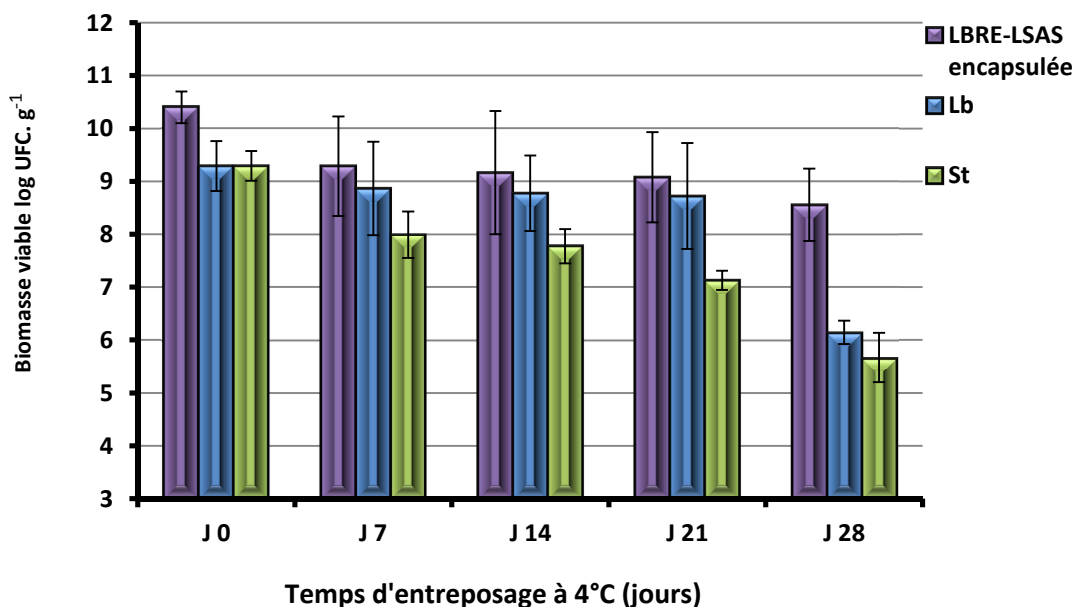
D'une manière globale et en culture associée, la souche *L. bulgaricus* LB 340 a une meilleure capacité de survie dans le yaourt entreposé par rapport à la souche *S. thermophilus* TA 040 (Riazi et Ziar, 2008). En outre, les espèces de lactobacilli sont connues par leur résistance à l'acidité (Tannock, 2004).

Les valeurs de biomasse affichées après 28 jours d'entreposage à 4°C dans le yaourt mixte à LBRE-LSAS libre (fig. 16) sont de l'ordre de 6.79, 6.34 et 6.38 log UFC. g<sup>-1</sup> pour LBRE-LSAS, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, respectivement ; ce qui correspond à des diminutions significatives (P<0.05) respectives pour ces mêmes souches de l'ordre de 5.26, 4.81 et 4.81 unités log. Ces résultats mettent en évidence la sensibilité de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS à l'acidité du yaourt mixte conservé à 4°C pendant 4 semaines. Cela signifie également que les souches starters ont une forte activité post-acidifiante à 4°C comme il a été rapporté par d'autres études antérieures (Dave et Shah, 1997 ; Godward et al., 2000).

Selon Shah et Jelen (1990), le froid et l'accumulation des acides organiques, en particulier ceux produits par les souches starters, sont les facteurs les plus importants pouvant porter préjudice à une bonne survie des souches probiotiques.



**Figure 16:** Viabilité (log UFC. g<sup>-1</sup>) de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS libre et des starters du yaourt *S. thermophilus* « St » et *L. bulgaricus* « Lb » libres au cours de l'entreposage à 4°C du yaourt. L'inoculum utilisé était à 3% (v/v) et composé des trois souches associées dans un rapport = 1. Les valeurs représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes ± SD (n=9).



**Figure 17 :** Viabilité (log UFC. g<sup>-1</sup>) de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS encapsulée et des starters du yaourt *S. thermophilus* « St » et *L. bulgaricus* « Lb » libres au cours de l'entreposage à 4°C du yaourt. L'inoculum utilisé était à 3% (v/v) et composé des trois souches associées dans un rapport = 1. Les valeurs représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes ± SD (n=9).

Si la période d'entreposage à 4°C n'atteint pas 28 jours, la biomasse de *S. thermophilus* TA040 est significativement plus élevée ( $P < 0.05$ ) dans le cas du yaourt mixte à LBRE-LSAS encapsulée que celle enregistrées dans le yaourt mixte à LBRE-LSAS non encapsulée.

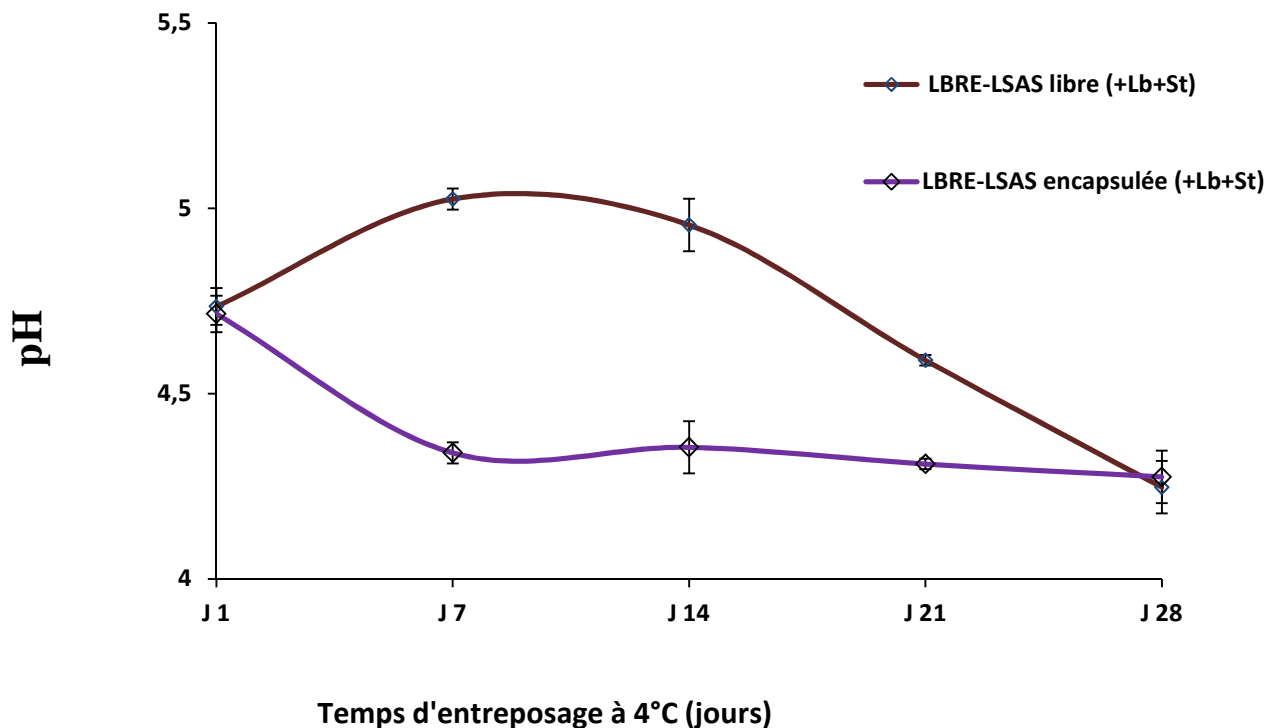
Dans le yaourt mixte, il est aussi utile de garder les souches starters (*S. thermophilus* et *L. bulgaricus*) à des taux élevées, car elles améliorent la digestion du lactose chez les déficients en lactase (Rizkalla et al., 2000) et contribuent à la réduction de la cholestérolémie (Taranto et al., 1998).

Dans la présente étude, la quantité de biomasse de LBRE-LSAS encapsulée restante à la fin des 4 semaines de conservation à 4°C, était de l'ordre de  $8.55 \log \text{ UFC. g}^{-1}$  (fig. 17) et donc supérieure au requis législatif. Ainsi, l'encapsulation de cette souche permet d'améliorer sa survie de 1.4 unités log dans l'aliment vecteur. Krasaekoopt et al. (2003) et Kailasapathy (2006) avaient rapporté que la microencapsulation permet la fabrication de produits laitiers fermentés avec des bactéries à caractéristiques fermentaires constantes et possédant une grande stabilité au cours du stockage au froid.

La protection de la viabilité bactérienne par le gel d'alginate a été également rapportée par d'autres travaux sur les probiotiques, véhiculés par le yaourt et les produits dérivés du lait (i. e. fromage) (Özer et al., 2008 et 2009). En outre, la présence de l'amidon résistant, un prébiotique reconnu comme promoteur de la croissance des probiotiques, pourrait être en partie, à l'origine de cette remarquable préservation de la viabilité des souches d'intérêt. Des résultats similaires ont aussi été rapportés par Chen et al. (2005) en utilisant les fructo- ou les isomalto- oligosaccharides avec l'alginate de sodium.

Par ailleurs, il faudrait souligner que le pouvoir fermentaire des souches encapsulées se ralentit ; ce qui rallonge le temps de coagulation générant ainsi une acidité adoucie. Ceci laisse apparaître le manque d'intérêt sur le plan industriel à encapsuler les starters du yaourt et à fabriquer des laits fermentés par une souche bénéfique encapsulée en culture pure à l'échelle industrielle où le temps est le facteur limitant le plus important.

En ce qui concerne l'évolution du pH de la culture mixte associant LBRE-LSAS encapsulée et les souches starters lors de l'entreposage à 4°C, les résultats reflètent une activité post-acidifiante très acceptable ( $P < 0.05$ ) comparativement au témoin (avec LBRE-LSAS libre) (figure 18).



**Figure 18 :** Evolution du pH des yaourts mixtes entreposés à 4°C contenant la souche *L. rhamnosus* LBRE-LSAS libre ou encapsulée avec les starters du yaourt *S. thermophilus* « St » et *L. bulgaricus* « Lb ». L'inoculum utilisé était à 3% (v/v) et est composé des trois souches (1 :1 :1). Les valeurs représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes  $\pm$  SD (n=9).

Le pH des yaourts mixtes diminue de 5.43 et 5.71 au premier jour à 4.24 et 4.27 à la fin de la conservation frigorifique, soit des abaissements de 1.19 et 1.44 unités de pH dans les yaourts contenant LBRE-LSAS libre ( $P < 0.05$ ) et encapsulée ( $P < 0.05$ ), respectivement (fig. 18). Il est à noter que ces pH sont plus acides ( $P < 0.05$ ) comparés à ceux obtenus avec la souche bifide encapsulée. Cette acidité prononcée pourrait être la cause de perte en biomasse de la souche protéolytique *S. thermophilus* observée après 3 semaines de conservation.

Kailasapathy (2006) avait rapporté que l'acidité développée par les bactéries encapsulées (*L. acidophilus*, *B. lactis*) est faible comparativement à celle générée par les bactéries libres.

#### IV.4.2. Effet de l'encapsulation sur la teneur en exopolysaccharides (EPS) des yaourts mixtes contenant Bb12 ou LBRE-LSAS.

Les résultats illustrés dans la figure 19 représentent la production d'exopolysaccharides (EPS) dans les yaourts mixtes entreposés au froid (4°C) contenant les cultures associées entre *B. lactis* Bb12 ou *L. rhamnosus* LBRE-LSAS encapsulée ou libre et les starters de yaourt (*S. thermophilus* TA 040 et *L. bulgaricus* LB340).

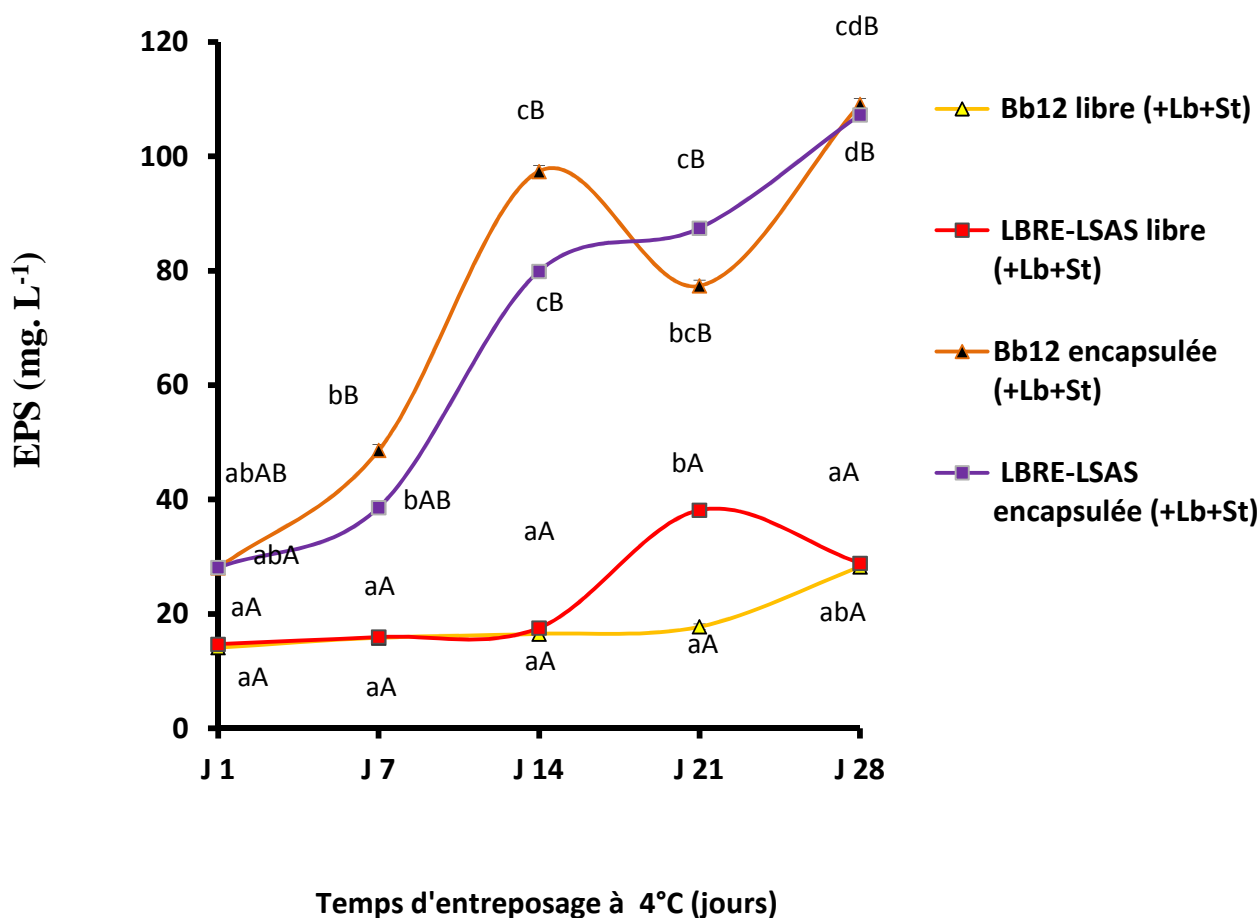
Dès le 1<sup>er</sup> jour (fig. 19), nous avons enregistré des quantités d'EPS presque similaires ( $P > 0.05$ ) dans les deux types de yaourts mixtes contenant l'une ou l'autre des deux bactéries bénéfiques encapsulées. Bien que faibles en début de la période de stockage, ces quantités étaient significativement élevées ( $P < 0.05$ ) comparativement à celles obtenues avec les mêmes cultures mixtes contenant ces mêmes bactéries bénéfiques mais non encapsulées. Les teneurs en EPS de ces yaourts au 7<sup>ème</sup> jour correspondent à celles trouvées dans les yaourts mixtes à bactérie bénéfique libre à la fin des 28 jours de conservation ( $\approx 8.6 \text{ mg. L}^{-1}$  en moyenne).

Par ailleurs, la production d'EPS tend à s'accroître ( $P < 0.05$ ) entre le 14<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour de stockage, où les valeurs passent de 19.43 à 109.49 et de 40.12 à 107.58  $\text{mg. L}^{-1}$ , notées respectivement dans les yaourts mixtes à Bb12 et à LBRE-LSAS encapsulées. Ces quantités d'EPS représentent, presque quatre fois celles ( $P < 0.05$ ) enregistrées dans les yaourts mixtes à Bb12 ou LBRE-LSAS libres (fig. 19).

Selon Kailasapathy (2006), l'amidon résistant entrant dans la composition du biogel pourrait contribuer à l'amélioration de la texture du yaourt qui reste toutefois, liée à l'activité protéolytique et à la production d'exopolysaccharides par les souches starters.

La souche *S. thermophilus* utilisé dans ce protocole est répertoriée légèrement productrice d'EPS (voir tableau 11 ; chapitre II) ; et c'est ce qui pourrait expliquer en partie les teneurs en EPS trouvées dans les yaourts. Ce constat est quelque peu consolidé par le taux élevé de viabilité de *S. thermophilus* en présence des souches bénéfiques encapsulées (Bb12 ou LBRE-LSAS) comparativement au yaourt mixte témoin (cellules libres).

L'augmentation des quantités d'EPS produites pourrait avoir des effets positifs sur la santé. Mis à part leur caractère prébiotique, les EPS ont été désignés comme étant candidats potentiellement hypocholestérolémiants, immunomodulateurs, anti-tumoraux ou antiulcéreux (Badel et al., 2011).



**Figure 19 :** Teneurs en exopolysaccharides (EPS) produits au cours de la conservation à 4°C des yaourts mixtes contenant Bb12 ou LBRE-LSAS libre ou encapsulée avec les starters de yaourt *S. thermophilus* «St» et *L. bulgaricus* «Lb». Les valeurs représentent la moyenne de trois essais indépendants et le maximum de déviation entre les trois mesures est de 5%. <sup>a-d</sup> valeurs différentes pour chaque type de yaourt. <sup>A-B</sup> valeurs différentes entre les différents yaourts et pour un temps d'entreposage particulier.

Les EPS pourraient aussi, grâce à leur caractère enrobant, protéger les cellules probiotiques durant leur transit gastro-intestinal. Une possible relation entre la production d'EPS chez les bactéries et leur résistance à la bile ou leur tolérance à l'acidité, a été récemment établie (Alp et Aslim, 2010).

Les EPS produits par les bactéries lactiques peuvent améliorer aussi les propriétés rhéologiques des produits laitiers fermentés, en particulier, ceux obtenus par coagulation acide du lait (Duboc et Mollet, 2001). Toutefois, la production d'EPS dans les milieux liquides est souvent évaluée par la mesure de la viscosité, même si cette dernière n'est pas nécessairement proportionnelle au rendement en EPS (Sebastiani et Zelger, 1998 ; Dupont et al., 2000; Gentès, 2011).

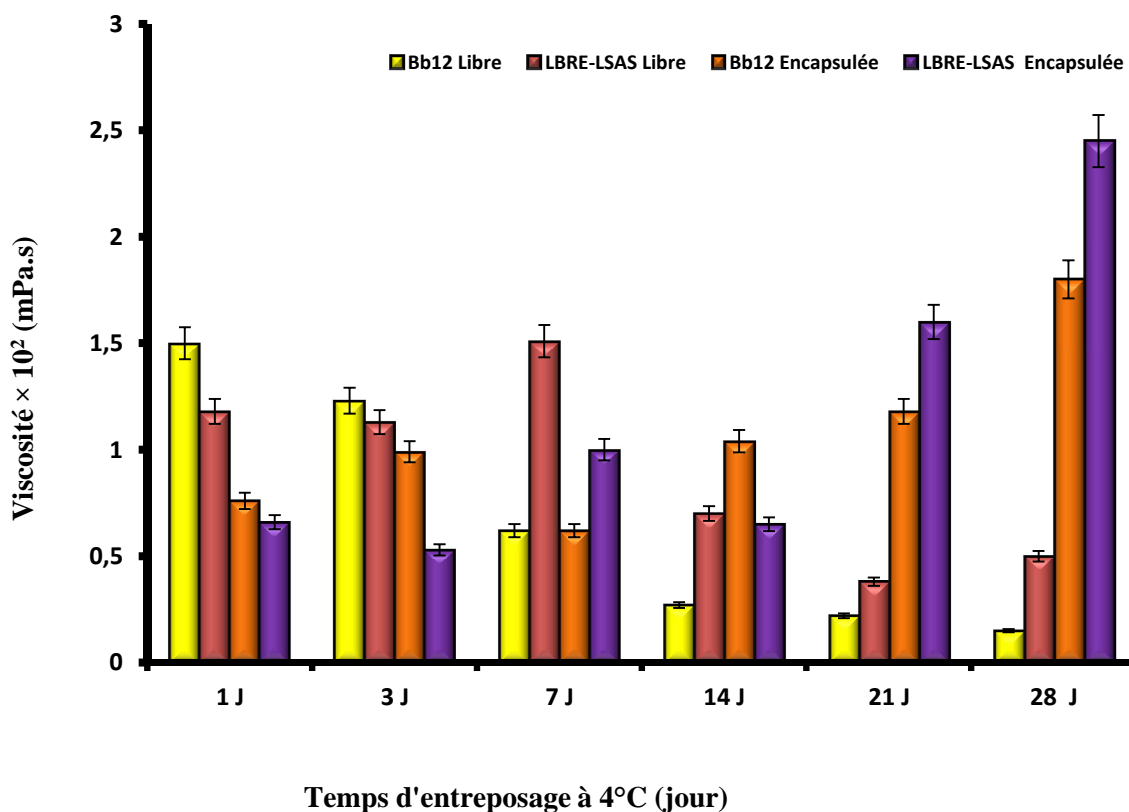
#### **IV.4.3. Effet de l'encapsulation de *B. lactis* Bb12 ou de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS sur la viscosité des yaourts mixtes entreposés à 4°C.**

La viscosité développée au cours de l'entreposage frigorifique des yaourts mixtes avec LBRE-LSAS ou Bb12 encapsulées ou libres et les souches starters «*S. thermophilus* TA 040 et *L. bulgaricus* LB340», est représentée dans la figure 20. Les résultats révèlent une bonne texture générée par une augmentation graduelle de la viscosité des yaourts contenant les cellules encapsulées.

Dans les yaourts mixtes témoins (avec Bb12 ou LBRE-LSAS libre), la viscosité a tendance à diminuer ( $P < 0.05$ ) du 1<sup>er</sup> au dernier jour de l'entreposage à 4°C ; de 150 à 15 mPa.s et de 118 à 50 mPa.s, notées respectivement en présence de Bb12 et LBRE-LSAS non encapsulée. Une diminution significative ( $P < 0.05$ ) a été observée au 14<sup>ème</sup> jour d'entreposage à 4°C, plus dans les yaourts mixtes à Bb12 ( $P < 0.05$ ) que dans ceux renfermant le lactobacille LBRE-LSAS. Cette diminution de la viscosité des yaourts mixtes témoins (bactéries libres) pourrait être liée aux pertes de biomasse enregistrées à ce niveau (fig. 20).

Le phénomène inverse a été observé dans les yaourts mixtes à cellules bénéfiques encapsulées (fig. 20). La viscosité augmente significativement ( $P < 0.05$ ) dès le 7<sup>ème</sup> jour de l'entreposage à 4°C, à l'exception de celle enregistrée dans les yaourts mixtes à LBRE-LSAS où une diminution significative ( $P < 0.05$ ) de la viscosité (de 100 à 65 mPa.s dans la période 7 - 14 jours) a été observée. Cette diminution pourrait être la conséquence de l'acidité très élevée notée à cette période (diminution de plus de 1 unité de pH).

Néanmoins, la viscosité des yaourts mixtes augmente de nouveau pour atteindre des maximums ( $P < 0.05$ ) au bout de 4 semaines d'entreposage à 4°C (fig. 20); soit 245 et 180 mPa.s dans les yaourts mixtes à LBRE-LSAS et Bb12 encapsulées, respectivement. Ainsi, il apparaît que la microencapsulation au gel d'alginate-Ca-AR influence positivement la texture des yaourts.



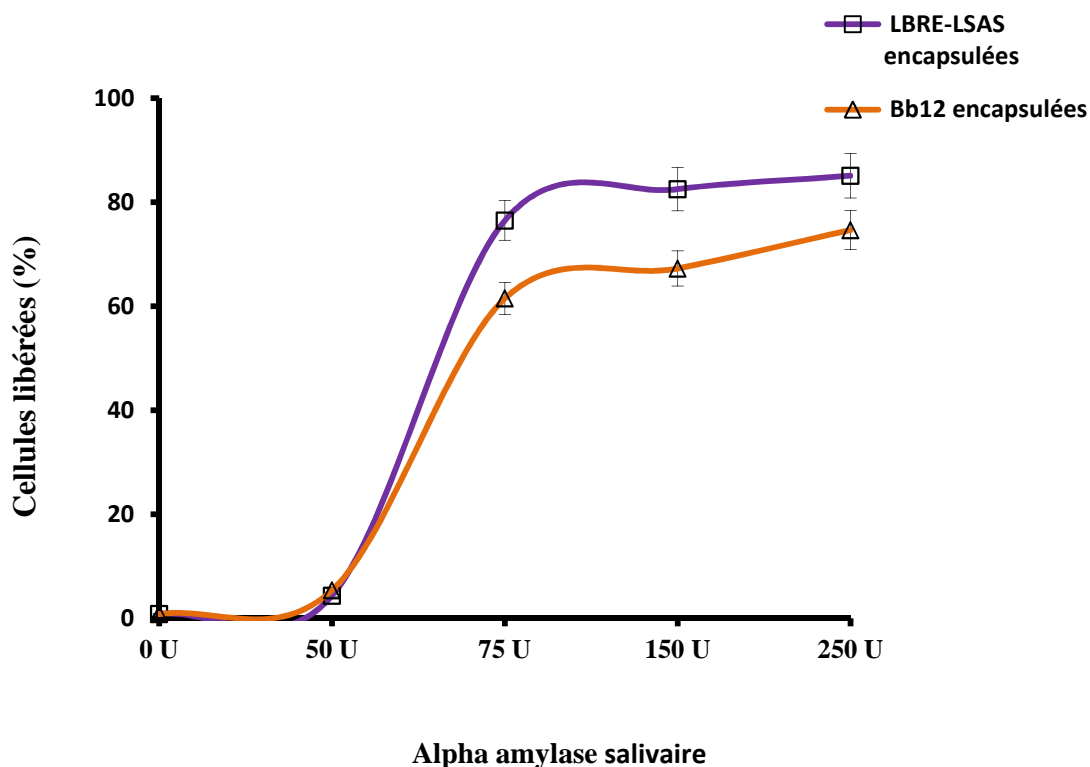
**Figure 20 :** Evolution de la viscosité (mPa.s) des yaourts mixtes à Bb12 ou LBRE-LSAS encapsulée ou libre (témoin). Les valeurs représentent la moyenne de trois essais indépendants et le maximum de déviation entre les mesures est de 10%.

Ce constat est en accord avec ceux de Doleyres et al. (2005) qui avaient suggéré que l'incorporation des bactéries lactiques encapsulées dans un polymère augmenterait la viabilité des cellules dans le yaourt, et améliorerait aussi les propriétés rhéologiques du gel (viscosité).

#### IV.4.4. Effet de l' $\alpha$ -amylase salivaire sur l'intégrité des microcapsules-alginate-Ca-AR formées.

L'effet de l' $\alpha$ -amylase salivaire sur la stabilité des microcapsules fabriquées de Bb12 et LBRE-LSAS est illustré dans la figure 21.

En absence d'amylase salivaire (0 U), très peu de cellules sont libérées de leur capsule ( $< \log 5$  UFC. mL<sup>-1</sup>) et ceci dans le cas des deux souches encapsulées.



**Figure 21 :** Résistance des microcapsules de Bb12 ou LBRE-LSAS, exposées 4 h à 37°C à de différentes concentrations d' $\alpha$ -amylase salivaire, exprimée en termes de biomasse libérée. Les résultats représentent la moyenne m de trois expériences indépendantes  $\pm$ SD (n=9).

A des concentrations largement supérieures ( $P < 0.05$ ) à celles trouvées dans la salive de l'homme adulte, il semblerait que la structure modifiée de l'amidon résistant utilisé dans ce protocole– et qui diffère de celle de l'amidon naturel– diminue la susceptibilité des capsules à la lyse par l' $\alpha$ -amylase.

D'après les résultats obtenus, peu de cellules libérées de Bb12 et LBRE-LSAS encapsulées ont été libérées quand les cultures étaient exposées à 50 U. Ceci indique que l'enzyme testée à cette concentration ne pouvait pas provoquer la lyse ( $P < 0.05$ ) du support artificiel rigide du produit. Ce n'est qu'en augmentant la concentration de l'amylase salivaire à 75 U qu'il y a lyse partielle de la capsule et libération de 61.5% de Bb12 et 76.5 % de LBRE-LSAS.

Lorsque les concentrations d'α-amylase salivaire sont beaucoup plus augmentées dans le mélange (250 U), la lyse des capsules est plus importante (fig. 21) et les cellules encapsulées sont libérées à un taux de 74.6% pour *B. lactis* Bb12 et 84.1% pour *L. rhamnosus* LBRE-LSAS ( $P < 0.05$ ).

Ces observations montrent que les capsules fabriquées sont résistantes à l'action de l'α-amylase salivaire, et ceci serait dû probablement à l'amidon résistant incorporé à la concentration de 2% dans le gel d'alginate. Ce taux est élevé comparativement à d'autres études ayant utilisé l'amidon dans la fabrication de matrices encapsulantes (Iyer et Kailasapathy, 2005; Zou et al., 2011).

Par conséquent, il y a lieu de considérer que l'intégrité des microcapsules d'alginate-Ca-AR n'est pas significativement remise en cause lors de leur passage par la partie supérieure du système digestif mimée d'une manière plus drastique (4 h d'exposition à 37°C) que ce qui prévaut dans la bouche. Nos résultats confirment aussi ceux de Haider et Husain (2008) qui avaient rapporté que la stabilité des capsules renfermant la β-galactosidase immobilisée dans un gel d'alginate et d'amidon était suffisamment élevée après 4 h de séjour à 37°C en présence de 200 U d'alpha amylase salivaire.

#### **IV.4.5. Résistance des souches encapsulées au jus gastrique et à la bile : « un modèle gastro-intestinal simulé ».**

L'enjeu du test consistait à définir les niveaux de résistance bactérienne aux effets négatifs de l'acidité et de la bile, ainsi qu'à élucider le rôle de la microencapsulation dans l'amélioration de cette résistance.

Ces informations sont essentielles à la promotion de la croissance et/ou la survie de souches d'intérêt digestif comme *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium lactis* Bb12.

##### **IV.4.5.1. Résistance des souches Bb 12 et LBRE-LSAS aux conditions gastriques simulées**

La résistance des souches Bb 12 et LBRE-LSAS libres ou encapsulées à l'hostilité du modèle gastrique simulé (MGS) a été appréciée dans une préparation alimentaire reproduisant le bol alimentaire, ajustée à pH 2 et agitée modérément sur une période d'incubation de deux heures. Une solution isotonique de NaCl (0.86%, p/v de pH 6.5) a été utilisée comme milieu témoin à l'égard des conditions stomacales.

Les résultats obtenus (figure 22) montrent que dans la préparation alimentaire, le nombre en cellules encapsulées viables n'était pas différent ( $P > 0.05$ ) de celui conféré par le milieu témoin isotonique après 2 h de séjour sous conditions stomacales simulées. En effet, la biomasse initiale ( $8 \log \text{ UFC. g}^{-1}$ ) n'a pas significativement diminué puisqu'elle diminue légèrement à 7.9 et 7.8 chez Bb12 et LBRE-LSAS, respectivement.

Contrairement aux cellules encapsulées, celles à l'état libre ont montré une forte diminution ( $P < 0.05$ ) de leur viabilité au vue des pertes (3 à 3.8 unités log) observées à la fin de l'exposition stomacale.

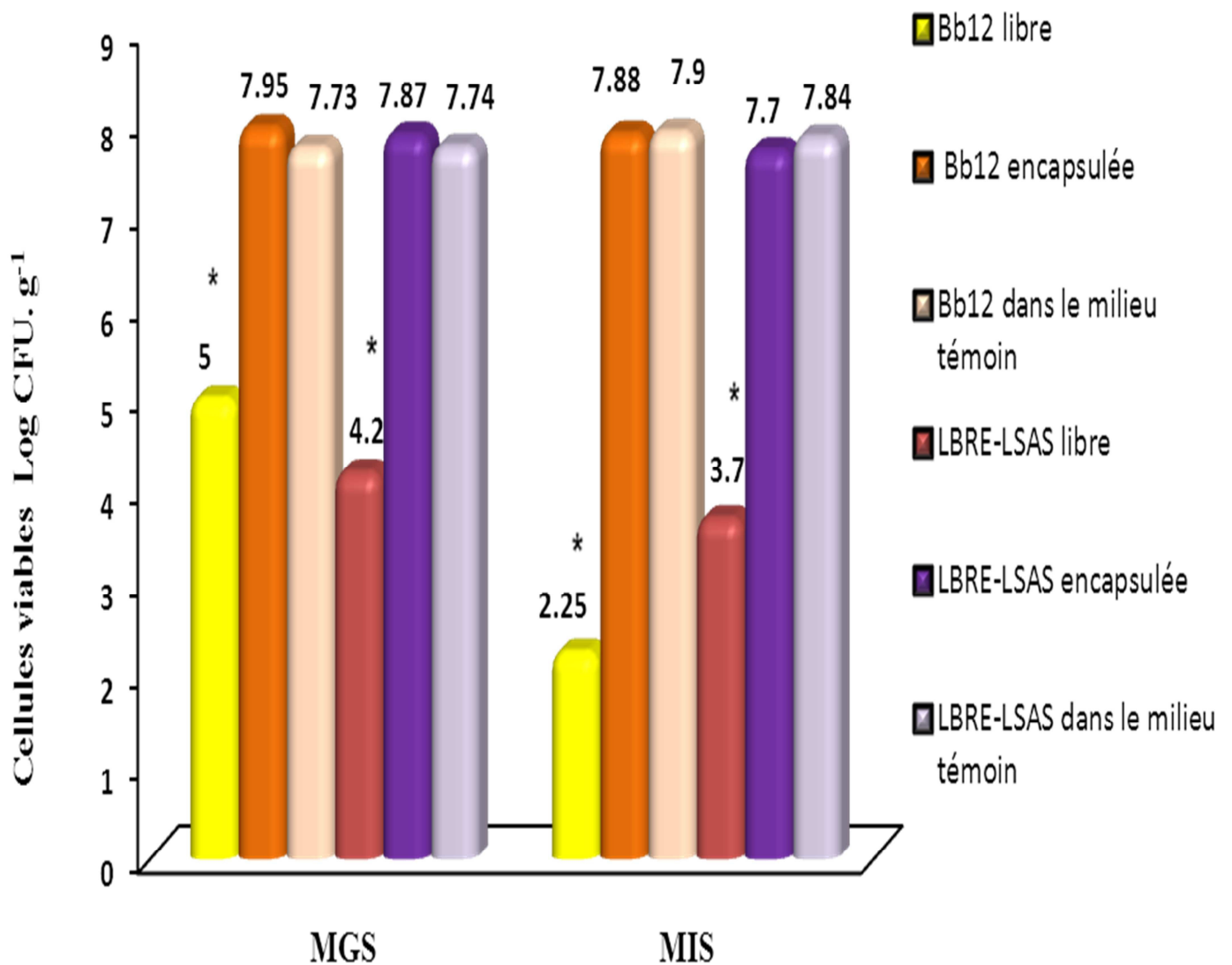
L'utilisation de l'encapsulation dans l'amélioration de la survie de bactéries d'intérêt aux conditions défavorables a été largement étudiée, mais les résultats étaient controversés.

Chandramouli et al. (2004); Iyer et Kailasapathy (2005); Muthukumarasamy et al. (2006) avaient tous souligné un effet très positif de l'encapsulation sur la survie des bactéries lactiques par rapport aux cellules libres lors de leur transit par l'estomac. Alors que d'autres études avaient rapporté le contraire, c'est-à-dire que l'encapsulation ne protégerait pas efficacement les bactéries sous conditions très acides (pH 1 ou 1.5) (Gbassi et al., 2009; Zou et al., 2011). D'autres études comme celle de Sultana et al. (2000) avaient constaté que l'utilisation de l'alginate pur pour encapsuler les bactéries n'était pas efficace pour les protéger contre les effets délétères de l'acidité. En revanche, Iyer et Kailasapathy (2005) ont constaté que la combinaison de l'amidon et de l'alginate comparé au gel d'alginate seul dans l'encapsulation de cellules permettrait une meilleure protection vis-à-vis de l'acidité gastrique. Ceci montre que l'efficacité de l'encapsulation est intimement liée aux matériaux utilisés dans la fabrication des gels.

#### **IV.4.5.2. Résistance des souches Bb 12 et LBRE-LSAS aux conditions intestinales simulées**

Les culots bactériens issus du premier test, ont été transférés séparément dans le modèle intestinal simulé (MIS) constitué de la même préparation alimentaire additionnée de bile (0.5%), de bicarbonate de sodium (0.25%) et réajustée à pH 6.5. Le milieu témoin à l'égard du MIS était la même préparation sans incubation.

Après 16 h d'incubation en anaérobiose à 37°C (figure 22), la biomasse Bb12 ou LBRE-LSAS encapsulée est restée presque constante ( $P > 0.05$ ), démontrant ainsi que la



**Figure 22 :** Effet de la microencapsulation sur la survie de *B. lactis* Bb 12 et LBRE-LSAS libres ou encapsulées (log UFC. g<sup>-1</sup>) aux conditions hostiles du modèle gastrique simulé (MGS, 2 h d'exposition au pH 2) et du modèle intestinal simulé (MIS, pH 6.5, 0.5% bile, 0.25% bicarbonate de sodium, 16 h). L'inoculum était ajusté à une concentration finale de  $8 \pm 0.5$  log UFC. g<sup>-1</sup>. \* Valeurs statistiquement significatives (P < 0.05).

microencapsulation a été efficace dans la préservation de la viabilité de ces deux souches vis-à-vis des conditions hostiles du modèle intestinal simulé. Cet effet pourrait être dû à une diffusion limitée de la bile à travers la matrice d'alginate de calcium renforcée par l'amidon résistant de type II.

Après les 16 h dans le MIS, la viabilité des deux souches à l'état libre (fig. 22) a été très significativement ( $P < 0.05$ ) réduite dans le MIS (2.25 et 3.7 log UFC. g<sup>-1</sup> de cellules viables seulement pour Bb12 et LBRE-LSAS, respectivement).

Le milieu MIS permet la lyse des microcapsules après 16 h d'incubation à 37°C, temps au bout duquel une biomasse de 7.88 et 7.7 log UFC. g<sup>-1</sup> est retrouvée pour les souches Bb12 et LBRE-LSAS respectivement. De telles biomasses correspondent à celles mesurées par les mêmes souches dans le milieu témoin MIS non incubé. Sachant que le transit par le côlon pourrait être réalisé en 0.8 à plus de 20 h (Vandamme et al., 2002), nous suggérons que c'est au niveau du côlon que ces bactéries pourraient être efficacement libérées pour exercer leur effet positif sur l'hôte.

Nos résultats sont comparables à ceux de Cook et al. (2012) qui avaient montré que des cellules encapsulées subissant le passage gastrique se libéraient après exposition au contenu intestinal porcin.

Cette spécificité de libération ciblée des cellules encapsulées pourrait aussi être engendrée par la structure résistante de l'amidon type II utilisé dans le gel mixte encapsulant. Englust et al. (1992) et Sun et Griffiths (2000) ont montré que l'amidon résistant utilisé pour l'encapsulation des bactéries probiotiques n'est pas dissous ou décomposé par l'acide gastrique ou l'activité enzymatique du pancréas, alors qu'il libère les cellules bactériennes une fois les capsules atteignent l'intestin.

Les observations de certaines études récentes vont dans le sens de la consolidation des effets bénéfiques sur la santé issus de l'utilisation de l'alginate et de l'amidon résistant. Sajilata et al. (2006) préconisent que l'amidon résistant aurait un effet prébiotique semblable à celui généré par les fibres insolubles ; alors que Harden et al. (2012) ont mis en évidence le mécanisme par lequel l'alginate module la glycémie postprandiale.

## IV.5. Conclusion

L'objectif de cette étude était de surmonter des obstacles technologiques majeurs liés aux laits fermentés de type « probiotiques », et qui sont –jusqu'à maintenant- jugés difficiles à résoudre, à savoir : délivrer des aliments à base de bactéries probiotiques viables à des taux

suffisamment élevés tout en améliorant les caractéristiques organoleptiques du produit fini. Ces bactéries probiotiques une fois ingérées, devraient aussi survivre au cours de leur transit gastro-intestinal afin d'atteindre l'organe cible et pouvoir y exercer leurs effets bénéfiques escomptés.

Pour optimiser la survie des probiotiques aux conditions hostiles, plusieurs scientifiques ont combiné l'alginate avec d'autres hydrogels pour renforcer la résistance des capsules. Dans la présente étude, la microencapsulation au gel d'alginate de calcium renforcée par l'addition de l'amidon résistant a été utilisée à cette fin.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence les capacités de survie et de résistance d'un lactobacille isolé de selles de bébés comparé à la souche probiotique de référence Bb12 aux conditions digestives simulées *in vitro* d'une part, et aux conditions qui requièrent le yaourt mixte comme aliment vecteur, d'autre part. La technique de microencapsulation mise en œuvre dans ce travail a permis de protéger efficacement les deux souches étudiées avec des différences de sensibilité. De telles observations, laissent penser que les deux matrices agissent en synergie dans la gélification, et par conséquent, elles offrent un environnement protecteur supplémentaire aux cellules bactériennes.

# **CHAPITRE V :**

**Effets d'ingrédients protéiques  
laitiers et de prébiotiques sur la  
survie à la bile et le pouvoir  
d'assimilation de cholestérol  
chez les quatre souches lactiques  
cultivées sur milieu MRS.**

## CHAPITRE V :

### Effets d'ingrédients protéiques laitiers et de prébiotiques sur la survie à la bile et le pouvoir d'assimilation de cholestérol chez les quatre souches lactiques cultivées sur milieu MRS.

#### V.1. Introduction

L'effet hypocholestérolémiant des peptides issus de l'ingestion des différentes protéines a été bien rapporté par Li et Papadopoulos (1998). De même que différentes souches lactiques sont capables d'assimiler le cholestérol. En revanche, il semblerait que le fait de combiner l'effet hypocholestérolémiant des protéines du lait au pouvoir d'assimilation de cholestérol des bactéries lactiques pourrait renforcer davantage l'effet escompté chez ces bactéries (Alhaj et al., 2010).

Par ailleurs, les synbiotiques, (un mélange de prébiotiques et de probiotiques), représentent une alternative pour le développement de nouveaux aliments laitiers fonctionnels avec des effets sanitaires plus élargis. Les synbiotiques agissent plus efficacement sur l'hypercholestérolémie comparés aux probiotiques seuls. Toutefois, dans la majorité des études *in vivo* réalisées dans ce but, l'amplitude (trouvée pro- et/ou prébiotique-dépendante) très variable des bénéfices procurés par les synbiotiques sur les taux de cholestérol total, de triglycérides ou de glucose (Lovegrove et Jackson, 2004 ; Moroti et al., 2012) laisse suggérer qu'il est nécessairement utile d'explorer encore *in vitro* les effets des prébiotiques sur le pouvoir d'assimilation de cholestérol chez les souches lactiques. Ce genre d'étude de base permet de mesurer l'effet spécifique de chaque souche lactique potentielle une fois combinée à son substrat prébiotique préféré, mais aussi de mieux clarifier l'origine de l'effet observé.

Ainsi, l'objectif principal de ce cinquième chapitre est de mesurer le pouvoir d'assimilation de cholestérol chez les quatre souches lactiques (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B12, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS, *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus* LB340 et *Streptococcus thermophilus* TA 040) cultivées sur milieu MRS en présence d'ingrédients protéiques laitiers (caséines ou hydrolysats protéiques) ou de divers prébiotiques (mannitol, raffinose, pectine ou lactulose). Ceci nécessite d'abord la vérification de l'effet de ces ingrédients sur le pouvoir de ces bactéries à produire l'enzyme d'hydrolase des sels biliaires (ou BSH= Bile Salt Hydrolase en anglais) et à résister la bile.

## V.2. Matériels et Méthodes

### V.2.1. Matériels

#### V.2.1.1. Souches utilisées

Il s'agit des quatre souches lactiques précédemment décrites en chapitre II : *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus* LB 340 et *Streptococcus thermophilus* TA 040.

Les cultures ont été maintenues vivantes à -70°C dans des cryotubes (Pro-Lab Diagnostics, UK). 72 heures avant le début de chaque expérience, les cultures sont revivifiées dans leur milieu approprié (MRS pour LB340, MRS-Cystéiné pour LBRE-LSAS et Bb12 et MRS 0.5% lactose pour TA040) par une série de trois transferts successifs. Chaque réactivation était réalisée à 37°C pendant 24 h sous conditions d'aérobiose (LB340 et TA040) ou en anaérobiose (LBRE-LSAS et Bb12, jarre d'anaérobiose + Anaérocult A).

Dans toutes les expériences, les cultures ont étéensemencées en phase exponentielle de croissance (18 h) à une densité cellulaire de l'ordre de  $10^7$  à  $5 \cdot 10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup>, sauf indication particulière.

#### V.2.1.2. Réactifs et ingrédients

- Sels biliaires : la bile utilisée est un mélange de sels biliaires (acide glycocholique, acide glycochéno-désoxycholique, acide taurocholique, acide tauro-désoxycholique et acide taurochéno-désoxycholique) d'origine bovine (Merck, Allemagne).
- Cholestérol : le cholestérol utilisé est une forme soluble pour culture « polyoxyéthanyl-cholesteryl sébacate » (Sigma, France).
- Ingrédients protéiques : la caséine ( $\beta$ -caséine du lait de vache, biochimik. Fluka analytical, Allemagne) et les hydrolysats de protéines laitiers Promilk 852A2 (International dairy ingredients IDI SAS, France) ont été ajoutés à raison d'une concentration finale de 11 mg. mL<sup>-1</sup> après une pasteurisation de 30 min à 80 °C au bain-Marie (Marshall et al., 1982). Cette concentration a été choisie selon l'étude d'Alhaj et al. (2010). La lysine (Sigma, France), prise comme témoin à l'égard de ces ingrédients protéiques, a été préparée de la même manière.
- Prébiotiques : tous les sucres sont utilisés à la concentration finale de 0.5 % (p/v) (déterminée d'après nos tests préliminaires) après leur microfiltration stérilisante (filtres

Whatman polysulfoné, 0.22 µm, Merck Millipore, Allemagne).

Quatre types de prébiotiques ont été testés. Le D-mannitol (Institut Pasteur, Alger), le raffinose (extrait d'oligosaccharides de grains de soja, Institut Pasteur, Alger), la pectine (pectine hautement méthylée, Lille Skensved, Danemark) et le lactulose ( $\geq 97\%$  lactulose, Merck, Darmstadt, Allemagne).

Le glucose et le lactose (Sigma, France) ont été utilisés comme témoins à l'égard de ces prébiotiques.

#### - Les milieux de culture

- ✓ Bouillon MRS : le bouillon MRS De Man, Rogosa et Sharpe (De Man et al., 1960), (Merck, VM10661) a été utilisé pour la réactivation de la souche LB340.
- ✓ Bouillon M17 : le bouillon M17 (Merck) est utilisé pour la réactivation de la souche TA 040 (Terzaghi et Sandine, 1975).
- ✓ MRS-cystéiné (MRS-C): c'est le milieu MRS additionné de L-chlorhydrate de cystéine à 0.05% (Ashraf et Shah, 2011) utilisé pour la réactivation des souches LBRE-LSAS et Bb12.
- ✓ Bouillon MRS modifié au thioglycollate de sodium (MRS-THIO): c'est le MRS additionné de thioglycollate de sodium (Sigma, France) à la concentration finale de 2 % (p/v).

### V.2.2. Méthodes

#### V.2.2.1. Vérification de l'identité des souches et ajustement de l'inoculum

Avant de procéder aux cultures, les souches bactériennes étudiées ont été sujettes aux colorations au bleu de méthylène et de Gram afin de vérifier la pureté des cultures et de confirmer leur identité. L'ajustement de l'inoculum a été effectué à l'aide d'une cellule de Thoma.

#### V.2.2.2. La fermentescibilité des ingrédients protéiques ou des prébiotiques

La fermentescibilité des ingrédients protéiques et des prébiotiques a été testée par la méthode de Zhang et al. (2007) :

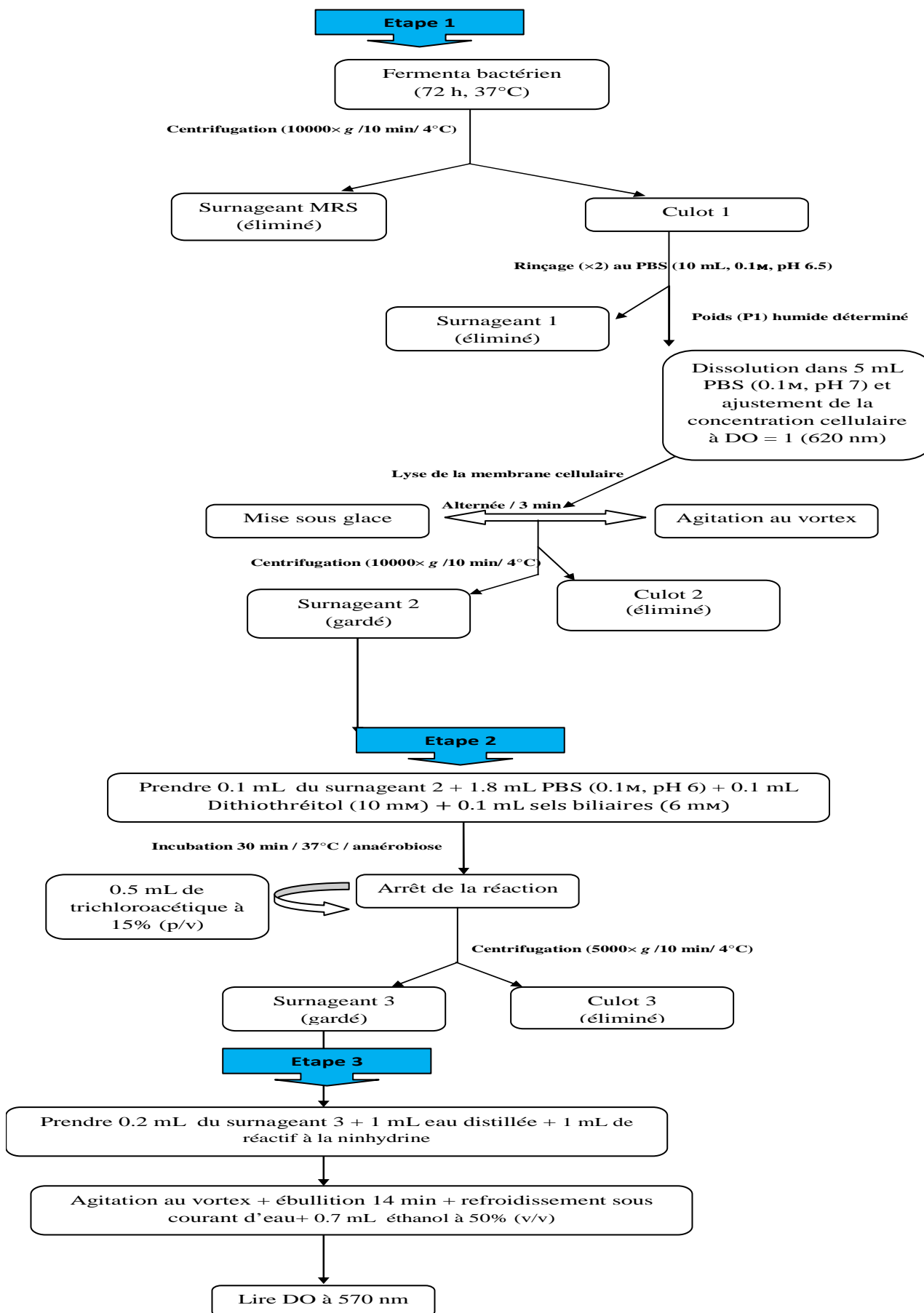
- Préparer le MRS-cystéiné bouillon avec 0.3% (p/v) glucose dans l'essai avec les ingrédients protéiques. Cette très faible quantité de glucose permet l'amorce de la fermentation des sources protéiques sans incidence sur le déroulement du métabolisme bactérien (Kimoto et al., 2002). Cette précaution a été prise étant donné que certaines souches lactiques ne se développent pas en présence d'une source d'azote exclusive. Dans l'essai avec les prébiotiques, le MRS-cystéiné est sans sucre et n'est pas additionné de 0.3% glucose (p/v).
- Ajouter l'inoculum d'une culture bactérienne jeune à 1% (LBRE-LSAS, Bb12, LB340 ou TA040).
- Ajouter les sources protéiques : caséine, hydrolysats de protéines laitiers ou lysine à une concentration finale de 11 mg. mL<sup>-1</sup> ou les sucres : mannitol, raffinose, pectine, lactulose, glucose ou de lactose à raison d'une concentration finale de 0.5 % (p/v).
- Incuber les tubes à 37°C pendant 24 h en anaérobiose (jarre d'anaérobiose avec système générateur de CO<sub>2</sub>, Anaérocult). L'incubation est réalisée en deux temps 24 et 48 h dans les essais avec sources protéiques.
- Les témoins sont préparés suivant le même mode opératoire sans inoculation.
- A la fin de l'incubation, tremper les préparations (échantillons et témoins) dans un bain glacé afin de stopper la fermentation.
- La croissance bactérienne est déterminée par mesure de la densité optique à 620 nm à l'aide de spectrophotomètre (Optizen Mecasys 7, Daejeon, Corée du Sud).

### V.2.2.3. Détermination de l'activité enzymatique de la BSH (Bile Salt Hydrolase)

Diverses cultures bactériennes en présence ou en absence d'ingrédients protéiques laitiers ou de prébiotiques ont fait l'objet du dosage de l'activité enzymatique d'hydrolase des sels biliaires (BSH, Bile Salt Hydrolase).

La procédure de détermination de cette activité enzymatique comporte trois étapes essentielles (Fig. 23) :

- La première étape démarre avec une culture bactérienne de 72 h et consiste à libérer la BSH par lyse physique (froid) de la membrane cellulaire.
- La deuxième étape consiste à la mise en œuvre de l'action de la BSH pour une quantité donnée de sels biliaires ajoutée dans le milieu réactionnel.
- La troisième étape consiste à doser les acides aminés libérés par déconjugaison des sels biliaires par la BSH. Une droite étalon glycine (0, 1, 1.5, 2.5 et 3 g glycine. L<sup>-1</sup>) a été utilisée.



**Figure 23** : Procédure de détermination de la BSH (Liong et Shah, 2005a).

- Le blanc réactif contient 2 mL tampon citrate + 2 mL ninhydrine + 2 mL eau distillée + 3 mL éthanol à 50 %.
- Les mêmes préparations sont refaites avec les échantillons témoins non inoculés par la culture microbienne, en prenant 2 mL du surnageant mélangé avec 2 mL du réactif ninhydrine et en ajoutant 3 mL d'éthanol à 50 %.
- Les protéines ont été dosées suivant la méthode de Bradford (1976) :
- Prélever 100 µL de surnageant.
- Ajouter 2 mL de réactif de Bradford.
- Bien mélanger, laisser reposer 10 min à température ambiante et lire les densités optiques à 595 nm au spectrophotomètre contre un blanc réactif.
- Les quantités de protéines totales dans les échantillons microbiens sont calculées par le biais d'une courbe d'étalonnage réalisée avec la sérum albumine bovine (0 à 3 g. L<sup>-1</sup>).

Une unité BSH totale est définie comme étant « la quantité d'enzyme qui libère 1µmoL d'acides aminés par substrat par min» (Liong et Shah, 2005a).

La BSH est estimée en activité spécifique exprimée en « Unités enzymatiques (U) par mg de protéines bactériennes» dans l'extrait cellulaire libre :

$$\text{Activité BSH spécifique (U. mg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Activité BSH Totale (U. mL}^{-1}\text{)}}{\text{Protéines totales (g. L}^{-1}\text{)}}$$

#### V.2.2.4. Procédure d'évaluation de la tolérance des souches à la bile

La tolérance des quatre souches à la bile a été testée par la méthode de Zhang et al. (2007) :

- Préparer le bouillon MRS sans glucose et sans peptone (la peptone constitue une source d'acides aminés libres qui pourraient aider la bactérie à survivre, Corcoran et al., 2005) et le distribuer dans des tubes à essai stériles.
- Ajouter la caséine, les hydrolysats de protéines ou de la lysine (11 mg. mL<sup>-1</sup>) ou de prébiotique (0.5 %) aux mêmes concentrations préalablement définies.
- Additionner à chaque tube les sels biliaires de façon à ce que leur concentration finale soit 0, 0.2, 0.3 ou 0.4% (p/v).
- Ajouter à chaque tube 1% d'inoculum d'une culture bactérienne jeune et dont la charge finale soit de 10<sup>7</sup> à 5. 10<sup>7</sup> cellules. mL<sup>-1</sup>.
- Incuber les tubes à 37°C pendant 12 h en anaérobiose (jarre d'anaérobiose avec système générateur de CO<sub>2</sub>, Anaérocult).
- Déterminer la croissance bactérienne par étalement sur milieu de culture adéquat.

- Le comptage de cellules viables de *L. bulgaricus* est réalisé sur milieu MRS acidifié (MRS-ac) à pH 5.4 (72 h à 43°C), de *S. thermophilus* sur M17 (48 h à 37°C), de *B. lactis* et *L. rhamnosus* sur MRS-cystéiné (72 h à 37°C). L'incubation des boîtes inoculées est faite en anaérobiose (Ashraf et Shah, 2011).
- L'expérience est répétée trois fois.

#### **V.2.2.5. Mesure de l'effet des ingrédients protéiques laitiers et de divers prébiotiques sur le pouvoir bactérien assimilateur de cholestérol**

Le même protocole expérimental décrit en chapitre II de ce manuscrit a été suivi selon la méthode de Danielson et al. (1989) modifié par Pereira et Gibson (2002b).

La caséine, les hydrolysats protéiques laitiers ou de la lysine (11 mg. mL<sup>-1</sup>) ou les prébiotiques (0.5 %) ont été ajoutés aux mêmes concentrations préalablement définies.

Dans l'expérience avec les ingrédients protéiques, les quantités en acides aminés libérés et en protéines restantes dans les surnageants des fermentas bactériens ayant séjourné en présence de cholestérol ont été dosés respectivement par les méthodes à la ninhydrine et de Bradford.

#### **V.2.2.6. Traitement statistique des résultats**

Le traitement statistique des résultats obtenus est réalisé par l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel STATISTICA (data analysis software system, version 8.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA, 2008). La différence est considérée significative à P<0.05.

La comparaison de moyennes a été réalisée par le test de Tukey. Tous les résultats représentent les moyennes issues de trois expériences indépendantes (n=9).

### **V.3. Résultats et discussion**

#### **V.3.1. Fermentescibilité des sources protéiques et des prébiotiques**

Les résultats relatifs aux tests préliminaires de la fermentescibilité des sources protéiques caséine, hydrolysats protéiques laitiers comparées à la lysine et des prébiotiques raffinose, mannitol, pectine, lactulose comparés aux glucose et lactose par les souches bénéfiques *L. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. animalis* subsp. *lactis* Bb 12, *S. thermophilus* TA040 et *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340, sont exprimés par la quantité de biomasse

**Tableau 19** : Fermentescibilité (DO\*<sub>620</sub> et pH<sup>♦</sup>) de la  $\beta$ -caséine et des hydrolysats protéiques laitiers par les souches lactiques sur milieu MRS<sup>‡</sup>.

Source protéique		Souches bactériennes							
		<i>L. rhamnosus</i> LBRE-LSAS		<i>B. lactis</i> Bb12		<i>S. thermophilus</i> TA040		<i>L. bulgaricus</i> LB340	
		24h	48 h	24h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<b><math>\beta</math>-Caséine</b>	pH	4.74 $\pm$ 0.02a	4.66 $\pm$ 0.01a	4.72 $\pm$ 0.01a	4.69 $\pm$ 0.00a	6.05 $\pm$ 0.01a	6.00 $\pm$ 0.02b	4.68 $\pm$ 0.02a	4.69 $\pm$ 0.01a
	D.O	2.232a	2.330a	2.518b	2.428b	1.676 a	2.109b	2.168b	2.144a
<b>Hydrolysats Protéiques Laitiers</b>	pH	4.81 $\pm$ 0.01a	4.64 $\pm$ 0.01a	4.77 $\pm$ 0.01a	4.74 $\pm$ 0.01a	5.59 $\pm$ 0.01a	5.47 $\pm$ 0.01a	4.67 $\pm$ 0.04a	4.71 $\pm$ 0.01a
	D.O	2.634b	2.522b	2.977c	2.570b	2.047b	1.878a	2.608b	2.003a
<b>Lysine (témoin)</b>	pH	5.13 $\pm$ 0.02b	5.10 $\pm$ 0.01b	5.00 $\pm$ 0.02b	5.00 $\pm$ 0.01b	6.50 $\pm$ 0.01b	6.49 $\pm$ 0.03c	5.02 $\pm$ 0.00b	4.96 $\pm$ 0.01b
	D.O	2.391a	2.564b	1.982a	1.680a	1.668a	1.914ab	1.668a	2.593b

♦ : Le pH est mesuré après 24 et 48 h d'incubation. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes  $\pm$  SD.

<sup>a-c</sup> : Valeurs significativement différentes (P<0.05) dans la même colonne et pour le même paramètre.

\* : Densité optique mesurée à 620 nm (D.O<sub>620</sub>) après 24 et 48 h d'incubation à 37°C en anaérobiose.

‡ : Bouillon MRS à 0.3% (p/v) glucose.

mesurée par turbidimétrie à 620 nm ( $DO_{620}$ ) après 24 et/ou 48 h d'incubation à 37°C sur le milieu MRS (Tableau 19 et 20).

Les densités optiques enregistrées après 24 h d'incubation en présence de caséine dans les cultures des souches étudiées varient ( $P < 0.05$ ) de 2.17 à 2.52, à l'exception de celle de la souche *S. thermophilus* qui ne dépasse pas 1.68. Ces résultats obtenus ne sont pas très différents ( $P < 0.05$ ) de ceux obtenus après 48 h d'incubation. Dans un contexte analogue, Dave et Shah (1997) ont rapporté que l'enrichissement du lait avec les hydrolysats de caséines trypsiques ou pancréatiques ou bien encore le fructose, stimule la croissance des lactobacilles. Zhao et al. (2006) avaient également constaté que la présence des hydrolysats protéiques dans le milieu de culture améliore la croissance des bactéries lactiques.

Dans cette étude, la fermentescibilité des hydrolysats de protéines laitières est plus ( $P < 0.05$ ) prononcée comparée à celle de la  $\beta$ -caséine dans toutes les cultures des souches étudiées. Ces dernières révèlent des quantités de biomasses élevées de 2.63, 2.98, 2.05 et 2.6 après 24 h d'incubation, notées respectivement chez *L. rhamnosus*, *B. lactis*, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*. La prolongation du temps de fermentation à 48 h provoque une diminution significative ( $P < 0.05$ ) de la biomasse de (0.4 à 0.6 unité de DO) *B. lactis* et *L. bulgaricus* et non significative ( $P > 0.05$ ) de celles de *L. rhamnosus* et *S. thermophilus*.

Il est à préciser que ces souches fermentent mieux ( $P < 0.05$ ) la  $\beta$ -caséine et les hydrolysats protéiques laitiers comparativement à la lysine prise comme témoin (Tableau 19).

En effet, avec cet acide aminé dans le milieu, la croissance bactérienne de *B. lactis* et *S. thermophilus* reste faible ( $< 2$  unités DO) après 24 et 48 h de fermentation.

Dans la culture de *L. bulgaricus*, une augmentation ( $P < 0.05$ ) de 0.9 unité DO qui atteint 2.6 quand la fermentation est prolongée à 48 h. Des observations analogues ont été rapportées par Dave et Shah (1998) et Sodini et al. (2002) concernant la stimulation de la viabilité des microorganismes probiotiques par des peptides bioactifs ou des acides aminés.

En présence de  $\beta$ -caséine, le pH initial diminue ( $P < 0.05$ ) en dessous de 6 dans les cultures de *L. rhamnosus*, *B. lactis* et *L. bulgaricus* et reste égale à 6 dans le cas de la souche *S. thermophilus* dont le pouvoir acidifiant semble être le plus faible (Tableau 19).

Il est important de noter que la plupart des bactéries lactiques possèdent deux pH d'activité protéolytique optimale: à pH 5.5 et à pH 7 (Rymaszewskir et al., 1972).

En présence des hydrolysats protéiques laitiers, nous avons également remarqué la capacité des souches bénéfiques à acidifier le milieu. Tous les pH enregistrés, que cela soit après 24 ou 48 h de fermentation, étaient inférieurs ( $P < 0.05$ ) à ceux du début de la fermentation (pH 6.53 en moyenne).

Dans les cultures de *L. rhamnosus*, *B. lactis* et *S. thermophilus*, cette diminution était de l'ordre de 0.17, 0.03 et 0.12 unité de pH, respectivement. En revanche, une légère ( $P > 0.05$ ) augmentation de pH (4.67 à 4.71) a été observée par *L. bulgaricus* quand la fermentation est prolongée à 48 h. Ces résultats sont accord avec ceux de Zhao et al. (2006).

La lysine ne confère pas de pouvoir acidifiant notable aux souches lactiques cultivées 48 h car de très faibles variations de pH (0 à 0.06 unité pH) ( $P > 0.05$ ) ont été enregistrées.

Les résultats de la fermentescibilité des prébiotiques traduisent des variations de biomasses selon la souche et le type de prébiotique utilisé (tableau 20). Les mêmes observations ont été faites par Huebner et al. (2007).

En comparant les souches testées, la fermentescibilité du glucose, traduite en quantité de biomasse, est plus prononcée dans les cultures de *L. rhamnosus* (DO=1.95) et *B. lactis* (DO=1.91) que dans celles de *S. thermophilus* (DO=0.72) et *L. bulgaricus* (DO=1.89) (tableau 20). En effet, il existe une proportionnalité linéaire entre la disponibilité du glucose dans le milieu et l'amélioration de la viabilité des bactéries (Shabala et al., 2002).

Dans le présent travail, c'est en présence du lactose que la souche bifide accumule le plus la biomasse la plus élevée ( $P < 0.05$ ), au-delà de 2 (tableau 20).

Il est admis que la quasi-totalité des souches de bifidobactéries se différencient des bactéries lactiques par une forte activités enzymatique  $\alpha$ -Glucosidase et  $\alpha$ -Galactosidase. Cette propriété a été précédemment décrite par les travaux de Lee et al. (1986) et ceux de Desjardins et al. (1990).

La fermentescibilité du mannitol génère moins de biomasse que celle du glucose. Les biomasses enregistrées étaient inférieures ( $P < 0.05$ ) à celles enregistrées en présence du sucre témoin. En revanche, si on compare la fermentescibilité de mannitol par toutes les souches testées, il apparaît que ce sont *B. lactis* et *L. bulgaricus* qui assimilent le plus ( $P < 0.05$ ) ce sucre (tableau 20).

**Tableau 20** : Fermentescibilité (DO\*<sub>620</sub> et pH<sup>♦</sup>) des prébiotiques par les souches lactiques sur milieu MRS<sup>‡</sup>.

Source carbonée		Souches bactériennes			
		<i>L. rhamnosus</i> LBRE-LSAS	<i>B. lactis</i> Bb12	<i>S. thermophilus</i> TA 040	<i>L. bulgaricus</i> LB 340
<b>Glucose</b> (témoin)	pH	4.23 ± 0.01a	4.65 ± 0.02c	5.80 ± 0.00d	4.53 ± 0.03b
	DO	1.95 ± 0.08c	1.91 ± 0.06d	0.72 ± 0.07a	1.89 ± 0.04c
<b>Lactose</b> (témoin)	pH	4.69 ± 0.02b	4.41 ± 0.00a	4.95 ± 0.02c	4.72 ± 0.01b
	DO	1.67 ± 0.08b	2.09 ± 0.05d	1.68 ± 0.01d	1.96 ± 0.05d
<b>Mannitol</b>	pH	4.86 ± 0.03c	4.43 ± 0.01a	5.03 ± 0.04d	4.54 ± 0.04b
	DO	1.57 ± 0.08b	1.75 ± 0.08c	1.12 ± 0.01b	1.70 ± 0.02c
<b>Raffinose</b>	pH	5.11 ± 0.03a	5.16 ± 0.06a	5.20 ± 0.01b	5.18 ± 0.00ab
	DO	1.39 ± 0.01a	1.36 ± 0.02b	1.25 ± 0.01c	1.37 ± 0.01b
<b>Pectine</b>	pH	5.15 ± 0.02b	5.12 ± 0.01b	5.25 ± 0.03c	5.04 ± 0.01a
	DO	1.12 ± 0.03a	0.88 ± 0.04a	1.04 ± 0.02b	1.08 ± 0.01a
<b>Lactulose</b>	pH	4.12 ± 0.01b	4.09 ± 0.01b	4.15 ± 0.03b	3.75 ± 0.07a
	DO	2.04 ± 0.01c	1.98 ± 0.03d	1.92 ± 0.03e	2.04 ± 0.01d

♦ : Le pH est mesuré après 24 h d'incubation. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes ± SD.  
<sup>a-c</sup> : Valeurs significativement différentes (P<0.05) dans la même colonne et pour le même paramètre. \* : Densité optique est mesurée à la longueur d'onde 620 nm (D.O<sub>620</sub>) après 24 h d'incubation à 37°C en anaérobiose. ‡ : Bouillon MRS sans sucre.

Avec le raffinose dans le milieu de culture (tableau 20), toutes les souches affichent des quantités de biomasse moins élevées ( $P < 0.05$ ) par rapport aux témoins (glucose et lactose) ; variant de 1.25 à 1.39 en moyenne.

La capacité des microorganismes à métaboliser les glucides indigestes dépend de leur activité glycosidique (Noriega et al., 2004). Martinez-Villaluenga et Gómez (2007) supposent que le catabolisme des oligosaccharides à base de raffinose chez les bactéries probiotiques est de type inductible des  $\alpha$ -galactosidases.

De plus, il apparaît que la capacité des *Lactobacillus* sp et des *Bifidobacterium* sp à fermenter les prébiotiques est liée à la fois à la spécificité du substrat et à la souche bactérienne elle-même (Kaplan et Hutkins, 2000). Dans la présente étude, la fermentescibilité de la pectine (tableau 20) par les souches testées est moins importante ( $P < 0.05$ ) comparativement aux autres prébiotiques étudiés, ce qui pourrait être expliqué par le taux élevé de ses groupements méthyles comme cela a été déjà souligné dans les travaux de Dongowski et al. (2000) et d'Olano-Martin et al. (2002). La quantité de biomasse la plus basse (0.88) était obtenue avec la souche bifide.

En présence du lactulose dans le milieu de culture, les souches bactériennes donnent les quantités de biomasse les plus élevées comparativement à celles notées avec les autres prébiotiques étudiés. Par ailleurs, les valeurs enregistrées sont identiques ou légèrement élevées à celles obtenues avec les sucres témoins. Les *Lactobacillus* sp se comportent d'une manière similaire ( $P > 0.05$ ) et affichent les valeurs de biomasse les plus élevées (2.04) comparés aux autres souches.

Selon Bezkorovainy (2001), le lactulose n'est pas fermenté dans le petit intestin et atteint le cæcum sous sa forme indigeste, ce qui représente un substrat prébiotique de choix pour la microflore intestinale. Les prébiotiques augmentent la survie et la capacité des microorganismes probiotiques à produire les acides organiques, en améliorant leur pouvoir métabolique (Martinez-Villaluenga et Gómez, 2007).

Plusieurs microorganismes sont capables de métaboliser les sucres indigestes avec production d'une variété de métabolites comme les acides gras à courte chaîne AGCC (acides acétique, propionique et butyrique), les autres acides organiques (acides lactique et succinique) et les gaz ( $H_2$ ,  $H_2S$ ,  $CO_2$  et  $CH_4$ ) (Van der Meulen et al., 2005).

Les pH de milieux additionnés de 0.5% (p/v) de prébiotique ne diminuent pas en-dessous des valeurs enregistrées avec les sucres témoins, excepté avec le lactulose et où la souche *L. bulgaricus* s'est révélée la plus acidifiante (pH 3.75).

L'acidification la moins importante pour toutes les souches testées a été observée en présence de 0.5% (p/v) de pectine ( $5.04 \leq \text{pH} \leq 5.25$ ) ou de raffinose ( $5.11 \leq \text{pH} \leq 5.20$ ). Ces pH moins acides traduisaient le faible pouvoir acidifiant des souches en présence de ces prébiotiques, ce qui corrobore avec la croissance moyenne enregistrée (test de fermentescibilité). De telles observations ont été également rapportées par Klaver et Van der Meer (1993).

### V.3.2. Effet des ingrédients protéiques laitiers et des prébiotiques sur l'activité enzymatique de la BSH bactérienne

La déconjugaison des sels biliaires a été désignée par l'OMS comme l'une des principales activités des microorganismes à potentiel bénéfique, et par lequel ils sont considérés comme probiotiques (FAO/OMS, 2002). La BSH, appelée aussi « Cholylglycine hydrolase », est l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse des sels biliaires conjugués à la glycine et/ou taurine en résidus d'acides aminés et sels biliaires libres (Tahri et al., 1995).

Dans la présente étude, le niveau de l'activité BSH initial varie selon la souche. La souche bifide *B. lactis* est caractérisée par une forte activité spécifique de l'ordre de  $0.97 \text{ U. mg}^{-1}$  par rapport aux autres souches testées. Pour les *Lactobacillus* sp, la souche *L. rhamnosus* a une activité spécifique ( $0.43 \text{ U. mg}^{-1}$ ) inférieure ( $P > 0.05$ ) à celle de *L. bulgaricus*, de l'ordre de  $0.47 \text{ U. mg}^{-1}$ ; alors que *S. thermophilus* affiche une activité BSH spécifique de  $0.87 \text{ U. mg}^{-1}$  (tableau 21).

Begley et al. (2006) ont confirmé que l'activité BSH des bactéries intestinales est une réponse aux effets toxiques engendrés par la bile. Elle est mesurée par la détermination de la quantité d'acides aminés résultant de la déconjugaison des sels biliaires. Les espèces *Lactobacillus acidophilus* (Corzo et Gilliland, 1999) et *Lactobacillus johnsonii* (Elkins et Savage, 1998); ainsi que des souches appartenant au genre *Bifidobacterium* sp (Tanaka et al., 2000) se sont révélées productrices de grandes quantités de BSH.

Les acides aminés libérés à partir des sels biliaires déconjugés peuvent servir comme source de carbone et d'azote (la glycine) ou métabolisés en ammoniacque et dioxyde de carbone. En plus, la taurine pourrait être utilisée comme source d'ammoniacque, dioxyde de carbone ou de sulfate (Begley et al., 2006).

**Tableau 21 :** Effets des ingrédients protéiques laitiers sur l'activité enzymatique spécifique de BSH\* (U. mg<sup>-1</sup> protéines) dans les cultures des souches étudiées en phase stationnaire.

	Témoins <sup>#</sup>	Lysine	β-Caséine	Hydrolysats protéiques laitiers
<i>Lactobacillus</i>				
<i>rhamnosus</i>	0.42 ± 0.05a	0.25 ± 0.01a	0.62 ± 0.05b	0.91 ± 0.03b
<b>LBRE-LSAS</b>				
<i>Bifidobacterium</i>				
<i>lactis</i>	0.97 ± 0.01c	0.79 ± 0.02c	1.07 ± 0.08d	1.13 ± 0.05c
<b>Bb12</b>				
<i>Streptococcus</i>				
<i>thermophilus</i>	0.87 ± 0.01b	0.62 ± 0.04b	0.97 ± 0.01c	1.16 ± 0.01c
<b>TA040</b>				
<i>Lactobacillus</i>				
<i>bulgaricus</i>	0.47 ± 0.01a	0.27 ± 0.02a	0.48 ± 0.03a	0.55 ± 0.02a
<b>LB340</b>				

\* : Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes ± l'écart type. <sup>a-d</sup> Valeurs sont significativement différentes (P<0.05) dans la même colonne.

L'activité BSH est mesurée à partir d'extraits cellulaires de cultures âgées 72 h, en présence ou non (témoin<sup>#</sup>) de lysine, de β-caséine ou d'hydrolysats protéiques laitiers dans le MRS-cys 0.3% glucose supplémenté de bile (concentration finale 6 mM).

Selon Burns et al. (2010), l'activité BSH est nécessaire au probiotique pour maximiser ses chances de survie dans le tractus gastro-intestinal. De plus, la déconjugaison des sels biliaires génère des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, comme par exemple, la diminution du niveau du cholestérol sérique. Il est donc souhaitable de vérifier si un probiotique possède une activité BSH avant sa mise sur le marché pour ses bénéfices escomptés. Par ailleurs, il est important de souligner que l'enzyme BSH est intracellulaire et l'analyse des surnageants de cultures en phase stationnaire n'a révélé aucune activité enzymatique.

Cette observation est similaire à celle rapportée par Tanaka et al. (2000). C'est la raison pour laquelle, il est nécessaire de procéder à la lyse des cellules pour libérer cette enzyme dans les surnageants.

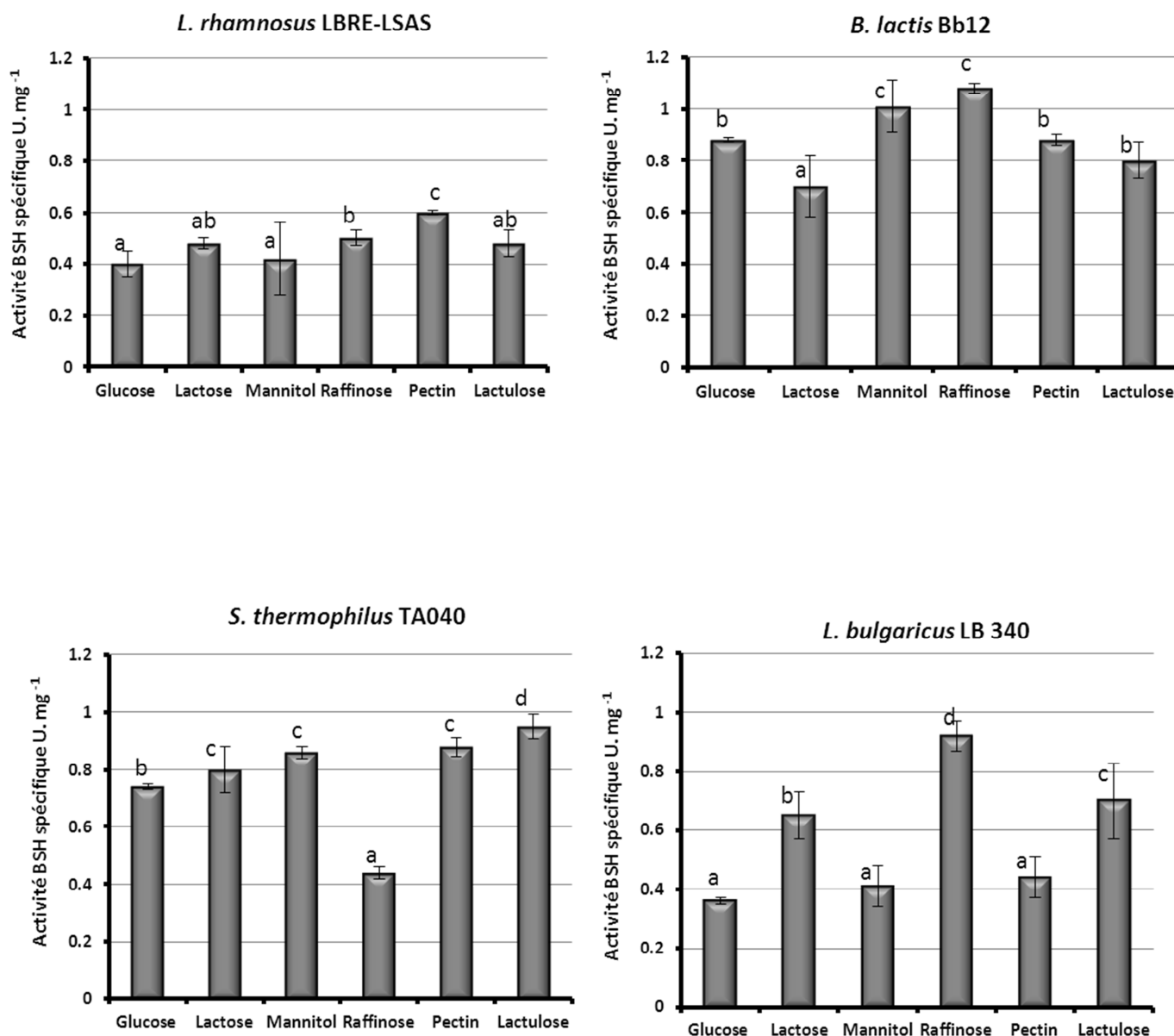
La modulation de l'activité BSH des souches étudiées cultivées en présence de bile (6 mM) et d'ingrédients protéiques laitiers ou de prébiotiques, est illustrée dans le tableau 21 et la figure 24.

L'activité BSH des souches testées varie de 0.25 à 1.16 U. mg<sup>-1</sup> sous l'effet des ingrédients protéiques laitiers (tableau 21), et de 0.36 à 1.08 U. mg<sup>-1</sup> (figure 24) en présence des divers prébiotiques utilisés.

Parmi les ingrédients protéiques laitiers testés, ce sont les hydrolysats protéiques laitiers qui stimulent le plus l'activité BSH qui prend des valeurs de l'ordre de 0.55, 0.91, 1.13 et 1.16 U. mg<sup>-1</sup>, notées chez *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *B. lactis* et *S. thermophilus*, respectivement. Cette activité BSH est beaucoup plus faible en présence de la lysine prise comme témoin à l'égard des sources azotées testées. Ceci pourrait refléter le faible pouvoir de survie des souches après 72 h d'incubation en présence de bile et de lysine.

En présence de  $\beta$ -caséine, les valeurs de BSH étaient aussi améliorées mais restent inférieures à celle notées avec les hydrolysats protéiques laitiers. De même, les souches protéolytiques *S. thermophilus* et *B. lactis* Bb12 expriment les activités les plus élevées ( $P < 0.05$ ) comparées au reste des souches.

Concernant l'effet des prébiotiques, *S. thermophilus* et *B. lactis* expriment aussi les activités spécifiques de BSH les plus élevées ( $P < 0.05$ ), de l'ordre de 0.95 et 1.08 U mg<sup>-1</sup> en présence de lactulose et de raffinose, respectivement. Pour la souche intestinale *L. rhamnosus*, seuls le raffinose et la pectine stimulent ses activités BSH.



**Figure 24:** Effets des prébiotiques (0.5%, p/v) sur l'activité spécifique de BSH (U. mg<sup>-1</sup>) dans les extraits cellulaires des cultures de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. lactis* Bb 12, *S. thermophilus* TA040 et *L. bulgaricus* LB340 en phase stationnaire de croissance. <sup>a-d</sup> Valeurs significativement différentes (P<0.05).

D'une manière générale, l'effet du prébiotique sur les bactéries lactiques étudiées apparaît comme souche-dépendant. Ainsi, le mannitol et le raffinose augmentent l'activité BSH de la souche bifide, alors que le lactulose seul et/ou le raffinose modulent celle de *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus*, respectivement (fig. 24).

Dans une étude d'optimisation de l'expression de BSH chez *Lactobacillus buchneri*, Sridevi et al. (2009) avaient constaté que certaines sources de carbone (saccharose) ou d'azote (mélange de peptone et d'extrait de levure) pouvaient augmenter l'activité BSH chez cette bactérie.

Les mécanismes par lesquels les sources azotées ou carbonées améliorent la production bactérienne de BSH ne sont pas encore bien élucidés. Néanmoins, De Smet et al. (1995) avaient attribué ces effets aux quantités élevées d'ATP générées par cet apport de protéines et de prébiotiques.

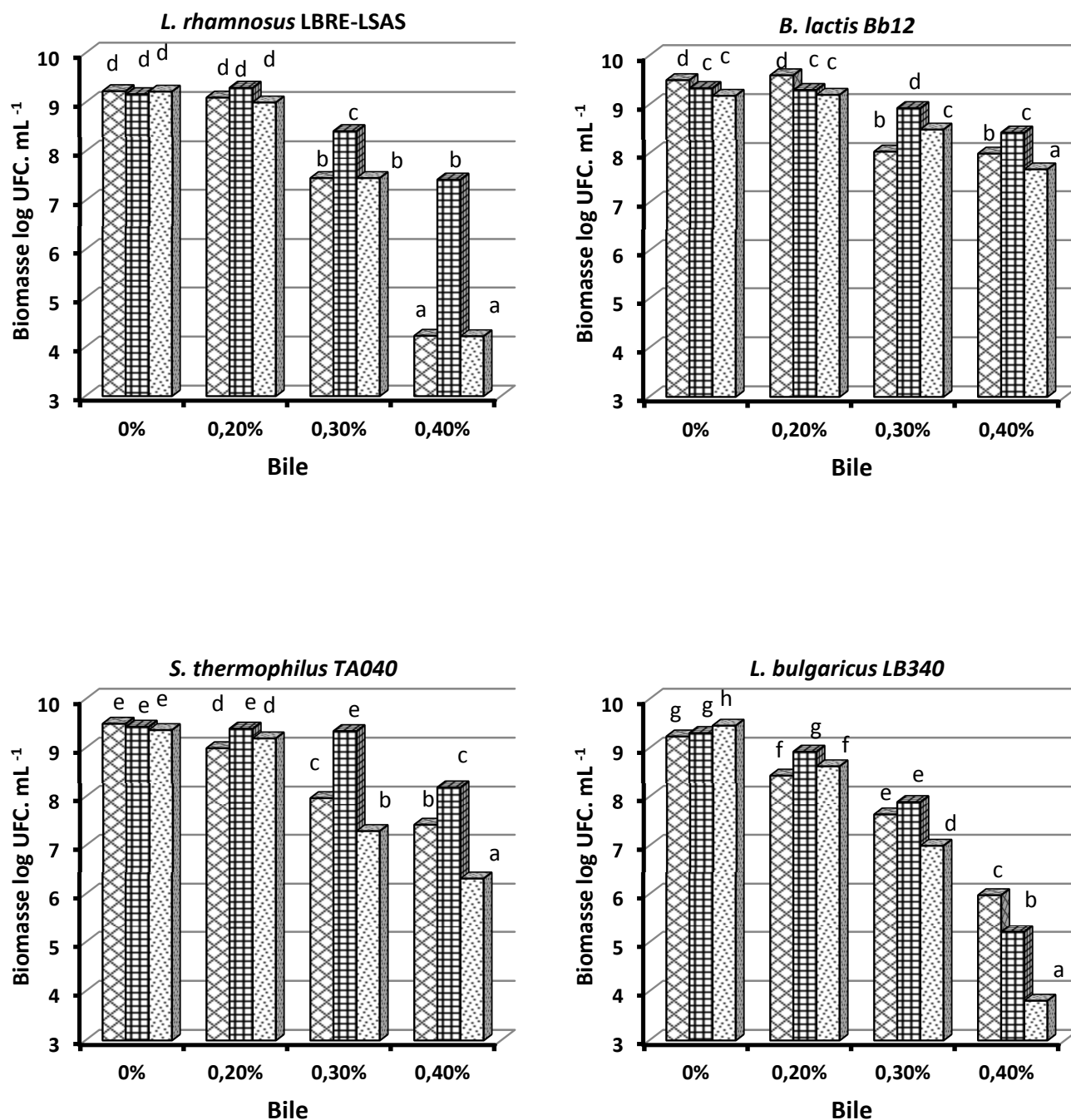
Par ailleurs, Patel et al. (2004) avaient suggéré l'existence d'une relation entre l'amélioration de l'activité BSH des souches lactiques et leur tolérance aux sels biliaires. C'est pourquoi nous explorons aussi le pouvoir des souches à survivre 12 h en présence de bile.

### **V.3.3. Effets des sources protéiques et des prébiotiques sur la survie des souches bénéfiques en présence de bile.**

Les résultats relatifs au pouvoir de survie des souches bénéfiques testées (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *B. lactis* et *L. rhamnosus*) à la toxicité des sels biliaires (0, 0.2, 0.3 ou 0.4%, p/v) sont reportés dans les figures 25 et 26 où ils sont exprimés en terme de quantité de cellules viables après 12 h de séjour en présence d'ingrédients protéiques laitiers ou de prébiotiques.

Selon les résultats obtenus, il a été constaté qu'en présence de sels biliaires et de  $\beta$ -caséine (fig. 25) dans le milieu de culture, les bactéries étudiées conservent à la fin des 12 h d'incubation de bonnes quantités de biomasse ( $P < 0.05$ ), et qui sont supérieures à  $7.4 \log \text{ UFC. mL}^{-1}$ , excepté le cas des lactobacilles en présence de 0.4% de bile. Les souches *B. lactis* et *S. thermophilus* affichent les quantités de biomasse les plus élevées, même si la diminution de cette biomasse était de l'ordre de 1.5 à 2 unités log quand la bile était rajoutée à une concentration de 0.3 ou 0.4%.

En présence des hydrolysats protéiques (fig. 25), la survie des souches étudiées était la mieux ( $P < 0.05$ ) conservée, plus particulièrement avec *B. lactis* et *S. thermophilus* qui



**Figure 25 :** Biomasse (log UFC. mL<sup>-1</sup>) des différentes souches lactiques étudiées après 12 h de culture en présence de bile et de divers ingrédients protéiques ( $\beta$ -caséine , hydrolysats protéiques laitiers ou lysine ). <sup>a-h</sup> Valeurs significativement différentes (P<0.05).

démontrent une tolérance souche-dépendante à la bile ajoutée. Les lactobacilles étaient aussi les souches les plus touchées par l'effet néfaste de la bile à 0.4%, mais il semblerait que *L. rhamnosus* résiste mieux ( $P < 0.05$ ) que *L. bulgaricus* étant donné que leur biomasse diminue respectivement de 1.6 et 2.1 unités log.

Chez les bactéries à Gram positif, les sources protéiques sont utilisées dans la réparation de la membrane cellulaire affectée par les conditions défavorables de croissance ; en l'occurrence l'acidité et la bile (Azcarate-Peril et al., 2004). Dans l'étude de Burns et al. (2010), l'addition du lait écrémé (20%, p/v) améliore la tolérance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* aux conditions gastro-intestinales simulées (jusqu'à 1% bile).

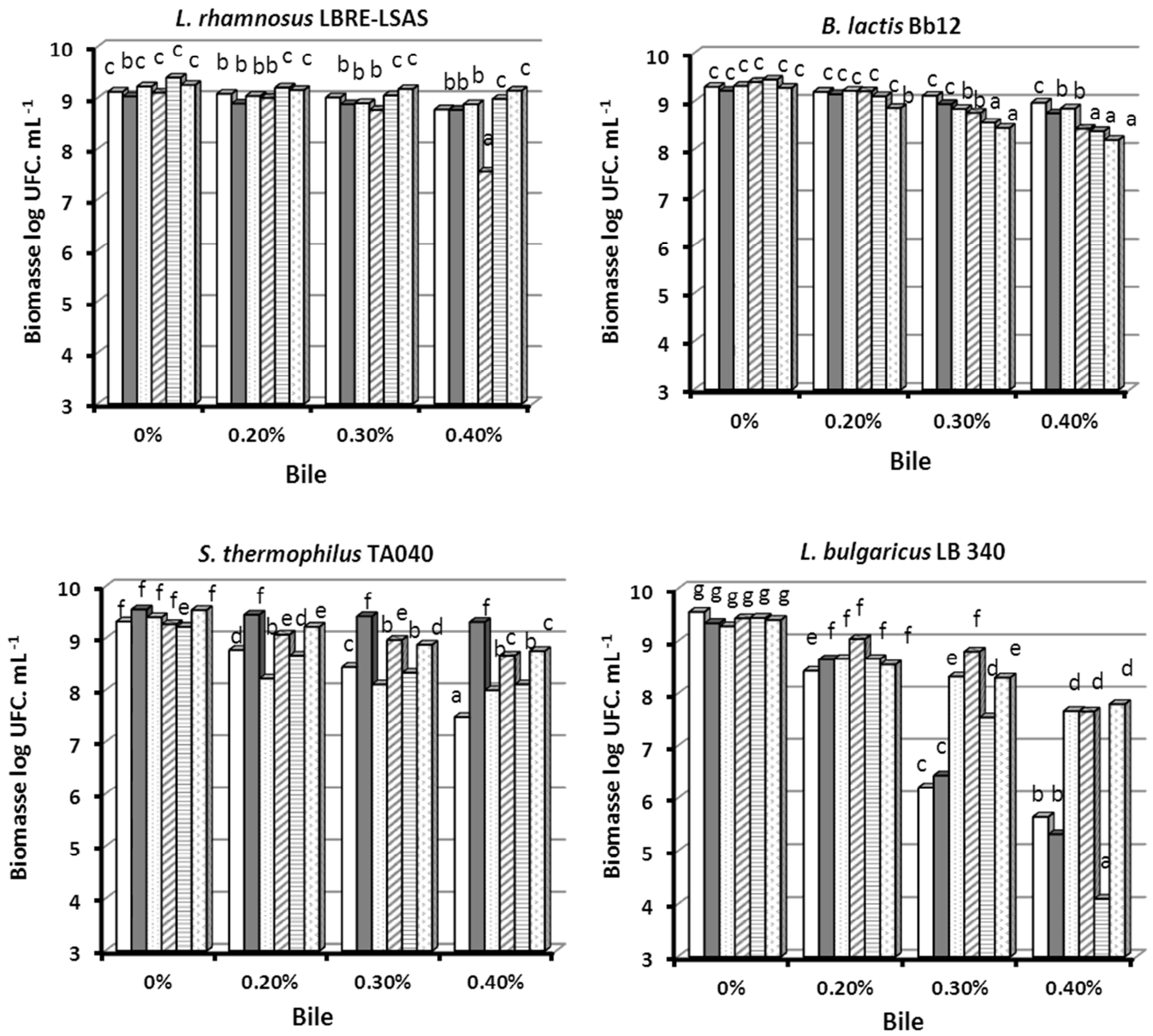
En présence de la lysine dans le milieu de culture (fig. 25), moins de biomasse ( $P < 0.05$ ) a été enregistrée par comparaison à la caséine et aux hydrolysats de protéines. La biomasse était de l'ordre de 4.22 et 3.81 log UFC. mL<sup>-1</sup> chez *L. rhamnosus* et *L. bulgaricus*, 7.66 log UFC. mL<sup>-1</sup> chez *B. lactis* et 6.32 log UFC. mL<sup>-1</sup> chez *S. thermophilus*.

La souche *L. bulgaricus* a encore une fois montré ses limites à tolérer la toxicité de la bile comparativement aux autres souches testées, étant donné les pertes en biomasse très significatives ( $P < 0.05$ ) enregistrées (5.65 unités log).

Azcarate-Peril et al. (2004) soulignent que des acides aminés inducteurs des décarboxylases comme la lysine, contribuent à l'homéostasie bactérienne en augmentant le pH intracellulaire *via* un mécanisme de transport décarboxylation-antiport.

La présence de source azotée libre (i.e, les acides aminés) augmente aussi la résistance des bactéries lactiques à la bile (Patel et al., 2004). En effet, les protéases bactériennes Clp chez *L. acidophilus* et *L. reuteri* ont été détectées suite à l'exposition de ces bactéries à la bile présentes dans le milieu de culture (Pfeiler et al., 2007; Whitehead et al., 2008). Ceci suggère l'existence d'un mécanisme moléculaire de contrôle assez complexe chez les bactéries lactiques pour qu'elles puissent faire face à la toxicité de la bile.

Dans une étude récente sur une souche de *Vibrio vulnificus*, Chen et al. (2010) ont démontré l'utilité des sources protéiques dans l'expression de la résistance bactérienne à la bile. Ces auteurs ont trouvé que l'addition respective des inhibiteurs d'efflux (carbonyl cyanide m-chlorophénylhydrazone) ou de synthèse protéique (chloramphénicol) élimine complètement ou altère significativement le mécanisme d'adaptation de cette souche à la bile.



**Figure 26 :** Biomasse (log UFC. mL<sup>-1</sup>) des différentes souches lactiques étudiées après 12 h/37°C de culture en présence de bile et de divers prébiotiques (glucose □, lactose ■, mannitol ▤, raffinose ▨, pectine ▩ ou lactulose ▧). <sup>a-g</sup> Valeurs significativement différentes (P<0.05).

En présence du prébiotique considéré et qui est utilisé comme la seule source de carbone (fig. 26), la capacité des souches étudiées à survivre à la bile fluctue considérablement ( $P < 0.05$ ).

Avec le glucose comme sucre témoin, la souche bifide et le lactobacille intestinal LBRE-LSAS démontrent une meilleure résistance à la bile ; surtout à la forte concentration (0.4%) testée (fig. 26). Les autres sucres (lactose, mannitol, raffinose, pectine et lactulose), diminuent tous la résistance à la bile de la souche bifide ; alors que la pectine et le lactulose améliorent ( $P < 0.05$ ) celle de *L. rhamnosus*.

*L. bulgaricus* s'est révélée être la souche la plus sensible ( $P < 0.05$ ) (fig. 26) à l'effet toxique de la bile comparée au reste des souches étudiées, particulièrement en présence de glucose ou de lactose dans le milieu. En revanche, les prébiotiques mannitol, raffinose et lactulose améliorent ( $P < 0.05$ ) tous sa résistance à la bile ajoutée, mais non à une concentration supérieure à 0.3%. Par conséquent, l'augmentation de la concentration de bile à 0.4% dans le milieu de culture, provoque une perte de biomasse équivalente à 2 unités log ( $P < 0.05$ ).

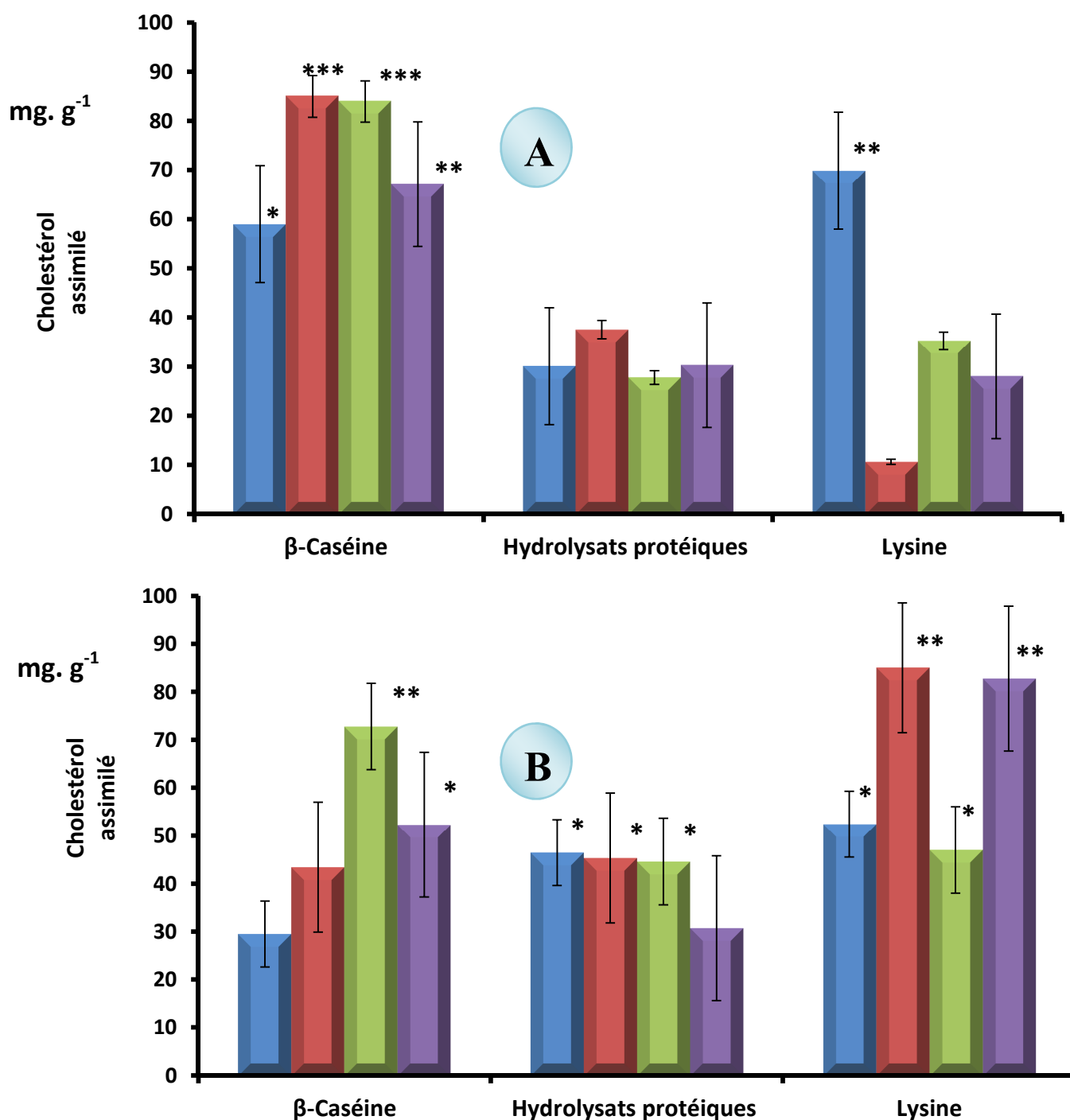
En ce qui concerne le starter streptocoque, précédemment décrit comme tolérant à la bile (Foligne et al., 2007), sa tolérance à la bile semblerait être grièvement affectée en présence du glucose comme seule source de carbone dans le milieu de culture. Toutefois, tous les autres sucres testés améliorent sa résistance à la bile, plus remarquablement avec le lactose où la biomasse enregistrée avec (0.4%) ou sans bile était presque la même ( $P > 0.05$ ) (fig. 26).

D'une manière générale, nos résultats révèlent que l'expression de la résistance bactérienne à la bile conférée par une source d'énergie est souche-dépendante, car il n'y a pas une source protéique ou un prébiotique particulier qui pourrait aider toutes les souches lactiques à la fois, à résister à l'effet délétère de la bile.

Nos résultats montrent aussi que la résistance à la bile en présence des sources protéiques reste inférieure à celle conférée par les prébiotiques, et ce pour l'ensemble des souches étudiées. Ces observations sont analogues à celles rapportées par Patel et al. (2004).

#### **V.3.4. Effets des ingrédients protéiques laitiers et de prébiotique sur le pouvoir d'assimilation *in vitro* de cholestérol par les bactéries lactiques**

Dans cette expérience, nous avons exploré l'effet de divers ingrédients protéiques laitiers et de prébiotiques sur le pouvoir d'assimilation *in vitro* de cholestérol par les bactéries étudiées. Les résultats sont exprimés en quantité de cholestérol assimilé (mg) par poids bactérien sec (g) et sont représentés dans les figures 27 et 28.



**Figure 27 :** Cholestérol assimilé *in vitro* (mg. g<sup>-1</sup>) par les bactéries lactiques étudiées : *L. rhamnosus* LBRE-LSAS (■), *B. lactis* Bb12 (■), *S. thermophilus* TA 040 (■) et *L. bulgaricus* LB340 (■) cultivées 24 (A) et 48 h (B) dans le milieu MRS-THIO (0.3%, p/v bile) additionné d'une source protéique (11mg. mL<sup>-1</sup>) β-caséine ou hydrolysats protéiques laitiers comparée à la lysine. L'inoculum provenant d'une culture jeune (18 h) est de 10<sup>7</sup> à 5. 10<sup>7</sup> UFC. mL<sup>-1</sup> et utilisé à 1% (v/v). Le cholestérol est ajouté à une concentration finale de 65-85 μg. mL<sup>-1</sup>. \* : P<0.05, \*\* : P<0.01 et \*\*\* : P<0.001. Les comparaisons ont été faites pour une même durée de fermentation.

Une variation très importante ( $P < 0.05$ ) a été observée entre les différentes souches dans leur pouvoir d'assimilation de cholestérol en présence des diverses sources protéiques en anaérobiose dans un milieu à 0.3% de bile (figure 27).

Avec la lysine utilisée comme témoin à l'égard de  $\beta$ -caséine et des hydrolysats protéiques laitiers, toutes les souches testées ont montré un pouvoir de réduction du cholestérol disponible dans leur milieu après 24 h de culture (figure 27).

Les résultats ont montré que l'assimilation du cholestérol en présence de cet acide aminé était de l'ordre de 69.88 ( $P < 0.05$ ), 10.65, 35.24 et 28.03 mg. g<sup>-1</sup> (fig. 27A) dans les cultures de *L. rhamnosus*, *B. lactis*, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, respectivement ; ce qui représente respectivement 30.2, 2.5, 4 et 8.3 fois leur activité initiale assimilatrice de cholestérol dans le milieu MRS sans glucose et rapportée dans le chapitre II (voir fig. 10).

Dans la présente expérience et après une prolongation dans la durée d'incubation à 48 h (fig. 27B), une amélioration dans l'aptitude assimilatrice de cholestérol chez ces souches a été observée. L'assimilation était totale ou approximativement à 99%, respectivement chez la souche bifide ( $P < 0.01$ ) et le lactobacille starter du yaourt ; alors que *S. thermophilus* a assimilé 12.2 mg. g<sup>-1</sup> de plus par rapport à son activité calculée pour 24 h de culture. La souche *L. rhamnosus* a fait l'exception en affichant plutôt une diminution ( $P < 0.05$ ) de son pouvoir d'assimilation de cholestérol où nous avons enregistré une valeur de 52.41 mg. g<sup>-1</sup> (fig. 27B).

En présence de caséine et après 24 h d'incubation (fig. 27A), le cholestérol est assimilé par toutes les souches testées. *S. thermophilus* et *B. lactis* ont épuisé presque la totalité ( $P < 0.001$ ) du cholestérol rajouté en assimilant 85 et 83.94 mg. g<sup>-1</sup>, respectivement ; soit 9.8 à 19.7 fois leur activité initiale assimilatrice de cholestérol dans le milieu MRS sans glucose et rapportée dans le chapitre II (voir fig. 10). L'assimilation de cholestérol chez les lactobacilli *L. bulgaricus* et *L. rhamnosus* est moindre ( $P < 0.05$ ) (67.14 et 59 mg. g<sup>-1</sup>, respectivement).

Cependant, la prolongation de l'incubation à 48 h (fig. 27B) réduit ( $P < 0.05$ ) de moitié ce pouvoir d'assimilation de cholestérol chez *L. rhamnosus* (29.48 mg.g<sup>-1</sup>) et *B. lactis* (29.48 43.45 mg.g<sup>-1</sup>). Les starters du yaourt affichent une légère et distincte ( $P > 0.05$ ) diminution de 6.7 à 12.2 mg. g<sup>-1</sup> comparée à leur activité mesurée à 24 h.

Paradoxalement, la présence des hydrolysats protéiques laitiers (figure 27) dans le milieu de culture stimule ( $P < 0.05$ ) l'assimilation *in vitro* de cholestérol par les souches quand l'incubation est prolongée à 48 h.

Les souches *L. rhamnosus* et *S. thermophilus* assimilent en moyenne 30 mg. g<sup>-1</sup> (fig. 27A) et 45 mg. g<sup>-1</sup> (P< 0.05) de cholestérol après 24 et 48 h d'incubation (fig. 27B), respectivement. Cette prolongation du temps d'incubation n'a pas beaucoup d'effet (P>0.05) sur la quantité de cholestérol assimilé par la souche bifide et le starter lactobacille qui passe de 36.14 et 30.3 mg. g<sup>-1</sup> (à 24 h) à 39.94 et 30.7 mg. g<sup>-1</sup> (à 48 h).

Des données récentes d'une étude *in vitro* (Alhaj et al., 2010) montrent que l'augmentation du niveau d'hydrolyse des caséines est en corrélation directe avec la diminution du niveau du cholestérol. En effet, des hydrolysats de caséine formés (11 mg. ml<sup>-1</sup> de caséine) par l'action combinée des trypsines et de la souche *B. animalis* subsp. *lactis* ont montré des effets hypocholestérolémians remarquables où la réduction de cholestérol était de l'ordre de 51.5 et 87.5% après 24 et 48 h d'incubation, respectivement.

Les résultats du dosage des acides aminés présents dans les cultures bactériennes supplémentées de cholestérol, avant et après fermentation bactérienne de caséine et d'hydrolysats de protéines, sont reportés en annexe. Les quantités générées sont comparées aux quantités initiales calculées dans les cultures témoins.

Avant incubation, les acides aminés libres dans les cultures additionnées des sources protéiques testées représentaient 7 à 13.2%. Après 24 h d'incubation à 37°C, 57 à 71% et 91 à 94% du contenu total en acides aminés sont libérés par les bactéries bénéfiques en fermentant la  $\beta$ -caséine et les hydrolysats de protéines, respectivement. Après 48 h, ces valeurs diminuent significativement (P< 0.05) avec la  $\beta$ -caséine comme substrat de fermentation dans les cultures de *B. lactis*, *S. thermophilus*, et très significativement (P< 0.01) dans la culture de *L. bulgaricus* avec les hydrolysats de protéines laitiers. La quantité d'acides aminés libérée par les souches lactiques après 24 h d'incubation n'est pas significativement différente (P> 0.05) de celle enregistrée après 48 h d'incubation (8% d'écart seulement).

Globalement, nos résultats en terme de quantité d'acides aminés libérée, et plus particulièrement ceux notés avec la souche bifide, semblent être en accord avec les données publiées par Alhaj et al. (2010).

Selon Hosono et Tano-Oka (1995), l'assimilation du cholestérol alimentaire par les cellules de lactobacilles contenues dans différents produits laitiers fermentés varie selon les souches et les espèces présentes. En effet, la différence dans le pouvoir assimilateur de cholestérol pourrait être due aux propriétés chimiques et structurales de la couche de peptidoglycane de la paroi bactérienne.

Dans une étude *in vivo* réalisée par Jain et al. (2009) sur des souris soumises à un régime standard supplémenté par un lait fermenté par des lactobacilles. La souche *L. acidophilus* a affiché le pouvoir assimilateur de cholestérol le plus élevé (79%) suivi de celui de *L. casei* (67%) et de *L. lactis* (29%). De même que plusieurs d'autres auteurs ont également signalé que les lactobacilles ou les bifidobactéries seuls ou incorporés dans les produits laitiers fermentés possèdent un pouvoir hypocholestérolémiant (Liong et Shah, 2005 a et b; Al-Sheraji et al., 2012 ; Awaisheh et al., 2013).

Chez le lapin, Canzi et al. (2000) avaient rapporté que l'ajout de probiotiques dans une diète à base de caséine réduisait significativement le taux de cholestérol total. Antérieurement à cela, une équipe de chercheurs (Meinertz et al., 1989) avait prodigué la supériorité de l'effet hypocholestérolémiant induit chez les humains par les caséines comparées aux protéines de soja.

Il a été aussi suggéré que les hydrolysats trypsiques de caséine (Belitz et al., 2009) au même titre que les protéines de soja -les seules protéines répertoriées hypocholestérolémiantes par la US Food and Drug Administration- (Kritchevsky et al., 1982 ; Morita et al., 1997) génèrent leur effet hypocholestérolémiant par interaction des résidus d'acides aminés arginine ou lysine avec la molécule de cholestérol.

Sur le plan mécanistique, il a été suggéré que des liaisons hydrogène pourraient être établies entre les groupements hydroxyles de la molécule de cholestérol et les groupements guanidinium des résidus d'arginine (Li et al., 2001), ou les groupements  $\epsilon$ -amino de la lysine. Apparemment, l'arginine peut former deux liaisons hydrogène par chaîne. La lysine, pour sa part, ne peut former qu'une seule liaison hydrogène de faible stabilité.

La présence des sucres témoins (glucose et lactose) a permis d'améliorer de 1.5 à 10 fois les pouvoirs initiaux d'assimilation de cholestérol chez les souches étudiées et qui sont rapportés dans le chapitre II de cette thèse (voir, fig.10).

En présence de glucose dans le milieu, le pouvoir assimilateur de cholestérol des starters du yaourt est le plus ( $P < 0.05$ ) élevée (19.1 mg. g<sup>-1</sup> chez *S. thermophilus* et 33.91 mg. g<sup>-1</sup> chez *L. bulgaricus*) comparativement à celui des deux autres souches qui ne dépassait pas 14 mg. g<sup>-1</sup> (figure 28).

Avec le lactose comme seule source de carbone, les starters du yaourt et *L. rhamnosus* assimilent plus ( $P < 0.01$ ) de cholestérol (11.77 à 18.15 mg. g<sup>-1</sup>) que la souche bifide (6.54

mg. g<sup>-1</sup>). Dans une étude *in vivo* menée chez le lapin Dilmi-Bouras et Sadoun (2002) avaient montré que *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* pourraient avoir une action l'hypercholestérolémiant.

La bonne activité assimilatrice de cholestérol, observée chez *L. rhamnosus* en présence des sucres témoins (glucose et lactose), est toutefois quasiment ( $P < 0.001$ ) supprimée dans un milieu de culture contenant spécifiquement le mannitol (fig. 28) comme seule source de carbone (diminution de 3.1 à 4 fois).

La souche *L. bulgaricus*, pour sa part, a affiché une forte capacité d'assimilation de cholestérol qui dépasse les 26.7 mg. g<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ), mais qui reste, cependant, inférieure à celle observée en présence du glucose ( $P < 0.05$ ). La souche bifide dévoile aussi un bon ( $P < 0.05$ ) pouvoir assimilateur de cholestérol (22 mg. g<sup>-1</sup> en présence de mannitol ; soit une augmentation de 1.6 à 3.4 fois comparé aux sucres témoins). Ce résultat pourrait être expliqué par son activité BSH élevée en présence de ce prébiotique.

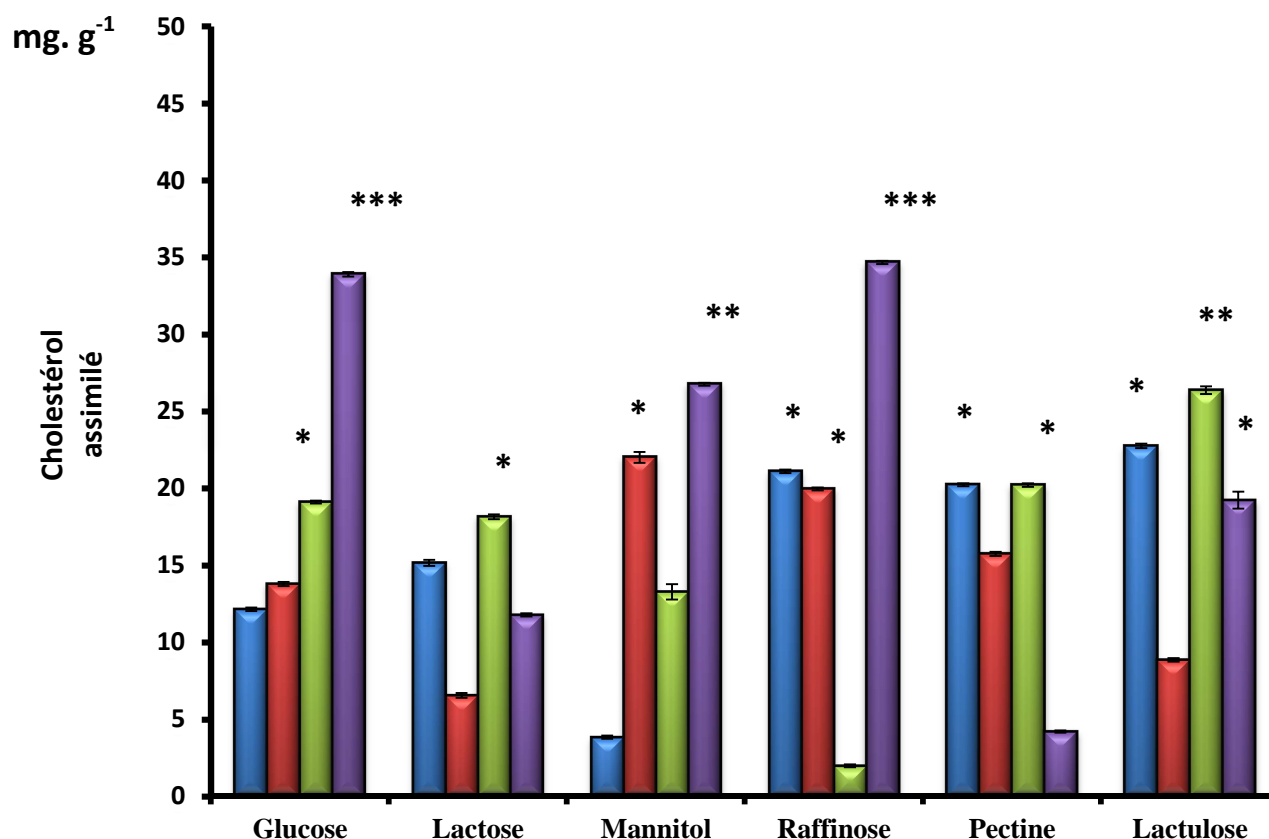
Dans la présente expérimentation et en présence de raffinose, les souches *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus* et *B. lactis* ont un pouvoir assimilateur de cholestérol assimilé le plus ( $P < 0.001$ ) élevée (~20 à 34.7 mg. g<sup>-1</sup>), alors que le celui chez les streptocoques semblerait être pratiquement perdu (1.96 mg. g<sup>-1</sup>). Cette fluctuation dans les résultats trouvés pourrait être due à la nature de la souche testée.

Dans le cas de la pectine, ce sont *L. rhamnosus* et *S. thermophilus* qui assimilent le plus ( $P < 0.05$ ) de cholestérol (20.2 mg. g<sup>-1</sup> chacune) (fig. 28), suivies de la souche bifide (15.73 mg. g<sup>-1</sup>) et de *L. bulgaricus* (4.19 mg. g<sup>-1</sup>).

Les observations relatives aux lactobacilles montrent que deux souches appartenant au même genre bactérien pourraient avoir des expressions différentes liées à la nature de la source carbonée qu'elles préfèrent.

La quantité de cholestérol assimilé est appréciable ( $P < 0.05$ ) chez toutes les souches testées avec du lactulose (exceptée la souche bifide), plus particulièrement chez la souche *S. thermophilus* ( $P < 0.05$ ) où nous avons enregistré une valeur qui dépasse les 26.3 mg. g<sup>-1</sup>.

*L. rhamnosus* enregistre son pouvoir d'assimilation de cholestérol le plus ( $P < 0.05$ ) élevé (22.75 mg. g<sup>-1</sup>) en présence de lactulose, et ceci par comparaison aux résultats obtenus avec les autres prébiotiques étudiés.



**Figure 28 :** Cholestérol assimilé ( $\text{mg. g}^{-1}$ ) par les souches bactériennes étudiées : *L. rhamnosus* LBRE-LSAS (■), *B. lactis* Bb12 (■), *S. thermophilus* TA 040 (■) et *L. bulgaricus* LB340 (■) cultivées 24 h à 37°C dans le milieu MRS-THIO (0.3%, p/v bile) additionné d'un prébiotique (0.5%, p/v) mannitol, raffinose, pectine ou lactulose (glucose et lactose, sont les sucres témoins) utilisé comme la seule source de carbone. L'inoculum est issu d'une culture jeune (18 h), contient  $10^7$  à  $5 \cdot 10^7$  UFC.  $\text{mL}^{-1}$  et est utilisé à 1% (v/v). Le cholestérol est ajouté à une concentration finale de 65-85  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$  et \*\*\* :  $P < 0.001$ . Les comparaisons ont été faites pour une même durée de fermentation.

En somme, il semblerait que le prébiotique ou la source protéique préféré chez une souche lactique particulière améliore sa survie à la bile et stimule son activité assimilatrice de cholestérol, mais indépendamment de ses aptitudes fermentaires en présence de cette source.

#### V.4. Conclusion

A l'issue de cette expérience, il nous a été possible d'apprécier les effets d'ingrédients protéiques comme la  $\beta$ -caséine ou les hydrolysats protéiques laitiers (Promilk), ainsi que ceux de divers prébiotique sur les pouvoirs de survie à la bile et d'assimilation de cholestérol chez les bactéries lactiques.

Une grande variabilité dans les comportements bactériens en matière de survie à la bile et d'assimilation de cholestérol a été observée en fonction de la source de carbone présente dans le milieu de culture. Ainsi, les hydrolysats de protéines laitières ou la  $\beta$ -caséine, les prébiotiques : mannitol, raffinose, pectine ou lactulose, améliorent différemment les aptitudes fermentaires de ces souches lactiques.

En présence de la bile, toutes les souches lactiques expriment des activités BSH amplifiées en présence des deux sources protéiques : les hydrolysats de protéines laitières et la  $\beta$ -caséine. Ce sont les souches protéolytiques *B. lactis* et *S. thermophilus* qui ont exprimé les activités BSH les plus élevées comparées aux deux autres souches. Par ailleurs, les quatre souches ont affiché des activités BSH améliorées lorsqu'elles sont en présence de leur prébiotique préféré, et ceci indépendamment de leur expression fermentaire.

En revanche, la biomasse obtenue après 12 h de culture en présence de bile a révélé la nécessité d'une source d'énergie de nature plus prébiotique que protéique, chez les souches lactiques pour qu'elles puissent efficacement faire face aux effets délétères de la bile. Comme précédemment postulé en chapitre II, des sources glucidiques ou azotées semblent représenter les clefs dans la modulation de l'expression bactérienne à l'égard de la présence de la bile, qui est indispensable à l'établissement du pouvoir d'assimilation de cholestérol chez les bactéries.

Effectivement, le pouvoir d'assimilation de cholestérol se trouve nettement augmenté en présence d'une source protéique ou prébiotique spécifique à la souche lactique considérée. Ce pouvoir, exprimé en présence de bile, s'est trouvé relié aux expressions bactériennes de type production de BSH et de survie à l'hostilité biliaire.

# **CHAPITRE VI :**

**Pouvoir de conversion de l'acide  
linoléique en isomères  
conjugués par les bactéries lactiques.**

## CHAPITRE VI :

### Pouvoir de conversion de l'acide linoléique en isomères conjugués par les bactéries lactiques.

#### VI.1. Introduction

Les isomères conjugués de l'acide linoléique (ou en anglais conjugated linoleic acid= CLA) représentent un groupe particulier d'acides gras bioactifs à multiples effets positifs sur la santé de l'homme (EFSA, 2011).

Une des possibilités pour augmenter les concentrations systémiques en CLA chez l'hôte, est la bio-hydrogénation de l'acide linoléique par les bactéries intestinales. Néanmoins, une telle bioconversion a également été décrite chez les bactéries lactiques (Devillard et al., 2007). C'est pourquoi, dans cette dernière partie pratique de la thèse, nous envisageons d'explorer le pouvoir de nos souches à convertir l'acide linoléique en CLA. L'intérêt de l'insertion d'une telle étude dans le protocole général de la thèse réside dans le souci majeur de cette problématique qui a pour objectif de remplir et de compléter les nombreux critères auxquels doit répondre une souche donnée avant d'acquérir le très rigoureux statut probiotique attribué par l'OMS aux souches bénéfiques.

Nous explorons aussi dans cette conversion, la production d'autres acides gras suggérés possédant un impact sur le métabolisme lipidique, comme les acides stéarique et oléique (Bonanome et Grundy, 1988).

Etant donné que le lait contient des CLA, la présente expérience sera réalisée sur deux milieux MRS et lait.

#### VI.2. Matériels et méthodes

##### VI.2.1. Matériels

- Souches utilisées

Les souches utilisées sont décrites dans le détail au chapitre II. Il s'agit de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12), *Lactobacillus rhamnosus* (LBRE-LSAS), *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus* (LB340) et de *Streptococcus thermophilus* (TA 040).

- Acide linoléique

L'acide linoléique (L1012, linoleic acid for culture, Sigma, France) a été utilisé à deux concentrations (0.5 et 1 mg. mL<sup>-1</sup>) sur la base des travaux déjà publiés sur la production des CLA par les bactéries lactiques probiotiques (Alonso et al., 2003 ; Coakley et al., 2009).

## **VI.2.2. Méthodes**

### **VI.2.2.1. Repiquage, revivification et ajustement de l'inoculum**

Les souches conservées à 4°C sont réactivées et maintenues vivantes par une série de trois repiquages successifs de 200 µL d'inoculum dans 10 mL de milieu de croissance spécifique pour chaque souche, incubés à 37°C pendant 24 h. L'ajustement de l'inoculum est effectué à l'aide d'une cellule de Thoma.

### **VI.2.2.2. Procédure d'évaluation du pouvoir fermentaire des souches lactiques sur milieux lait et MRS en présence d'acide linoléique**

- Distribuer le lait (écrémé à 0% MG, 18% MS (p/v) et pasteurisé à 80°C pendant 30 min) ou le MRS (M17 pour *S. thermophilus* TA040), préparés préalablement, dans des tubes stériles.
- Ajouter 100 µL de culture bactérienne jeune (18 h) à raison d'une concentration finale de 1 à 5.10<sup>7</sup> cellules. mL<sup>-1</sup>.
- Ajouter 0.5 ou 1 mg. mL<sup>-1</sup> d'acide linoléique (AL), préalablement dissout dans une solution stérile de tween 80 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) à 0.05% (Alonso et al., 2003).
- Incuber 24 h en anaérobiose (Anaérocult) à 37°C.
- Evaluer le pouvoir fermentaire (biomasse et pH) des souches bactériennes après 24 h d'incubation.
- Des témoins ont été préparés dans les mêmes conditions sans inoculation bactérienne et/ou sans l'ajout d'acide linoléique :
  - Lait inoculé séparément par une des quatre souches bactériennes, sans AL et fermentés 24 h.
  - Lait sans AL, sans souche incubé 24 h ou non (0 h).
  - MRS sans AL, sans souche incubé 24 h ou non (0 h).

- La biomasse est déterminée par ensemencement en surface sur milieu approprié de la dilution adéquate, réalisée dans la solution de dilution simple (DS).
- Le nombre de cellules viables, déterminé 3 fois, est calculé à partir de colonies appropriées de la souche considérée après incubation, et est exprimé en log UFC. mL<sup>-1</sup> (MRS) ou log UFC. g<sup>-1</sup> (lait fermenté).
- La mesure des valeurs de pH a été réalisée à l'aide d'un pH-mètre digital préalablement étalonné (wtw, pH-mètre330, Weilheim; Allemagne).

### **VI.2.2.3. Détermination des CLA issus de la conversion bactérienne de l'acide linoléique**

Les CLA produits ont été quantifiés dans les surnageants bactériens (culots écartés), car il s'avère que ce sont seulement les CLA largués qui pourraient être systématiquement disponibles pour exercer une probable activité positive et que le maximum de cette productivité bactérienne en CLA pourrait être obtenu après 24 h de culture (Alonso et al., 2003). C'est pour cela qu'après 24 h d'incubation, les cultures sont centrifugées à 23500 ×g pendant 10 min/5°C et les lipides sont extraits à partir des surnageants bactériens et méthylés selon le protocole d'Alonso et al. (2003).

Tous les produits chimiques utilisés dans cette procédure sont de haute qualité analytique et sont fournis par Sigma-Aldrich (France), sauf indication particulière.

- **Extraction**

Elle consiste à mélanger 6 mL de surnageant avec 60 µL d'étalon interne (64.4 mg d'acide heptadécanoïque C17:0, de pureté de 99%, dans 10 mL d'hexane) et 12 mL d'isopropanol (pureté de 99.7%; VWR 20842-298). Agiter vigoureusement 30 sec à l'aide d'un vortex, puis ajouter 9 mL d'hexane (pureté de 99%; VWR 24608-296), mélanger 3 min et avant de centrifuger à 1900 ×g / 5 min à 5°C.

Le surnageant est collecté par aspiration et filtré sur sulfate de sodium anhydre (pureté de 99%; Sigma 239313). Ce dernier est rincé avec 7 mL d'hexane supplémentaire qui sont additionnés au filtrat.

La fraction lipidique est récupérée dans un tube conique en verre de 25 mL et séchée sous azote gazeux dans un bain à sec à 37°C. Ensuite, 100 µL de méthoxide de sodium (1 N) sont ajoutés et le mélange est agité 1 min au vortex, puis chauffé à 40°C/ 15 min.

Les surnageants témoins MRS non inoculé ou lait non fermenté (le lactosérum est

obtenu par acidification à pH 4.5 par l'ajout d'acide lactique 1 N) ont soumis les mêmes étapes d'extraction.

- **Méthylation**

Les acides gras libres sont méthylés 30 min à température ambiante par l'ajout de 50 µL de toluène et deux fois 500 µL de trifluorure Bor (BF<sub>3</sub>) à 14% dans le méthanol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Ensuite, 5 mL d'une solution de bicarbonate de sodium saturée et 2 mL d'hexane sont ajoutés, successivement. Les préparations sont agitées vigoureusement au vortex, puis centrifugées à 1000 × g /10 min à 4°C.

La phase d'hexane est séparée et conservée à -20°C dans des microtubes en verre étanches jusqu'à analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

- **Analyse CPG**

Les esters méthyliques d'acides gras ont été analysés dans un chromatographe de type Agilent 6890 couplé à un détecteur à ionisation de flamme (FID) selon le programme décrit précédemment par l'équipe DIMA (Loor et al., 2004) :

Un microlitre de chaque échantillon est injecté automatiquement dans un rapport de split de 1:10. L'hydrogène a été utilisé comme gaz vecteur à travers une colonne capillaire spécifique CP-Sil88 (100 m×0.25 mm×0.2 µm; i.d, Varian Inc., Lake Forest, USA). Le four du chromatographe était à une température initiale de 70°C après injection de l'échantillon, puis augmentée linéairement à 5°C. min<sup>-1</sup> pendant 1 minute jusqu'à 100°C et stabilisée à cette valeur pendant 2 min. après quoi, cette température est augmentée graduellement à un débit de 10°C. min<sup>-1</sup> jusqu'à 175°C et maintenue à ce niveau 42 min, et encore de 5°C. min<sup>-1</sup> jusqu'à une température finale de 225°C maintenue 25 min.

La chambre de l'injecteur est isotherme à 250°C et celle du détecteur à 300°C. Les esters méthyliques ont été identifiés selon leur temps de rétention comparé à celui d'étalons externes (Sigma-Aldrich, St Louis, USA ; Supelco, Bellefonte, USA) et quantifiés sur la base de la quantité d'étalon interne présente dans chaque échantillon analysé.

Les mesures répétées trois fois et enregistrées ont été traitées par le logiciel Agilent ChemStation (Inert Agilent, USA).

- **Pouvoir de conversion de l'acide linoléique libre**

Les souches sont comparées entre-elles par calcul des pourcentages de conversion de l'acide linoléique libre rajouté (0.5 ou 1 mg. mL<sup>-1</sup>) en CLA, selon la formule suivante :

$$\text{Taux de conversion d'AL (\%)} = \left[ \frac{(\sum \text{CLA totaux produits (CLA9c11t+ CLA8t10c+ CLA11c13t+ CLA10t12c+ C21:0+CLA9c11c+ CLA10c12c+ CLA11c13c+ CLA11t13t+ CLA tt)})}{(\text{AL détecté} + \sum \text{CLA totaux produits})} \right] \times 100 \text{ (Loor et al., 2004).}$$

Où :

AL détecté : c'est la concentration d'AL réellement extraite, telle que quantifiée par rapport à l'étalon interne.

### **VI.2.3. Traitement statistique des résultats**

Le traitement statistique des résultats relatifs aux aptitudes fermentaires des souches en présence d'acide linoléique est réalisé par l'analyse de variance (ANOVA). La comparaison de moyennes a été réalisée par le test de Tukey. Les résultats représentent les moyennes issues de trois expériences indépendantes (n=9).

Les différences entre les pourcentages de conversion d'acide linoléique en CLA ont été aussi évaluées par l'analyse ANOVA (SPSS statistical software, version 15.0, Chicago, Illinois, USA), en utilisant le test post-hoc de Duncan. Dans tous les cas, un niveau de signification de 0.05 a été fixé.

## **VI.3. Résultats et discussion**

### **VI.3.1. L'aptitude des bactéries lactiques à convertir l'acide linoléique.**

#### **VI.3.1.1. Pouvoir fermentaire des souches lactiques sur milieux lait et MRS en présence de l'acide linoléique.**

Les résultats relatifs au pouvoir de développement des souches bactériennes sur milieu MRS ou lait additionné d'acide linoléique à une concentration finale de 0.5 ou de 1 mg. mL<sup>-1</sup>, sont reportés dans les figures 29 et 30. Les valeurs représentent la biomasse accumulée (fig. 29) (log UFC. mL<sup>-1</sup> ou log UFC. g<sup>-1</sup>) et le pouvoir acidifiant (fig. 30) des cultures après 24 h d'incubation à 37°C et en anaérobiose.

### VI.3.1.1.1. Biomasse accumulée

Après 24 h d'incubation, toutes les souches montrent un pouvoir de croissance notable ( $P < 0.05$ ), plus sur milieu lait que sur MRS ( $P < 0.05$ ) et plus avec 0.5 qu'avec 1 mg. mL<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ) d'acide linoléique (AL).

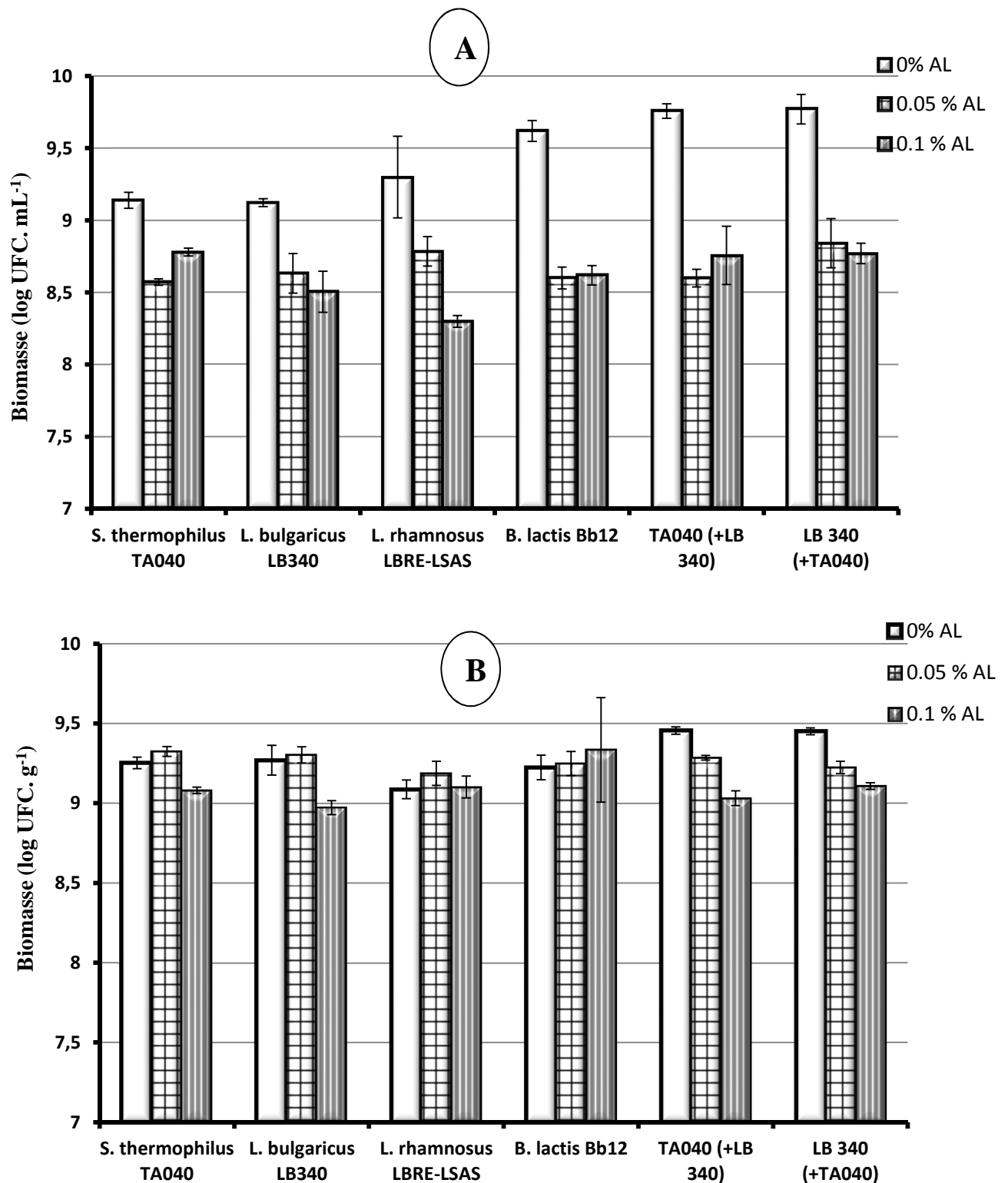
Les quantités de biomasse respectives notées avec ces deux concentrations d'AL varient entre 8.57 à 8.84 log UFC. mL<sup>-1</sup> et 8.3 à 8.78 log UFC. mL<sup>-1</sup> dans le milieu MRS (fig. 29 A) et entre 9.22 à 9.32 log UFC. g<sup>-1</sup> et 8.97 à 9.10 log UFC. g<sup>-1</sup> dans le milieu lait fermenté (fig. 29 B).

Sur le milieu MRS-AL (fig. 29 A), toutes les souches étudiées affichent une biomasse au-delà de 8 log UFC. mL<sup>-1</sup>. Les lactobacilles ont accumulé la biomasse la plus élevée ( $P < 0.05$ ) en présence de 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL ; alors que c'est *S. thermophilus* qui affiche la plus forte croissance ( $P < 0.05$ ) en présence de la double quantité en cet acide gras (1 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL). La symbiose instaurée entre les deux souches starters a exprimé aussi une bonne aptitude de croissance et de tolérance à l'acide linoléique.

D'une manière générale, la croissance de toutes les souches testées est partiellement inhibée par l'acide linoléique sur milieu MRS. Selon la souche considérée, des diminutions de l'ordre de -0.28 ( $P > 0.05$ ) à -0.9 ( $P < 0.05$ ) unité log ont été enregistrées par comparaison aux quantités de biomasse accumulées par les mêmes souches après 24 h de culture dans le milieu MRS (M17 pour *S. thermophilus*) non supplémenté en acide linoléique (témoin).

Sur milieu lait fermenté additionné d'acide linoléique (lait fermenté-AL) (fig. 29 B), le comportement des souches étudiées était très variable. Dans le cas de *L. rhamnosus* et *B. lactis*, la présence d'acide linoléique n'affecte pas la fermentation du lait. La croissance des souches starters en cultures pures était légèrement ( $P > 0.05$ ) diminuée (-0.2 unité log en moyenne) en présence de 1 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL. En revanche, en culture associée l'acide linoléique altère la symbiose instaurée entre ces deux souches starters, d'une manière plus significative quand il est additionné à 1 (diminution de -0.38 unité log en moyenne,  $P < 0.05$ ) qu'à 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> (diminution de -0.2 unité log en moyenne,  $P > 0.05$ ).

Par ailleurs, nos résultats, plus particulièrement ceux relatifs à la souche probiotique *B. lactis* Bb12, sont en accord avec ceux de Rodríguez-Alcalá et al. (2011). Ces auteurs ont observé que l'acide linoléique ajouté à 0.1% dans le lait ne provoquait pas un effet négatif important sur la croissance de *B. animalis* (Bb12-1, BLC), de *L. acidophilus* (Lac1, Ki) ou de *Lc. lactis* (LMG).



**Figure 29 :** Biomasse accumulée (log UFC. mL<sup>-1</sup> ou log UFC. g<sup>-1</sup>) après 24 h de monoculture à 37°C en anaérobiose de *S. thermophilus* TA040, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340, *L. rhamnosus* LBRE-LSAS ou *B. animalis* subsp. *lactis* Bb 12 et de culture associée des deux souches starters de yaourt (1:1) dans le milieu MRS (A) ou lait écrémé (18% MS) fermenté (B) en présence ou en absence (0, 0.5 ou 1 mg. mL<sup>-1</sup>) d'acide linoléique (AL). L'inoculum a été ajusté à une concentration finale de 1.10<sup>7</sup> à 5.10<sup>7</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>. Les valeurs représentent la moyenne « m » de trois expériences indépendantes ±SD (n=9).

D'une manière générale, l'acide linoléique est un agent antimicrobien et les souches qui arrivent à croître en sa présence le convertissent en d'autres acides gras à toxicité faible ou absente (Coakley et al., 2003).

En somme, nos résultats laissent suggérer que l'acide linoléique ajouté à la concentration de 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> dans le lait, et contrairement au milieu MRS, ne perturbe pas le pouvoir de croissance des souches lactiques. Cette particularité du lait pourrait être en grande partie liée à son pouvoir tampon mais probablement aussi à son contenu en lactose, comme cela a été déjà suggéré par Lin (2000).

Nous soulignons par ailleurs, que la majorité des études réalisées dans ce sens se sont intéressées à la production bactérienne en CLA et moins à la biomasse accumulée ou à l'activité acidifiante en présence d'acide linoléique.

#### **VI.3.1.1.2. Le pouvoir acidifiant des souches bactériennes en présence de l'acide linoléique**

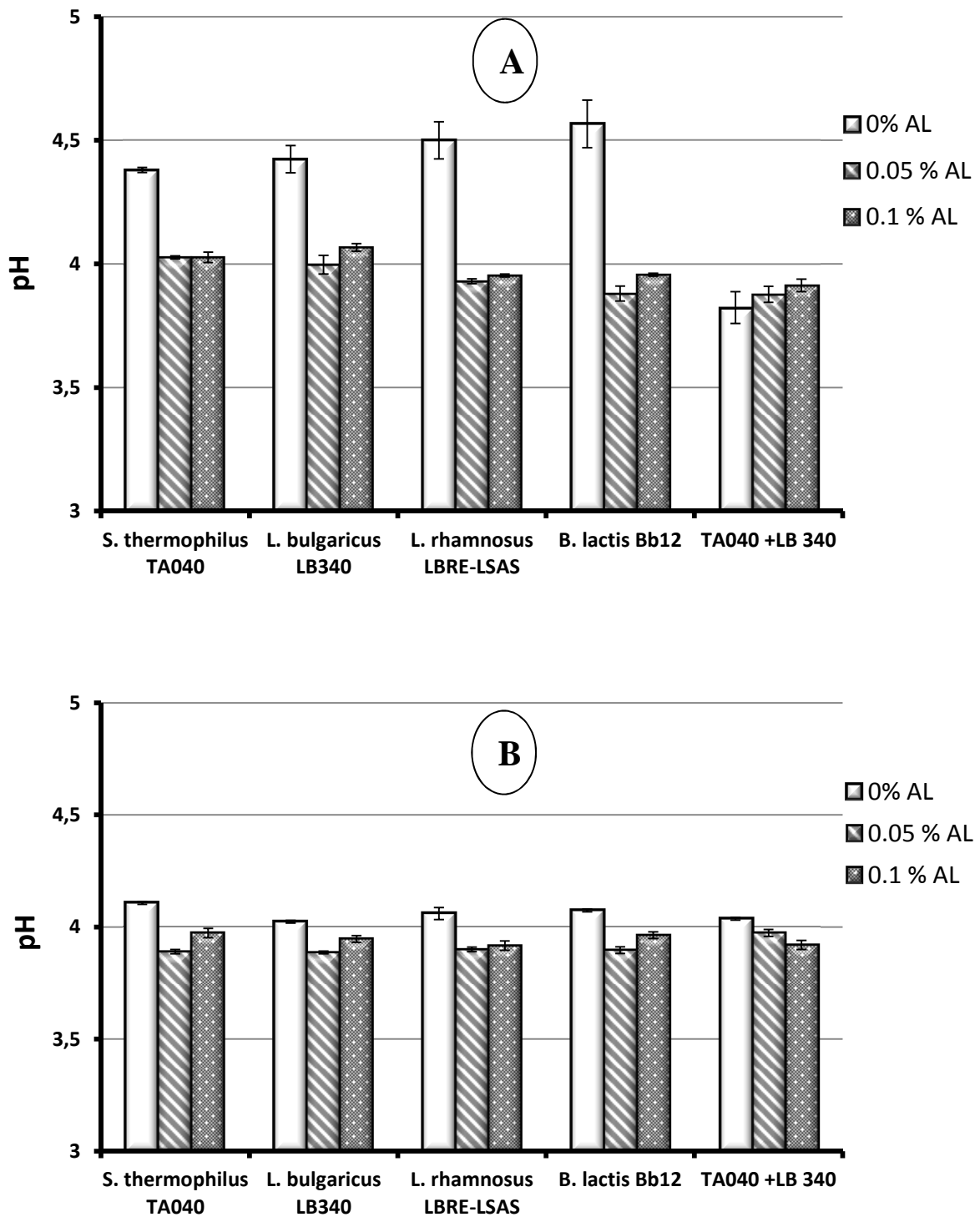
Les milieux de culture utilisés (lait écrémé ou MRS) sont riches en nutriments qui aideraient les souches bactériennes à bien se développer, en particulier, les sources de carbone et d'azote. Les souches étaient donc sujettes aux différentes interactions entre ces sources pouvant donner lieu à une réaction de type alcalinisation ou acidification.

Les résultats relatifs aux pH enregistrés après 24 h d'incubation à 37°C en anaérobiose dans le MRS ou le lait fermenté supplémenté ou non en acide linoléique (AL), sont reportés dans la figure 30.

Les cultures témoins (en absence d'acide linoléique) ont toutes été acidifiées par les souches testées ( $P < 0.05$ ) qui ont fait chuter le pH de 6.62 à une zone allant de 4.38 à 4.56. La culture associée témoin entre les deux souches starters du yaourt s'est plus ( $P < 0.05$ ) acidifiée (pH 3.82) que les monocultures de ces mêmes souches, reflétant la symbiose établie entre ces deux souches.

En présence d'AL dans le milieu MRS (fig. 30A), l'acidification était plus prononcée comparée à celle des cultures témoins non supplémentées en AL après 24 h de culture.

En présence de 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL, les pH étaient plus acides (4.02 à 3.88) ( $P < 0.05$ ) comparés à ceux enregistrés en présence de 1 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL (4.06 à 3.95). L'exception a été enregistrée dans les cultures de *S. thermophilus* où l'acidité était plutôt identique (pH de 4.02



**Figure 30 :** Le pH des monocultures de 24 h de *S. thermophilus* TA040, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340, *L. rhamnosus* LBRE-LSAS ou *B. animalis* subsp. *lactis* Bb 12 et de culture associant les deux souches starters du yaourt (1:1) dans le milieu **MRS** (A) ou **lait écrémé** (18% MS) **fermenté** (B) en présence ou en absence (0, 0.5 ou 1 mg. mL<sup>-1</sup>) d'acide linoléique (AL). L'inoculum a été ajusté à une concentration finale de 1.10<sup>7</sup> à 5.10<sup>7</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>. Les valeurs représentent la moyenne « m » de trois expériences indépendantes ±SD (n=9).

chacune,  $P > 0.05$ ) dans les deux cas de concentrations d'AL utilisées. Ces résultats vont dans le même sens que ceux notés par la biomasse en présence des deux concentrations en AL.

Le comportement de la culture associant les deux souches starters de yaourt n'était pas différent de celui des monocultures des mêmes souches où l'acidité était plus élevée à 0.5 qu'à 1 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL. Cependant, cette acidité reste inférieure à celle de la culture associée témoin (fig. 30A).

Dans le milieu lait fermenté (fig. 30B), l'activité acidifiante de toutes les souches étudiées était élevée selon les pH finaux enregistrés : 4.02 à 4.10 en l'absence d'acide linoléique (témoins), et de l'ordre de 3.88 à 3.90 et de 3.91 à 3.97 en présence respectivement, d'AL à 0.5 et 1 mg. mL<sup>-1</sup>.

Comme cela a été observé sur milieu MRS, les pH enregistrés sur milieu lait fermenté additionné de 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL étaient plus acides que ceux obtenus avec 1 mg. mL<sup>-1</sup>, à l'exception des pH des cultures de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS ( $P > 0.05$ ) et celles associant les deux souches starters ( $P > 0.05$ ).

Par ailleurs, la coagulation du lait était assez prononcée dans toutes les cultures, particulièrement celles supplémentées en AL, où la synérèse était bien visible. Le caillé était bien ferme et son odeur acidulée très désirable dans toutes les cultures lactiques, plus particulièrement dans les monocultures des deux starters du yaourt et dans celle de *B. lactis* et où les pH affichés étaient les plus ( $P < 0.05$ ) bas (pH = 3.88 en moyenne).

Comme nous l'avons observé en estimant la biomasse accumulée, les résultats sur le pouvoir acidifiant laissent suggérer que les aptitudes fermentaires des bactéries étudiées pourraient être sensiblement améliorées par la présence de 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL dans le milieu.

### **VI.3.1.2. Production bactérienne en CLA**

Après 24 h de culture dans le milieu MRS, les souches étudiées arrivent à convertir 35.2 à 50.3% des 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL libre initialement additionné. Cette bioconversion donne majoritairement naissance au C18:3 n-3 et aux isomères CLA. Par ailleurs, de faibles quantités de l'acide élaïdique C18:1 9-*trans* et de C18:3 n-6, ont aussi été produites (Tableau 22A).

Il s'avère aussi que l'acide stéarique (AS, C18:0) n'est pas produit à partir de l'AL rajouté dans le milieu de culture, car en comparant les profils en acides gras des cultures témoins (sans AL) avec celles supplémentées en AL, les concentrations en stéarate ne sont pas statistiquement ( $P < 0.05$ ) différentes.

**Tableau 22 A :** Pouvoir bactérien de bioconversion de l'acide linoléique additionné à 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> en isomères CLA

dans les surnageants des cultures MRS de 24 h.

Souches	% de Conversion d'AL	Acides gras et CLA (mg. mL <sup>-1</sup> ) des surnageants des cultures MRS issus de la bioconversion bactérienne de l'acide linoléique						
		C18 :1 9t	C18:3 n-6	C18:3 n-3	CLA totaux	CLA 9c, 11t	CLA 10t, 12c	Mixture CLA tt
<b>Monoculture de <i>S. thermophilus</i><sup>#</sup> TA 040</b>	42.49	ND	ND	0.1652	0.1502	0.0825	0.0677	ND
<b>Monoculture de <i>L. bulgaricus</i> LB 340</b>	45.34	0.0013*	0.0029	0.2512	0.1225	0.0512	0.0423	0.0289
<b>Monoculture de <i>B. lactis</i> Bb12</b>	40.62	0.0018*	0.0064	0.0874	0.1106	0.0523	0.0607	ND
<b>Monoculture de <i>L. rhamnosus</i> LBRE-LSAS</b>	50.32	0.0031	0.0143	0.0788	0.0728	0.0364	0.0364	ND
<b>Culture associée TA 040 + LB 340</b>	35.23	0.0018*	0.0126	0.0522	0.0822	0.0424	0.0321	0.0064

<sup>#</sup> M17 pour *S. thermophilus* TA040.

\*Non différent de celui observé dans les cultures témoins (P&gt;0.05).

ND : non détecté (limite de détection 0.0001 mg. mL<sup>-1</sup>).

**Tableau 22 B :** Pouvoir bactérien de bioconversion de l'acide linoléique additionné à 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> en isomères CLA

dans les lactosérums des cultures lait écrémé de 24 h.

Souches	% de Conversion d'AL	Acides gras et CLA (mg. mL <sup>-1</sup> ) des lactosérums des cultures lait issus de la bioconversion bactérienne de l'acide linoléique							
		C18:1 9t	C18:1 11t	C18:3 n-6	C18:3 n-3	CLA Totaux	CLA 9c, 11t	CLA 10t, 12c	Mixture CLA tt
<b>Monoculture de <i>S. thermophilus</i> TA 040</b>	64.74	0.0190	ND	0.0240	0.2150	0.0300	0.0182	0.0118	ND
<b>Monoculture de <i>L. bulgaricus</i> LB 340</b>	87.92	0.0400	0.0380	0.0460	0.3190	0.0881	0.0545	ND	0.0336
<b>Monoculture de <i>B. lactis</i> Bb12</b>	46.65	0.0320	0.0320	0.0450	0.4160	0.1893	0.1035	0.0454	0.0404
<b>Monoculture de <i>L. rhamnosus</i> LBRE-LSAS</b>	60.58	0.0080	0.0230	0.0270	0.2000	0.0496	0.0354	0.0142	ND
<b>Culture associée TA 040 + LB 340</b>	72.76	0.0140	0.0260	0.1350	0.2400	ND	ND	ND	ND

. ND : non détecté (limite de détection 0.0001 mg. mL<sup>-1</sup>).

L'analyse chromatographique a aussi montré que l'acide ruménique (ARm) ou l'isomère CLA 9-*cis*, 11-*trans* était majoritaire ( $P < 0.05$ ) parmi les CLA détectés dans toutes les cultures bactériennes réalisées dans le MRS ; alors que l'isomère CLA-10-*trans*, 12-*cis* était détecté à une faible concentration (tableau 22A).

Par ailleurs, de très faibles quantités ( $P < 0.05$ ) en isomères CLA de type *trans*, *trans* ont été exclusivement détectés dans les surnageants de *L. bulgaricus* en culture pure ou associée avec *S. thermophilus*.

Le taux en CLA dans le lait écrémé non fermenté et non additionné en AL est de l'ordre de 0.0063 mg. mL<sup>-1</sup> en moyenne. Après 24 h de fermentation, ce taux augmente ( $P < 0.05$ ) à 0.0132 à 0.0175 mg. mL<sup>-1</sup> en moyenne, en fonction du type de la culture bactérienne inoculée dans le lait.

Dans le milieu lait fermenté, seule la culture associant les deux souches starters du yaourt n'a pas produit d'isomères CLA à partir de 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL libre (Tableau 22B). Par ailleurs, en comparant la production de CLA par les différentes souches étudiées, on s'aperçoit que c'est la souche bifide qui accumule la plus grande ( $P < 0.05$ ) quantité en CLA totaux et dont la concentration de l'isomère ARm y représente environ 55%. Pour sa part, *L. bulgaricus* accumule environ la moitié de cette concentration en ARm.

Contrairement aux cultures MRS, l'acide vaccénique C18 :1 11-*trans* a été détecté dans le lactosérum de toutes les cultures lait supplémentées de 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL, exceptée celle de *S. thermophilus* en monoculture.

Le taux de bioconversion de l'AL était de l'ordre de 87.92% pour *L. bulgaricus*, 64.74% pour *S. thermophilus*, 60.58% pour *L. rhamnosus* et 46.65% pour *B. lactis* (tableau 22B).

En présence de la double concentration en AL (1 mg. mL<sup>-1</sup>), l'isomère CLA 11-*cis*, 13-*trans* a été exclusivement produit dans le surnageant MRS de *S. thermophilus* (Tableau 23A). La concentration en isomère ARm-CLA varie selon les cultures réalisées.

Chez la souche bifide, il est le seul type de CLA produit, alors que les deux lactobacilles produisent des concentrations assez médiocres en cet isomère, même s'ils accumulent plus de CLA totaux comparés à la souche bifide ( $P < 0.05$ ).

Il faudrait noter que la culture de starter thermophile *S. thermophilus* était la seule où il n'y avait pas production de CLA de type ARm.

**Tableau 23A :** Pouvoir bactérien de bioconversion de l'acide linoléique additionné à 1 mg. mL<sup>-1</sup> en isomères CLA dans les surnageants des cultures MRS de 24 h.

Acides gras et CLA (mg. mL <sup>-1</sup> ) des surnageants des cultures MRS issus de la bioconversion bactérienne de l'acide linoléique								
Souches	% de Conversion d'AL	C18 :1 9t	C18:3 n-6	C18:3 n-3	CLA totaux	CLA 9c, 11t	CLA 10t, 12c	Mixture CLA tt
<b>Monoculture de <i>S. thermophilus</i> # TA 040</b>	37.7	0.2917	0.0534	ND	0.0623‡	ND	ND	ND
<b>Monoculture de <i>L. bulgaricus</i> LB 340</b>	61.74	0.0140	ND	ND	0.0628	0.0304	0.0302	ND
<b>Monoculture de <i>B. lactis</i> Bb12</b>	39.74	0.0336	ND	ND	0.0619	0.0619	ND	ND
<b>Monoculture de <i>L. rhamnosus</i> LBRE-LSAS</b>	24.92	0.0068	ND	ND	0.0855	0.0461	0.0393	ND
<b>Culture associée TA 040 + LB 340</b>	46.74	0.0065	ND	ND	0.0432	0.0233	0.0199	ND

# M17 pour *S. thermophilus* TA040.

‡ Le CLA 11c, 13t a été exclusivement produit.

ND : non détecté (limite de détection 0.0001 mg. mL<sup>-1</sup>).

Un constat d'intérêt à faire, c'est l'absence de production d'isomère CLA de type *trans, trans* dans toutes les cultures réalisées dans cette expérience.

Les souches étudiées ont aussi manifesté un pouvoir de bioconversion d'AL variable : 37.7% pour *S. thermophilus*, 24.9 et 39.7% pour *L. rhamnosus* et *B. lactis*, respectivement, alors que *L. bulgaricus* et sa culture associée avec *S. thermophilus* affichaient les pourcentages de conversion les plus élevés; 61.7 et 46.7%, respectivement (tableau 23A).

Dans le lait supplémenté de 1 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL et fermenté 24 h, toutes les cultures bactériennes réalisées étaient capables (P< 0.05) de convertir l'AL libre. Les taux de bioconversion varient de 48.2 à 63.9% (Tableau 23B).

Les profils en acides gras détectés en CPG étaient similaires dans les quatre monocultures. Le C18:2 9-*cis*, 11-*trans* était l'isomère CLA le plus abondamment (P< 0.05) produit (61 à 75% des CLA totaux). En revanche, l'isomère C18:2 10-*trans*, 12-*cis* représente seulement 25 à 38% des CLA totaux produit. Ces deux isomères étaient produits en concentrations presque identiques (P> 0.05) dans la culture associée entre les deux souches starters du yaourt.

Les isomères de configuration *trans, trans* étaient totalement absents dans tous les lactosérums de cultures laits additionnés de 1 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL (tableau 23B). L'acide linoléique à cette concentration était aussi converti en acide vaccénique (AV ou C18:1 11-*trans*) et dans une moindre mesure, en C18:1 9-*trans*.

Il est généralement admis que les isomères conjugués d'acide linoléique (CLA) proviennent essentiellement de la bio-hydrogénation anaérobique et incomplète de l'acide linoléique chez les bactéries lactiques et les bactéries du rumen (Alonso et al. 2003).

De nombreux travaux ont montré le pouvoir des bifidobactéries et des bactéries lactiques à produire les CLA dans leur milieu de culture à partir de l'acide linoléique libre (Ogawa et al., 2005 et Sieber et al., 2004 ; cités par Rodríguez-Alcalá et al., 2011).

Dans une étude récente, Gorissen et al. (2012) ont observé qu'un bon pouvoir de bioconversion d'acide linoléique en CLA n'est pas forcément lié à un pouvoir fermentaire élevé chez les bifidobactéries. Les auteurs de cette étude ont remarqué que des espèces bifides (*B. breve*) avaient affiché une production assez importante en CLA malgré que la biomasse qu'elles accumulent en présence d'acide linoléique soit faible. Nos résultats vont dans le même sens que les observations de ces auteurs.

**Tableau 23 B :** Pouvoir bactérien de bioconversion de l'acide linoléique additionné à 1 mg. mL<sup>-1</sup> en isomères CLA

dans les lactosérums des cultures lait écrémé de 24 h.

Souches	% de Conversion d'AL	Acides gras et CLA (mg. mL <sup>-1</sup> ) des lactosérums des cultures lait issus de la bioconversion bactérienne de l'acide linoléique							
		C18:1 9t	C18:1 11t	C18:3 n-6	C18:3 n-3	CLA Totaux	CLA 9c, 11t	CLA 10t, 12c	Mixture CLA tt
<b>Monoculture de <i>S. thermophilus</i> TA 040</b>	49.69	0.0220	0.0340	0.0390	0.2590	0.0723	0.0493	0.0230	ND
<b>Monoculture de <i>L. bulgaricus</i> LB 340</b>	57.27	0.0180	0.0240	0.0470	0.2170	0.0539	0.0330	0.0209	ND
<b>Monoculture de <i>B. lactis</i> Bb12</b>	48.22	0.0031	0.0380	0.0420	0.1050	0.0837	0.0536	0.0301	ND
<b>Monoculture de <i>L. rhamnosus</i> LBRE-LSAS</b>	61.33	0.0030	0.0390	0.0380	0.3910	0.0572	0.0429	0.0143	ND
<b>Culture associée TA 040 + LB 340</b>	63.90	0.0020	0.0320	0.0620	0.2080	0.0751	0.0361	0.0390	ND

ND : non détecté (limite de détection 0.0001 mg. mL<sup>-1</sup>).

Si nous comparons nos résultats issus des cultures sur milieux MRS et lait enrichis en AL, nous pouvons remarquer que les concentrations en CLA générées par les souches bénéfiques ne diffèrent pas entre-elles en présence de 1 mg. mL<sup>-1</sup> d'AL.

Ceci n'est pas vrai lorsque la concentration d'acide linoléique est réduite de moitié (0.5 mg. mL<sup>-1</sup>) dans le milieu de culture. En effet, à la concentration de 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> dans le milieu de culture, l'acide linoléique est converti en CLA avec une intensité différente selon la souche considérée. Ce sont les souches *S. thermophilus* et *B. lactis* qui accumulent les concentrations en CLA les plus élevées dans les milieux MRS et lait.

Des résultats similaires ont également été rapportés par Coakley et al. (2003) et Park et al. (2009). Cela pourrait être dû à l'effet protecteur des protéines du lait, car dans la matrice laitière, les CLA pourraient être à l'abri de l'oxydation exercée par les radicaux alkyles (Lin et al., 1999).

Par ailleurs, lorsque l'acide linoléique est présent à 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> dans le MRS, on constate qu'il y a une relation inverse entre la production de CLA et la quantité de biomasse accumulée par les souches testées. Certaines études (Jiang et al., 1998; Kim et al., 2000) ont préconisé que l'effet inhibiteur de l'acide linoléique sur les bactéries lactiques pourrait être neutralisé par ces mêmes souches *via* une production élevée en CLA.

Les taux de bioconversion de l'acide linoléique en CLA les plus élevés ont été particulièrement observés avec les souches starters du yaourt en culture pure ou associée dans les laits additionnés de 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> AL libre. Ce fort potentiel de bioconversion de l'acide linoléique en CLA avait déjà été mis en évidence par Alonso et al. (2003) qui avaient précisé que mêmes les bactéries probiotiques n'avaient pas un tel potentiel.

#### **VI.4. Conclusion**

L'objectif de la présente expérience était d'explorer le pouvoir des quatre souches lactiques assimilatrices de cholestérol à convertir l'acide linoléique libre en ses isomères conjugués CLA. Afin de mieux estimer cette propriété, le pouvoir bactérien de bioconversion a été calculé à partir des profils en acides gras largués dans les surnageants des cultures MRS et lait écrémé additionnés de linoléate.

Sur le plan de la croissance des souches testées sur MRS ou sur lait écrémé, nous pouvons conclure que l'acide linoléique utilisé à une concentration finale de  $0.5 \text{ mg. mL}^{-1}$  ne perturbe pas le développement de ces bactéries. En effet, ce constat est aussi très marqué sur la souche *B. lactis* sur milieu lait.

En revanche, si la concentration en acide linoléique dans le MRS ou le lait est augmentée à  $1 \text{ mg. mL}^{-1}$ , les souches sont quelque peu inhibées et n'accumulent pas beaucoup de biomasse.

Par ailleurs, l'activité de synthèse d'acides organiques des souches testées en présence l'acide linoléique est plus intense par rapport à celles des cultures témoins (absence d'acide linoléique). Cette présence d'acide linoléique dans le milieu lait contribue à l'acidifier plus et par conséquent, cet effet a des retombées positives sur la texture du caillé, elle-même liée à l'activité protéolytique des souches étudiées. Ces observations indiquent que les souches étudiées tolèrent toutes l'acide linoléique.

L'analyse chromatographique des profils en acides gras issus de cette bioconversion bactérienne de l'acide linoléique, a révélé que les souches lactiques étudiées étaient capables de produire les CLA dans les milieux MRS et lait après 24 h de fermentation. Cette activité de bioconversion a aussi produit d'autres acides gras qui sont en étroite relation avec les voies génératrices de CLA.

Les starters du yaourt ont affiché les taux de bioconversion d'AL libre les plus élevés dans le milieu lait écrémé, alors que la souche bifide probiotique s'est montrée la plus efficace dans la bioconversion de l'acide linoléique en isomères conjugués actifs, en particulier, dans le milieu lait.

# **CONCLUSION GENERALE**

## Conclusion générale

L'objectif principal de cette thèse a été d'améliorer la survie des bactéries lactiques assimilatrices de cholestérol aux conditions hostiles du tube digestif auxquelles elles sont confrontées lorsqu'elles y transitent pour regagner vivantes leur nouvel habitat, le côlon.

La première partie pratique de ce travail a été consacrée à la mise en évidence et la détermination du pouvoir d'assimilation bactérienne in vitro de cholestérol sur milieu MRS. Les résultats obtenus ont montré que les bactéries lactiques étudiées assimilent toutes du cholestérol, mais à différentes intensités. Cette assimilation souche-dépendante de cholestérol est aussi modulable par la présence de glucose dans le milieu MRS. Elle dépend également du temps de culture. Toutes les observations faites à ce sujet indiquent que c'est au cours des premières 24 h de culture que les bactéries lactiques assimilent l'essentiel du cholestérol additionné au milieu. Etant donné l'intérêt physiologique de cette bio-assimilation bactérienne de cholestérol, divers promoteurs naturels de cette activité (ingrédients protéiques laitiers, prébiotiques) ont été testés.

Par ailleurs, il apparaît que le facteur viabilité des cellules bactériennes en présence de la bile est à prendre en considération dans l'évaluation de cette activité d'assimilation in vitro de cholestérol. C'est pourquoi, dans la deuxième partie expérimentale de ce travail, l'action protocolaire est focalisée sur l'exploration et la mise au point des conditions et des moyens de préservation et d'amélioration de la survie des souches lactiques ciblées dans cette étude.

Le premier facteur d'amélioration de la viabilité des souches starters du yaourt (*Streptococcus thermophilus* TA040 et *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* LB340) exposées aux conditions hostiles simulées in vitro du tube digestif est l'additif alimentaire le polysorbate 80.

Cet ingrédient alimentaire, composé majoritairement d'acide oléique, procure une préservation de la viabilité des cellules bactériennes quand elles sont mises sous conditions acides stomacales simulées et en présence de la bile ou d'acide cholique. Cet effet protecteur s'est traduit par des sécrétions enzymatiques BSH accentuées qui pourraient être à l'origine de la tolérance bactérienne à ces conditions digestives hostiles.

Les résultats de cette partie ont également révélé que la composition du milieu de culture joue un rôle primordial dans cette réponse bactérienne d'adaptation à de telles conditions défavorables à la survie des bactéries.

L'analyse CPG des profils lipidiques des culots bactériens a confirmé l'utilisation de polysorbate 80 par les deux starters de yaourt en incorporant l'acide oléique exogène dans leur membrane où le profil en certains acides gras (les acides octadécanoïques (C18), leurs dérivés méthyliques cycliques (C19: cyc) et les acides C20-21) varie également en réponse- à la présence de la bile dans le milieu de culture bactérien.

Ces changements semblent renforcer l'hydrophobicité de la membrane cellulaire bactérienne qui pourrait être responsable du maintien de la viabilité et de l'expression de la tolérance de ces bactéries à la bile.

Sur le plan industriel, l'utilisation de polysorbate 80 pourrait aussi être envisagée dans la fabrication d'aliments fonctionnels ou de formes protectrices galéniques véhiculant les bactéries lactiques. Par ailleurs, la propriété émulsifiante de cet additif lui permet d'être fréquemment utilisé dans l'émulsion d'entités biologiques d'intérêt lors de leur encapsulation.

La troisième partie expérimentale de cette thèse a été consacrée à la mise au point d'une méthode de microencapsulation dans un gel mixte d'alginate de calcium (alginate-Ca) et d'amidon résistant (AR) des deux souches *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. lactis* Bb12 afin de les protéger lors de leur transit digestif. De par sa forme cristalline indigeste, l'amidon résistant de type II confère plus de stabilité aux capsules d'alginate formées.

Nos résultats ont montré que les microcapsules d'alginate Ca-AR enrobant les deux souches bactériennes bénéfiques ainsi fabriquées résistent à la lyse salivaire lorsqu'elles sont exposées à des concentrations d'alpha amylase bien supérieures aux concentrations physiologiques. La même résistance a été également observée quand ces microcapsules ont été exposées aux conditions hostiles du tube digestif, traduisant ainsi la préservation de la viabilité des cellules qu'elles contenaient.

Dans le yaourt mixte (en présence des starters du yaourt) comme aliment vecteur, l'effet protecteur des capsules d'alginate Ca-AR fabriquées a également été observé. Cette microencapsulation a permis de renforcer la résistance des cellules aux conditions

défavorables de l'entreposage frigorifique, ceci était probablement dû à l'activité post-acidifiante adoucie des cellules encapsulées.

Sur le plan sensoriel, la viscosité et les quantités d'exopolysaccharides dans le yaourt mixte avec les cellules encapsulées sont améliorées. Ce résultat rapporté pour la première fois dans cette étude semble être essentiellement dû à l'amélioration de la viabilité des souches starters du yaourt observée pendant l'entreposage frigorifique.

La quatrième partie pratique de ce travail a porté sur l'étude des effets d'ingrédients protéiques laitiers ou de divers prébiotiques sur la production de BSH et le pouvoir de tolérance à la bile et d'assimilation de cholestérol.

Indépendamment de leurs aptitudes fermentaires, mais en relation avec leur activité enzymatique BSH et leur tolérance à la bile, les quatre souches lactiques étudiées assimilent plus de cholestérol en présence des ingrédients protéiques laitiers ou des prébiotiques testés. Néanmoins, l'effet des ingrédients protéiques laitiers testés sur la viabilité des bactéries lactiques étudiées en présence de bile demeure inférieur à celui généré par les prébiotiques.

Dans la dernière partie expérimentale de la thèse, il s'avère que les souches lactiques étudiées *S. thermophilus* TA040, *L. rhamnosus* LBRE-LSAS, *L. bulgaricus* LB340 et *B. lactis* Bb12 sont non seulement capables d'assimiler le cholestérol mais aussi de convertir l'acide linoléique libre en ses isomères conjugués CLA, et notamment en son isomère le plus intéressant qui est l'acide ruménique.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références Bibliographiques

### -A-

1. Adhikari K., Mustapha A., Grün I.U. & Fernando L. (2000). Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 83: 1946–1951.
2. AFSSA (Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments). (2003). Rapport du groupe de travail « Alimentation infantile et modification de la flore intestinale ».
3. AFSSA (Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments) (2004). Rapport du groupe de travail « Glucides et santé : Etat des lieux, évaluation et recommandations ».
4. Akalın A.S., Tokuşoğlu O., Gönç S. & Aycan Ş. (2007). Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *International Dairy Journal*, 17: 1089–1095.
5. Alhaj O.A., Kanekanian A.D., Peter A.C. & Tatham A.S. (2010). Hypocholesterolemic effect of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12) and trypsin casein hydrolysate. *Food chemistry*, 123: 430–435.
6. Alonso L., Cuesta E.P. & Gilliland S.E. (2003). Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *Journal of Dairy Science*, 86: 1941–1946.
7. Alp G. & Aslim B. (2010). Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, 16: 101–105.
8. Al-Sheraji S.H., Ismail A., Manap M.Y., Mustafa S., Yusof, R.M. & Hassan F.A. (2012). Hypocholesterolaemic effect of yoghurt containing *Bifidobacterium pseudocaenulatum* G4 or *Bifidobacterium longum* BB536. *Food Chemistry*, 135: 356–361.
9. Anal A.K. & Singh H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18:240–251.
10. Andersson H.B.I. (1993). Sterol balance studies in man. A critical review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 47: 153- 159.
11. Aneja R.P. & Murthi T.N. (1990). Conjugated linoleic acid contents of Indian curds and ghee. *Indian Journal of Dairy Science*, 43: 231– 238.
12. Annan N.T, Borza A.D. & Truelstrup Hansen L. (2008). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 41: 184-193.
13. Ananta E., Birkeland S.E., Corcoran B., Fitzgerald G., Hinz S., Klijn A., Maetoe J., Mercernier A., Nilsson U., Nyman M., O'Sullivan E., Parche S., Rautonen N., Ross R.P., Saarela M., Stanton C., Stahl U., Suomalainen T., Vincken J.P, Virkajärvi I., Voragen F., Wesenfeld J., Wouters R. & Knorr D. (2004). Processing effects on the nutritional advancement of probiotics and prebiotics. *Microbial Ecology and Health Disease*, 16: 114–124.
14. Ashraf R. & Shah N.P. (2011). Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 149: 194–208.
15. Ashwell M.S., Ceddia R.P., House R.L., Cassady J.P., Eisen E.J., Eling T.E., Collins J.B., Grissom S.F. & Odle J. (2010). *Trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid alters hepatic gene expression in a polygenic obese line of mice displaying hepatic. *Lipidosis*, 21(9): 848-55.

16. Athiththan1 L.V., Jayaratne S.D., Peiris1 H. & Jayasekera S. (2009). The effect of milk proteins and curd on serum Angiotensin Converting Enzyme activity and lipid profile in Wistar rats. *Journal National Science*, 37 (3): 209-214.
17. Azain M.J., Hausman D.B., Sisk M.B., Flatt W.P. & Jewell D.E. (2000). Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *Journal of Nutrition*, 130: 1548–1554.
18. Azcarate-Peril M.A., Altermann E., Hoover-Fitzula R.L., Cano R.J. & Klaenhammer T.R. (2004). Identification and Inactivation of Genetic Loci Involved with *Lactobacillus acidophilus* Acid Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 5315-5322.

**-B-**

19. Badel S., Bernardi T. & Michaud P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29: 54–66.
20. Banni S., Carta G., Angioni E., Murru E., Scanu P., Melis M.P., Bauman D.E., Fischer S.M. & Ip, C. (2001). Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *Journal of Lipid Research*, 4: 1056 - 1061.
21. Begley M., Hill C. & Cormac G.M. (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 1729–1738.
22. Belitz H.D., Grosch W. & Schieberle P. (2009). *Food chemistry*, 4<sup>th</sup> revised and extended edition, Springer-Verlage, Heidelberg, Germany p.1114.
23. Bengmark S. (2000). Colonic food: pre-and probiotics, *American Journal of Gastroenterology*, 95 (1): 5-7.
24. Berdeaux O., Voinot L., Angioni E., Juaneda P. & Sebedio J.L. (1998). A simple method of preparation of methyl *trans* -10, *cis*-12 and *cis*-9, *trans*-11-Octadecadienoates from methyl linoleate. *Journal of American Oil Chemists Society*, 75 (12): 1749-1755.
25. Berg R.D. (1998). Probiotics, prebiotics or “conbiotics”. *Trends in Microbiology*, 6: 89-92.
26. Bertazoni Minelli E., Benini A., Marzotto M., Hendriks H., Sbarbati A. & Dellaglio F. (2001). Preliminary screening of health-promoting properties of new *lactobacillus* strain: in vitro and in vivo, *HEALFO, Italy*.
27. Bezkorovainy. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 399–405.
28. Bjorksten B. (2004). Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer Seminars in Immunopathology*, 25: 257-270.
29. Bonanome A. & Grundy S.M. (1988). Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *New England Journal of Medicine*, 318: 124- 48.
30. Bradford M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
31. Budin-Verneuil A., Maguin E., Auffray Y., Ehrlich S.D. & Pichereau V. (2005). Transcriptional analysis of the cyclopropane fatty acid synthase gene of *Lactococcus lactis* MG1363 at low pH. *FEMS Microbiology Letters*, 250: 189–194.
32. Burns P., Sánchez B., Vinderola G., Ruas-Madiedo P., Ruiz L., Margolles A., Reinheimer J. & de los Reyes-Gavilán C.G. (2010). Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* to bile. *International Journal of Food Microbiology*, 142: 132–141.
33. Burns P., Vinderola G., Binetti A., Quiberoni A., Reyes-Gavilán C.G. & Reinheimer J.A. (2008). Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *International Dairy Journal*, 18: 377–385.

34. 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: 467–483.

-C-

35. Calpe-Berdiel L., Escola-Gil J.C. & Blanco-Vaca F. (2009). New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis*, 203:18–31.
36. Canzi E., Zanchi R., Camaschella P., Cresci A., Greppi G.F., Orpianesi C., Serrantoni M. & Ferrari A. (2000). Modulation by lactic-acid bacteria of the intestinal ecosystem and plasma cholesterol in rabbits fed a casein diet. *Nutrition Research*, 20 (9):1329–1340.
37. Capela P., Hay T.K.C. & Shah N.P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39: 203-211.
38. Capela P., Hay T.K. C. & Shah N.P. (2007). Effect of homogenization on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Research International*, 40:1261–1269.
39. Champagne C.P., Ross R.P., Saarela M., Hansen K.F. & Charalampopoulos D. (2011). « Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. », *International Journal of Food Microbiology*, 149(3): 185-193.
40. 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: 27–35.
41. Chávarri M., Marañón I., Ares R., Ibáñez F.C., Marzo F. & Villarán M.D.C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142: 185–189.
42. Chen W.J.L., Anderson J.W. & Jennings D. (1984). Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibres in cholesterol-fed rats. *Experimental Biology and Medicine*, 175: 215–218.
43. Chen S.C., Chan K.S, Chao W.N., Wang P.H., Lin D.B., Ueng K.C., Kuo S.H., Chen C.C. & Lee M.C. (2010). Clinical outcomes and prognostic factors for patients with *Vibrio vulnificus* infections requiring intensive care: a 10-yr retrospective study. *Critical Care Medicine*, 38: 1984–90.
44. Chen M.J. & Chen K.N., (2007). Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), Encapsulation and Controlled Release. *Technologies in Food Systems*, 83–107.
45. Chen K.N., Chen M.J., Liu J.R., Lin C.W. & Chiu H.Y. (2005). Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science*, 70: 260–266.
46. Chen M. & Mustapha A. (2011). Survival of freeze-dried microcapsules of  $\alpha$ -galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. *Food Microbiology*, 30: 68-73.
47. Chen Z., Ma K., Liang Y., Peng C. & Zuo Y., (2011). Role and classification of cholesterol-lowering functional. *Journal of Functional Foods*, 61-69.
48. Chikai T., Nakao H., & Uchida K. (1987). Deconjugation of bile acids by human intestinal bacteria implanted in germ free rats. *Lipids*, 22: 669–671.
49. Chin S.F., Liu W., Storkson J.M., Ha Y.L. & Pariza M.W. (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acids, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5, 185–197.

50. Chiu C.H., Lu Z.Y. Tseng Y.Y. & Pan T.M. (2006). The effects of *Lactobacillus*-fermented milk on lipid metabolism in hamsters fed on high cholesterol diet. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 238–245.
51. Choi Y., Kim Y.C., Han Y.B., Park Y., Pariza M.W. & Ntambi J.M. (2000). The *trans*- 10,*cis*-12 Isomer of Conjugated Linoleic Acid Downregulates Stearoyl-CoA Desaturase 1 Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Nutrition*, 130: 1920-4.
52. Chou, L.S. & B. Weimer. (1999). Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82: 23–31.
53. Coakley M., Ross R.P., Nordgren M., Fitzgerald G., Devery R. & Stanton,C. (2003). Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 138–145.
54. Coleman J.P. & Hudson L.L. (1995). Cloning and characterization of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Clostridium perfringens*. *Applied Environmental Microbiology*, 61(25): 14-2520.
55. Collomb M., Bisig W., Bütikofer U., Sieber R., Bregy M. & Etter L. (2008). Seasonal variation in the fatty acid composition of milk supplied to dairies in the mountain regions of Switzerland. *Dairy Science and Technology*, 88: 631–647.
56. Coakley M., Banni S., Johnson M.C., Mills S., Devery R., Fitzgerald G., Ross R.P. & Stanton C. (2009). Inhibitory effect of conjugated alpha-linolenic acid from bifidobacteria of intestinal origin on SW480 cancer cells. *Lipids*, 44:249–256.
57. Conway P.L., Gorbach S.L. & Goldin, B.R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 70: 1-12.
58. Cook M.T., Tzortzis G., Charalampopoulos D. & Khutoryanskiy V.V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162: 56–67.
59. Corcoran B. M., Ross R.P., Fitzgerald G.F. & Stanton C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 1024–1039.
60. Corcoran B. M., Stanton C., Fitzgerald G. F. & Ross R. P. (2005). Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Applied Environmental Microbiology*, 3060–3067.
61. Corcoran B.M., Stanton C., Fitzgerald G.F. & Ross R.P. (2007). Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice. *Microbiology*, 153: 291–299.
62. Corzo G. & Gilliland S.E. (1999). Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82: 472–480.
63. Culligan E.P., Hill C. & Sleator R.D. (2009). Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. *Gut Pathogens*, 1:19.
64. Cutting S.M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28:214-220.

**-D-**

65. Danielson A.D., Peo E.R.J., Shahani K.M., Lewis A.J., Whalen P.J. & Amer M.A. (1989) Anticholesterolemic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *Journal of Animal Science*, 67:966–974.
66. Dashkevicz M.P. & Feighner S.D. (1989). Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. *Applied Environmental Microbiology*, 55: 11–16.

67. Dave R.I. & Shah N.P. (1996). Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science*, 9: 1529–1536.
68. Dave R. I. & Shah N.P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science*, 81: 2804–2816.
69. Dave R.I. & Shah N.P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter culture. *International Dairy Journal*. 7: 31–41.
70. Delzenne N.M. & Roberfroid M.B. (1994). Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensmittel-Wissenschaft and-Technologie*, 27: 1-6.
71. De Man J.C., Rogosa M. & Sharpe M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135.
72. Denich T.J., Beaudette L.A., Lee H. & Trevors J.T. (2003). Effect of selected environmental and physio-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 149–182.
73. Desjardins M., Roy D. & Goulet G. (1990). Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *Journal of Dairy Science*, 73: 299- 307.
74. De Smet I., Van Hoorde L., De Saeyer N., Vande woestyne M. & Verstraete W. (1994). *In vitro* study of bile salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity. *Microbial Ecology Health Disease*, 7: 315-329.
75. De Smet I., Van Hoorde L., Vande Woestyne M., Christiaens H. & Verstraete W. (1995). Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 79: 292–301.
76. De Vos P., Faas M.M., Spasojevic M. & Sikkema J. (2009). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20: 292–302.
77. De Vos P., Faas M., Spasijevic M. & Sikkema J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20, 4: 292–302.
78. Devillard E., McIntosh F.M., Duncan S.M. & Wallace R.J. (2007). Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: Different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid. *Journal of Bacteriology*, 189: 2566–2570.
79. De Vrese M. & Schrezenmeir J. (2008). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 111: 1–66.
80. Dianawati D., Mishra V. & Shah N.P. (2013). Stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* during storage at room temperature at low aw. *Food Research International*, 50 : 259–265.
81. Dilmi-Bouras A. & Sadoun D. (2002). Effet du yaourt à *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* sur le cholestérol sanguin chez le lapin. *Medicine & Nutrition*, 38(1): 24-32.
82. Dilmi-Bouras A. (2006). Assimilation (*in vitro*) of cholesterol by yogurt bacteria. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 13: 49–53.
83. Dilmi-Bouras A., Koïche M. & Tabti M. (2007). The effect of *Lactobacillus paracasei* on the rabbit's Cholesterolemia. *African Journal of Biotechnology*, 6 (24): 2840-2845.
84. Ding W.K. & Shah, N.P. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 72: 446–450.

85. Ding W.K. & Shah N.P. (2009). An Improved Method of Microencapsulation of Probiotic Bacteria for Their Stability in Acidic and Bile Conditions during Storage. *Journal of Food Science*, 74 (2) : 53–61.
86. Doherty S.B., Gee V.L., Ross R.P., Stanton C., Fitzgerald G.F. & Brodkorb A. (2010). Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Microbiological Methods*, 80: 231–241.
87. Doleyres Y., Schaub L. & Lacroix C. (2005). Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties. *Journal of Dairy Science*, 88 (12): 4146–4156.
88. Dongowski G., Lorenz A. & Anger H. (2000). Degradation of Pectins with Different Degrees of Esterification by *Bacteroides thetaiotaomicron* Isolated from Human Gut Flora. *Applied and Environmental Microbiology*, 1321–1327.
89. Duboc P. & Mollet B. (2001). Applications of exopolysaccharides in dairy industry. *International Dairy Journal*, 11:759–768.
90. Duboc P. & Mollet B. (2001). Applications of exopolysaccharides in dairy industry. *International Dairy Journal*, 11:759–768.
91. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. & Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350–356.
92. Dupont I., Roy D. & Lapointe G. (2000). Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24: 251–255.
93. Du Toit M., Franz C.M., Dicks L.M., Schillinger U., Haberer P., Warlies B., Ahrens F. & Holzapfel W.H. (1998). Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International Journal of Food Microbiology*. 40: 93–104.

**-E-**

94. Ecker J., Liebisch G., Patsch W. & Schmitz G. (2009). The conjugated linoleic acid isomer trans-9,trans-11 is a dietary occurring agonist of liver X receptor alpha. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388: 660–666.
95. EFSA (European Food Safety Authority) (2010). EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) Scientific Opinion on the safety of “conjugated linoleic acid (CLA)-rich oil” (Lipid Nutrition) as a Novel Food ingredient. *EFSA Journal*, 8(5): 43. Available online: [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu).
96. EFSA (European Food Safety Authority) (2011). Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to alpha-linolenic acid and contribution to brain and nerve tissue development pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4):2130.
97. Elkins E.A. & Savage D.C. (1998). Identification of genes encoding conjugated bile salt hydrolase and transport in *Lactobacillus johnsonii* 100-100. *Journal of Bacteriology*, 180:4344 – 4349.
98. Elli M., Callegari M.L., Ferrari S., Bessi E., Cattivelli D., Soldi S., Morelli L., Goupil Feuillerat N. & Antoine J.M. (2006). Survival of yogurt bacteria in the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5113–5117.
99. Englyst H.N, Kingman S.M. & Gummings J.H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2 (46): 33-50.
100. Erdman J.J.W., Carson L., Kwik-Urbe C., Evans E.M. & Allen R.R. (2008). Effects of cocoa flavanols on risk factors for cardiovascular disease. *Asia Pacific Journal of clinical Nutrition*, 17 (S1): 284-284.

101. Evans M., Brown J. & McIntosh M. (2002). Isomer specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 508.

-F-

102. FAO/WHO (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. In: Pineiro M. & Schlundt J., eds. *Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, 1-4 October, 2001, Cordoba, Argentina*. Roma: FAO, [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf).
103. FAO/OMS (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Report of a joint FAO/OMS Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London Ontario, Canada.
104. Fávaro-Trindade C.S. & Grosso C.R.F. (2002). Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, 19: 485-494.
105. Fiordaliso M., Kok N., Desager J.P., Goethals F., Debooyer D., Roberfroid M. & Delzenne N. (1995). Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. *Lipids*, 30: 163-167.
106. Folch J., Lees M. & Stanley G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
107. Foligne B., Nutten S., Granette 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: 236-243.
108. Frank A. (2002). Prébiotiques. In *Aliments fonctionnels*, Roberfroid M. Editions Tec & Doc, *Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires*, 105-123.
109. Franz C.M.A.P., Speth L., Haberer P. & Holzfel W.H. (2001). Bile salt hydrolase activity of *enterococci* isolated from food : Screening and quantitative determination. *Journal of Food Protection*, 64: 725-729.
110. Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.

-G-

111. Garcia-Albiach R., Jose M., De Felipe P., Angulo S., Morosini M.I., Bravo D., Baquero F. & Del Campo R. (2008). Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87: 91-96.
112. Gbassi G.K., Vandamme T., Ennahar S. & Marchioni E. (2009) *Microencapsulation of Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey protein. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 103-105.
113. Gentès M.C. (2011). Compréhension du rôle structural d'exopolysaccharides de bactéries lactiques dans des systèmes laitiers fermentés enrichis en amidon modifié. Thèse de doctorat de l'Université Laval (Canada).
114. Gibson G. & Roberfroid M. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125 : 1401-1412.
115. Gérard P., Lepercq P., Leclerc M., Gavini F., Raibaud P. & Juste C. (2007). Bacteroides sp. Strain D8, the First Cholesterol-Reducing Bacterium Isolated from Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 5742-5749.

116. Gilliland S.E., Staley T.E. & Bush L.J. (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67: 3045-3051.
117. Gilliland S.E., Nelson C.R. & Maxwell C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 377-38.
118. Giraffa G., Paris A., Valcavi L., Gatti M. & Neviani E. (2001). Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of Applied Microbiology*? 91: 937-943.
119. Gobbetti M., Corsetti A., Smacchi E., Zocchetti A. & De Angelis M. (1998). Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. 81:37-47.
120. Godward G. & Kailasapathy K. (2003). Viability and survival of free, encapsulated and co-encapsulated probiotic bacteria in yoghurt. *Milk Science International (Milchwissenschaft)*, 58: 396-399.
121. Godward G., Sultana K., Kailasapathy K., Peiris P., Arumugaswamy R. & Reynolds N. (2000). The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods. *Milchwissenschaft- Milk Science International*, 55: 441- 445.
122. Gorissen L., De Vuyst L., Raes K., De Smet S. & Leroy F. (2012). Conjugated linoleic and linolenic acid production kinetics by bifidobacteria differ among strains. *International Journal of Food Microbiology*, 155: 234-240.
123. Granlund L., Juvet L., Pedersen J. & Nebb H. (2003). Trans10, cis12 conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPAR gamma modulator. *Journal of Lipid Research*, 44 : 1441- 1452.
124. Grill J.P., Schneider F., Crociani J. & Ballongue J. (1995). Purification and characterization of conjugated bile salt hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536. *Applied Environmental Microbiology*, 61: 2577-2582.
125. Guarner F., Khan A.G., Garisch J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A. Krabshuis J. & Le Mair T. (2012). Probiotiques et Prébiotiques. World Gastroenterology Organisation. Organisation mondiale de Gastroentérologie (Aout 2008). *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46(6) :468-81.

### -H-

126. Ha Y.L., Grimm N.K. & Pariza M.W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 8: 1881-1887.
127. Ha J.K. & Lindsay R.C. (1990). Method for the quantitative analysis of volatile free and total branched-chain fatty acids in cheese and milk fat. *Journal of Dairy Science*, 73: 1988-1999.
128. Haider T. & Husain Q. (2008). Concanavalin A layered calcium alginate-starch beads immobilized  $\beta$ -galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients. *International Journal of Pharmaceutics*, 359: 1-6.
129. Hajirostamloo B. (2010). Bioactive Component in Milk and Dairy Product. *World Academy of Science, Engineering and technology*, 7: 72, 162-166.
130. Hansen LT., Allan-Wojtas P.M., Jin Y.L. & Paulson A.T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastro-intestinal conditions. *Food Microbiology*, 19, 35-45.
131. Hara H., Saito Y., Nakashima H. & Kiriya S. (1994). Evaluation of fermentability of acid-treated maize husk by rat caecal bacteria in vivo and in vitro. *British Journal of Nutrition*, 71: 719 - 729.
132. Harden C.J., Richardson J.C., Dettmar P.W. & Corfe B.M. (2012). An ionic-gelling alginate drink attenuates postprandial glycaemia in males. *Journal of Functional Foods*, 4: I22-I28.

- 133.Hartmann R. & Meisel H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 163–169.
- 134.Heidebach T., Först P. & Kulozik U. (2009). Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*, 19: 77–84.
- 135.Heidebach T., Först P. & Kulozik U. (2012). Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52:2, 183-199.
- 136.Hnebner J., Wehling R J. & Hutkins R.W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *Internationnal Dairy Journal*, 17 : 770 - 775.
- 137.Holzappel W.H., Haberer P., Snel J. & Schillingeru Huis Veld J.H. (1998). Overview of gut flora end probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41-101.
- 138.Homayouni A., Azizi A., Ehsani M.R., Yarmand M.S. & Razavi S.H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111:50–55.
- 139.Hosono A. & Tono-Oka T. (1995). Binding of cholesterol with lactic acid bacterial cells. *Milchwissenschaft*, 50: 556–560.
- 140.Howard F.A.C. & Henderson C. (1999) Hydrogenation of polyunsaturated fatty acids by human colonic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 193–196.
- 141.Hoyles L. & Wallace R.J. (2010). Gastrointestinal Tract: Intestinal Fatty Acid Metabolism and Implications for Health. K. N. Timmis (ed.). *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4\_234.
- 142.Huang Y. & Zheng Y. (2010).The probiotic *Lactobacillus acidophilus* reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition*, 103(4) :473-8.
- 143.Hyndman C.L., Groboillot A., Poncelet D., Champagne C. & Neufeld R.J. (1993). Microencapsulation of *Lactococcus lactis* with cross-link gelatin membranes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 56: 259-263.

**-I-**

- 144.Isolauri E., Salminen S. & Ouwehand A.C. (2004). Probiotics. *Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*, 18 (2), 299–313.
- 145.Iyer C. & Kailasapathy K. (2005). Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *Journal of Food Science*, 70: 18– 23.

**-J-**

- 146.Jain S., Yadav H. & Sinha P.R. (2009). Antioxidant and cholesterol assimilation activities of selected lactobacilli and lactococci cultures. *Journal of Dairy Research*, 76: 385- 391.
- 147.Jeun J., Kim S., Cho S.Y., Jun H.J., Park H.J., Seo J.G., Chung M.J. & Lee, S.J. (2010). Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition*, 26: 321–330.
- 148.Jiang J., Bjorck L. & Fonden R. (1998). Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 95–102.
- 149.Jiménez-Pranteda M.L., Poncelet D., Náder-Macías M.E., Arcos A., Aguilera M., Monteoliva-Sánchez M. & Ramos-Cormenzana A. (2011). Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113: 2, 179–184.

150. Joseph S.V., Jacques H., Plourde M., Mitchell P.L., McLeod R.S. & Jones P.J.H. (2011). Conjugated Linoleic Acid Supplementation for 8 Weeks Does Not Affect Body Composition, Lipid Profile, or Safety Biomarkers in Overweight, Hyperlipidemic Men. *Journal of Nutrition*, 141: 1286–1291.

-K-

151. Kailasapathy K. (2002). Microencapsulation of probiotics bacteria: Technology and application. *Current Issues International Microbiology*, 3: 39-48.
152. Kailasapathy K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yogurt. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie- Food Science and Technology*, 39:1221–1227.
153. Kailasapathy K. & Rybka S. (1997). *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.-their therapeutic potential and survival in yoghurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, 52: 28-33.
154. Kankaanpää P., Yang B., Kallio H., Isolauri E. & Salminen S. (2004). Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Growth Medium on Lipid Composition and on Physicochemical Surface Properties of *Lactobacilli*. *Applied Environmental Microbiology*, 70: 129–136.
155. Kaplan H. & Hultkins R.W. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2682- 2684.
156. Kelly M.L. & Bauman D.E. (1996). Conjugated linoleic acid: a potent anticarcinogen found in milk fat. In *Proc. Cornell Nutrition Conference*. Ithaca, New York, 68 - 74.
157. Kim G.B., Brochet M. & Lee B.H. (2005). Cloning and characterization of a bile salt hydrolase (*bsh*) from *Bifidobacterium adolescentis*. *Biotechnology Letters*, 27: 817–822.
158. Kim Y.J., Liu R.H., Bond D.R. & Russell J.B. (2000). Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 5226-5230.
159. Kim Y.J. & Liu R. H. (2002). Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 67, 1731–1737.
160. Kim G.B., Yi S.H. & Lee B.H. (2004). Purification and characterisation of three different types of bile salt hydrolase from *Bifidobacterium* strains. *Journal of Dairy Science*, 87: 258–266.
161. Kimoto H., Ohmomo S., Nomura M., Kobayashi M. & Okamoto T. (2000). *In vitro* studies on probiotic properties of *lactococci*. *Milchwissenschaft*, 55: 245-249.
162. Kimoto H., Ohmomo S. & Okamoto T., (2002). Cholesterol removal from media by lactococci. *Journal of Dairy Science*, 85: 3182- 3188.
163. Kimoto-Nira H., Mizumachi K., Komura M., Kobayashi M., Fujita Y., Okamoto T., Suzuki I., Tsuji N.M.M., Kurisaki J-I. & Ohomomo S. (2007). *Lactococcus* sp as potential probiotic lactic acid bacteria. *Japan Agricultural Research*, 41: 181-189.
164. Kirby C. (1991). Microencapsulation and controlled delivery of food ingredients. *Food Science and Technology Today*, 5: 74–78.
165. Klaver F.A.M. & Van der Meer R. (1993). The assumed estimation of cholesterol removal by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugation activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1120–1124.

166. Klein J., Stock J. & Vorlop K.D. (1983). Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18(1): 86–91.
167. Kok N., Robertfroid M., Robert A. & Delzenne A. (1996). Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *British Journal of Nutrition*, 76: 881–890.
168. Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16: 945–960.
169. Krasaekoopt W., Bhandari B. & Deeth H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13: 3–13.
170. Krasaekoopt W., Bhandari B. & Deeth, H. (2004). Comparison of texture of yogurt made from conventionally treated milk and UHT milk fortified with low-heat skim milk powder. *Journal of Food Science*, 69 (6), E276–E280.
171. Kritchevsky D., Tepper S.A., Czarnecki S.K., & Klurfeld D.M. (1982). Atherogenicity of animal and vegetable protein. Influence of the lysine to arginine ratio. *Atherosclerosis*, 41: 429–431.
172. Kumar M., Rakesh S., Nagpal R., Hemalatha R., Ramakrishna A., Sudarshan V., Ramagoni R., Shujauddin M., Verma V., Kumar A., Tiwari A., Singh B. & Kumar R. (2013, sous presse). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and Aloe vera gel improve lipid profiles in hypercholesterolemic rats. *Nutrition*. 2012 Dec 31. pii: S0899-9007(12)00362-0. doi: 10.1016/j.nut.2012.09.006. [Epub ahead of print]
173. Kurdi P., Tanaka H. Van Veen H.W., Asano K., Tomita F. & Yokota A. (2003). Cholic acid accumulation and its diminution by short-chain fatty acids in bifidobacteria. *Microbiology*, 149:2031–2037.
- L-
174. Lacroix C., Grattepanche F., Doleys Y. & Bergmaier D. (2005). Immobilised cell technologies for the dairy industry. In: *Applications of Cell Immobilization Biotechnology*, 295–319.
175. Langkilde A.M., Andersson H. & Bosaeus. (1993). Sugar-beet increases cholesterol and reduces bile acid excretion from the small bowel. *British Journal of nutrition*, 70: 757–766.
176. Lebeer S., Claes J.J.I. & Vanderleyden J. (2012). Anti-inflammatory potential of probiotics: lipoteichoic acid makes a difference. *Trends in Microbiology*, 20 (1): 5–10.
177. LeDoux M., Laloux L., Fontaine J.J., Carpentier Y.A., Chardigny J.M. & Sébédio J.L. (2007). Rumenic acid significantly reduces plasma levels of LDL and small dense LDL cholesterol in hamsters fed a cholesterol- and lipid-enriched semi-purified diet. *Lipids*, 42(2):135–41.
178. Lee B.H., Haché S. & Simard R.E. (1986). A rapid method of differentiation of diary acid lactic bacteria by enzyme systems. *Journal of Industrial Microbiology*, 1: 209.
179. Lee K. & Lee Y., (2009). Production of c9, t11- and t10, c12-conjugated linoleic acids in humans by *Lactobacillus rhamnosus* PL60. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19: 1617–1619.
180. Lee K., Paek K., Lee H.Y., Park J.H. & Lee, Y. (2007). Antiobesity effect of *trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-induced obese mice. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1140–1146.
181. Lee H.Y., Park, J.H., Seok S.H., Baek M.W., Kim D.J., Lee K.E., Paek K.S. & Lee Y., (2006). Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1761: 736–744.
182. Léger C.L. & Razanamahefa, L. (2005) Risks and benefits of food with *trans* fatty acids for human health – Recommendations. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 2 (1): 61–67.

183. Levrat M.A., Favier M.L., Mondras C., Remesy C. & Morand C. (1994). Role of dietary propionic acid and bile acid excretion in the hypocholesterolemic effects of oligosaccharides in rats. *Journal of Nutrition*, 124: 531- 538.
184. Li H. & Papadopoulos V. (1998). Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/ interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology*, 139: 4991-4997.
185. Li H., Yao Z.X., Degenhardt B., Teper G. & Papadopoulos V. (2001). Cholesterol binding at the cholesterol recognition/ interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 98: 267-272.
186. Lichtenstein A.H. (1990). Intestinal cholesterol metabolism. *Annals of Medicine*, 22:49-52.
187. Li H. & Papadopoulos V. (1998). Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology*, 139(12): 4991-7.
188. Lin T.Y. (2003). Influence of lactic cultures, linoleic acid and fructooligosaccharides on conjugated linoleic acid concentration in non-fat set yoghurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 11-14.
189. Lin H., Boylston T.D., Chang M.J., Luedecke L.O. & Shultz T.D. (1995). Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *Journal of Dairy Science*, 78: 2358-65.
190. Lin T.Y., Lin C.W. & Lee C.H. (1999). Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chemistry*, 67, 1-5.
191. Lin T.Y., Lin C.W. & Wang, Y.J. (2003). Production of conjugated linoleic acid by enzyme extract of *Lactobacillus acidophilus* CCRC 14079. *Food Chemistry*, 83, 27-31.
192. Liong M.T. & Shah N.P. (2005a). Acid and bile tolerance and the cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*, 88: 55-66.
193. Liong M.T. & Shah N.P. (2005b). Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co-precipitating properties. *International Dairy journal*, 15: 391-398.
194. Liong M.T. (2007). Probiotics: A Critical Review of Their Potential Role as Antihypertensive, Immune Modulators, Hypocholesterolemic and Premenopausal Treatments. *Nutrition Revue*, 65:1-13.
195. Loor J.J., Ueda K., Ferlay A., Chilliard Y. & Doreau M. (2004). Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage: concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87:2472-2485.
196. López-Rubio A., Sanchez E., Wilkanowicz S., Sanz Y. & Lagaron J.M. (2011). Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, 28: 159-167.
197. Lovegrove J.A. & Jackson K.G. (2004). Functional food, blood lipids and cardiovascular disease. Part 2: prebiotics and synbiotics. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 15 (2): 37-39.
198. Lye H.S., Rusul G. & Liong M.T. (2010a). Mechanisms of Cholesterol Removal by Lactobacilli Under Conditions That Mimic the Human Gastrointestinal Tract. *International Dairy Journal*, 20: 169-175.
199. Lye H.S., Rusul G. & Liong M.T. (2010b). Removal of Cholesterol by Lactobacilli via Incorporation of and Conversion to Coprostanol. *Journal of Dairy Science*, 93: 1383-1392.
200. Lye H.S., Abdul Alias K., Rusul G. & Liong M.T. (2012). Ultrasound treatment enhances cholesterol removal ability of lactobacilli. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19 (3): 632-641.

## -M-

201. Ma K.Y., Yang N., Jiao R., Peng C., Guan L., Huang Y. & Chen Z.Y. (2011). Dietary calcium decreases plasma cholesterol by down-regulation of intestinal NPC1L1 and MTP and up regulation of CYP7A1 and ABCG 5/8 in hamsters. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2: 247-258.
202. Macouzet M., Lee B.H. & Robert N. (2010). Genetic and structural comparison of linoleate isomerases from selected food-grade bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6):2128-34.
203. Mano J.F., Silva G.A., Azevedo H.S., Malafaya P.B., Sousa R.A., Silva S.S., Boesel L.F, Oliveira J.M, Santos T.C, Marques, A.P, Neves N.M. & Reis R.L (2007). Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: Present status and some moving trends. *Journal of the Royal Society Interface*, 4: 999–1030.
204. Manson J.E., Tosteson, H. & Ridker, P.M. (1992). The primary prevention of myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 32: 1406–1416.
205. Marlett J.A. (1997). Sites and mechanisms for the hypercholesterolemic actions of soluble dietary fiber sources. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 427: 109.
206. Marshal V.M., Cole W.M. & Mabbitt L.A. (1982). Fermentation of specially formulated milk single strains of bifidobacteria. *Journal of Society of Dairy Technology*, 35: 143.
207. Martinez-Villaluenga C. & Gómez R. (2007). Characterisation of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin prebiotic. *International Dairy Journal*, 17: 116- 122.
208. Martoni C., Bhathena J., Jones M.L., Urbanska A.M., Chen H. & Prakash S. (2007). Investigation of microencapsulated BSH active *Lactobacillus* in the simulated human GI tract. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 7: 136–184.
209. Matthan N.R., Pencina M., Larocque J.M., Jacques P.F., D'Agostino R.B., Schaefer E.J. & Lichtenstein A.H. (2009). Alterations in cholesterol absorption and synthesis characterize Framingham offspring study participants with coronary heart disease. *Journal of Lipid Research*, 50:1927–35.
210. Mc Auliffe O., Cano R.J. & Klaenhammer T.R. (2005). Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 4925–4929.
211. MDEIE (2010). Le ministère du Développement économique, de l'Innovation et de l'Exportation. Dépôt légal, 3<sup>ème</sup> trimestre 2010, Bibliothèque nationale du Québec, ISBN : 978-2-550-59136-8 (PDF). [www.economie.gouv.qc.ca/.../produits-de-sante-naturels/](http://www.economie.gouv.qc.ca/.../produits-de-sante-naturels/)
212. Meinertz H., Nilausen K. & Faergeman O. (1989). Soy protein and casein in cholesterol-enriched diets: effects on plasma lipoproteins in normolipidemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 50:786-93.
213. Menon S., Jain S., Nagpal R., Kumar M., Mohania D., Yadav D., Marotta F., Yadav M. & Yadav H. (2010). Immunomodulatory Potential of Conjugated Linolenic Acid. *Dietary Components and Immune Function Nutrition and Health*, 217-226.
214. Mills S., Ross R.P., Hill C., Fitzgerald G.F. & Stanton. C. (2011). Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human Health. *International Dairy Journal*, 21: 377-401.
215. Mohammadi G., Nokhodchib A., Barzegar-Jalalic M., Lotfipour F., Adibkiac K., Ehyaeif N. & Valizadeh H. (2011). Physicochemical and anti-bacterial performance characterization of clarithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88 (1): 39–44.
216. Mohan J.C. (1990). Preliminary observations on effect of *L. sporogenes* on serum lipid levels in hypercholesterolemic patients. *Indian Journal of Medical Research*, 92: 431–432.

217. Morelli L. (2000). In vitro selection of probiotic *Lactobacilli*: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1: 59-67.
218. Morin O. (2005). Acides gras trans : récents développements. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. 12 : 5 414-21.
219. Morita T., Oh-hashii A., Takei K., Ikai M., Kasaoka S. & Kiriyama S. (1997). Cholesterol-lowering effects of soybean, potato and rice proteins depend on their low methionine contents in rats fed a cholesterol-free purified diet. *Journal of Nutrition*, 127: 470-477.
220. Moroti C., Magri L.F.S., de Rezende Costa M., Cavallini C.U.D. & Sivieri K. (2012). Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. *Lipids in Health and Disease*, 11: 29.
221. Mortazavian A.M., Azizi A., Ehsani M.R., Razavi S.H., Mousavi S.M., Sohrabvandi, S. & Reinheimer J.A. (2008). Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft*, 63 (4): 427-429.
222. Mosley E.E., McGuire M.K., Williams J.E. & McGuire M.A. (2006). *Cis-9,trans-11* Conjugated linoleic acid is synthesized from vaccenic acid in lactating women. *Journal of Nutrition*, 136: 2297-2301.
223. Muthukumarasamy P., Allan-Wojtas P. & Holley R.A. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in Different Types of Microcapsules. *Journal of Food Science*, 71: 20- 24.
224. Muthukumarasamy P. & Holley R.A. (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*, 111:164-169.
- N-
225. Nag A., Han K.S. & Singh H. (2010). Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. *International Dairy Journal*, 21: 247- 253.
226. Nagao K. & Yanagita T. (2008). Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Progress in Lipid Research*, 47 (2): 127-146.
227. Nagaoka S., Futamura Y., Miwa K., Awano T., Yamauchi K., Kanamaru Y., Tadashi K. & Kuwata T. (2001). Identification of novel hypocholesterol peptides derived from bovine milk  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281: 11-17.
228. Nazzaro F., Fratianni F., Coppola R., Sada A. & Pierangelo O. (2009). Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 319-323.
229. Nebra Y. & Blanch AR., 1999. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 5173- 5176.
230. Nilsson K., Birnbaum S., Flygare S., Linse L., Schroder U., Jeppsson U., Larsson P. O., Mosbach K. & Brodelius, P. (1983). A general-method for the immobilization of cells with preserved viability. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17: 319-326.
231. Noh D.O., Kim S.H. & Gilliland S.E. (1997). Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Journal of Dairy Science*, 80: 3107-3113.
232. Noriega L., Gueimonde M., Sánchez B., Margolles A. & Los Reyes-Gavilán C.G. (2004). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 94:79-86.

**-O-**

233. Ogawa J., Kishino S., Ando A., Sugimoto S., Mihara K. & Shimizu S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100: 355–364.
234. Olano-Martin E., Gibson G.R. & Rastall R.A. (2002). Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pecticoligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 505-511.
235. OMS (2009). Rapport sur la santé en Europe 2009 Santé et systèmes de santé. (<http://www.euro.who.int/>).
236. Ooi L.G. & Liong M.T. (2010). Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A Review of *in Vivo* and *in Vitro* Finding School of Industrial Technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 2499-2522.
237. Oyetayo V.O., Adetuyi F.C. & Akinyosoye F.A. (2003). Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in vivo*. *African Journal of Biotechnology*, 2 (11): 448-452.
238. Özer B., Kirmaci H.A., Şenel E., Atamer M. & Hayaloğlu A. (2009). Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*, 19 (1): 22–29.
239. Özer B., Uzun, Y.S. & Kirmaci H.A. (2008). Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during Kasar cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 61 (3): 237–244.

**-P-**

240. Panghyová E., Kačenová D., Hajdušková S., Matulová M. & Kiss E. (2006). Influence of free linoleic acid on the fatty acids profile of fermentation by selected probiotic bacteria. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45 (4): 159-165.
241. Pariza M.W., Park Y. & Cook M.E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, 40: 283–298.
242. Park Y., Albright K.J., Liu W., Storkson J.M., Cook M.E. & Pariza M.W. (1997). Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, 32: 853-858.
243. Park H.G., Cho S.D., Kim J.H., Lee H., Chung S.H., Kim S.B., Kim H.S., Kim T., Choi N.J. & Kim Y.J. (2009). Characterization of conjugated linoleic acid production by *Bifidobacterium breve* LMC 520. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:7571–7575.
244. Park Y., Storkson J.M., Albright K.J., Liu W. & Pariza M.W. (1999). Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice, *Lipids*, 34: 235–241.
245. Patel H.M., Pandiella S.S., Wang R.H. & Webb C. (2004). Influence of malt, wheat, and barley extracts on the bile tolerance of selected strains of lactobacilli. *Food Microbiology*, 21: 83-89.
246. Patterson C.A. (2008). Substances lactières bioactive plus que du calcium. *Revue la qualité nature*.
247. Pavlović N., Stankov K. & Mikov M. (2012). Probiotics-interactions with bile acids and impact on cholesterol metabolism. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(7):1880-95.
248. Pereira D.I.A. & Gibson G.R. (2002a). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4689–4693.
249. Pereira D.I.A. & Gibson G.R. (2002b). Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum Lipid levels in Humans. *Biotechnology and Molecular biology*, 37 (4): 259- 281.

250. Pereira D.I., McCartney A.L. & Gibson G.R. (2003). An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 4743–4752.
251. Petrone G., Conte M. P., Longhi C., Di Santo S., Superti F., Ammendolia M. G., Valenti P. & Seganti L. (1998). Natural milk fatty acids affect survival and invasiveness of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 362–368.
252. Pfeiler E.A., Azcarate-Peril M.A. & Klaenhammer T.R. (2007). Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Bacteriology*, 189: 4192–4198.
253. 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: 505–515.
254. Pinheiro A.C., Bourbon A.I., Rocha C., Ribeiro C., Maia J.M., Gonc M.P. , Alves Teixeira J.A. & Vicente A.A. (2010). Rheological characterization of  $\kappa$ -carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: Comparison of galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 83 (2): 392–399.

-R-

255. Rambaud J.C. (2004). Flore microbienne intestinale: Physiologie et pathologie digestives. *Edition Medical, John Libbey Eurotext*, 247.
256. Rastall R.A. (2004). Bacteria in the gut: Friends and foes and how to alter the balance. *Journal of Nutrition*, 134:2022–2026.
257. Renard A.C. (2000). Les ingrédients santé à la conquête de l'Europe. *Revue Laitière Française*, 598 : 16-21.
258. Reynier M.O., Montet J.C., Gerolami A., Marteau C., Crotte C., Montet A.M. & Mathieu S. (1981). Comparative effects of cholic, chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on micellar solubilization and intestinal absorption of cholesterol. *Journal of Lipid Research*, 22: 467–473.
259. Riaz Q.U. & Masud T. (2013). Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 53(3): 231-44.
260. Riazi A. & Ziar H. (2012). Effect of honey and starter culture on growth, acidification, sensory properties and bifidobacteria cell counts in fermented skimmed milk. *African Journal of Microbiology Research*, 6 (3) : pp. 486-498.
261. Riazi A. & Ziar H. (2008). Growth and viability of yogurt starter organisms in honey-sweetened skimmed milk. *African Journal Of Biotechnology*, 7 (12): 2055-2063.
262. Ringseis R., Wen G., Saal D. & Eder K. (2008) Conjugated linoleic acid isomers reduce cholesterol accumulation in acetylated LDL-induced mouse RAW264.7 macrophage-derived foam cells. *Lipids*, 43: 913–923.
263. Rizkalla S.W., Luo J., Kabir M., Chevalier A., Pacher N. & Slama G. (2000). Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72: 1474-1479.
264. Roberfroid M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition*, 137: 830-837.
265. Rodríguez-Alcalá L., Braga T., Malcata X., Gomes A. & Fontecha J. (2011). Quantitative and qualitative determination of CLA produced by Bifidobacterium and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag<sup>+</sup>-HPLC techniques. *Food Chemistry*, 125: 1373–1378.

266. Ross R.P., Desmond C., Fitzgerald G.F. & Stanton, C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1410–1417.
267. Rowley J.A., Madlambayan G. & Mooney D.J. (1999). Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 20 (1): 45-53.
268. Rymaszewski J., Poznanski P. & Markowicz-robaczewska M. (1972). Dégradation des alphas, bêta et kappa-caséine par la suspension de germes des bactéries de la fermentation lactique. *Lait*, 52 : 571-585.

-S-

269. Sajilata M.G., Singhal R.S. & Kulkarni P.R. (2006). Resistant starch – A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5: 1–17.
270. Samona A., Robinson R.K. & Marakis S. (1996). Acid production by *bifidobacteria* and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiology*, 13: 275–280.
271. Sandoval-Castilla O.C., Labato-Calleros H.S., Garcia-Galindo J., Alvarez-Ramirez E. & Vernon-Carter J. (2010). Textural properties alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lactobacillus casei* in simulated gastrointestinal conditions and yoghurt. *Food Research International*, 43: 111-117.
272. Shabala L., Budde R., Ross T., Siegumfeldt H. & MacMeekin T. (2002). Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability monitored by measurement of intercellular pH and viable counts. *International Journal of Food Microbiology*, 75: 89- 97.
273. Schoonjans K., Peinado-Onsurbe J., Lefebvre A.M., Heyman R.A., Briggs M., Deeb S., Staels B. & Auwerx J. (1996). PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO (European Molecular Biology Organisation) Journal*, 15: 5336-5348.
274. Sebastiani H. & Zelger G. (1998). Texture formation by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*, 53: 15-17.
275. Sébédio J.L., Juanéda P., Dobson G., Ramilison I., Martin J.C., Chardigny J.M. & Christie W.W. (1997). Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. *Biochimica and Biophysica Acta*, 5-10.
276. Sébédio J.L., Brétilon L. & Chardigny J.M. (2001). Conjugated linoleic acid (CLA) and functional food. *OLéagineux Corps gras Lipides*, 8: 328-32.
277. Seelig A. & Seelig J. (1996). Interaction of drugs and peptides with the lipid membrane. In T. Schwartz, S. A. Hijorth, J. Sandolm Kastrup (Eds.), Alfred Benzon symposium 39 “structure and function of 7Tm receptors” (pp. 184–193). Muntsgaard, Copenhagen.
278. Sekimoto H., Goto Y., Goto Y., Naito C., Yasugi T., Okido M., Kuzuya F., Takeda R., Yamamoto A., Fukuzaki H., & al. (1983). Changes of serum total cholesterol and triglyceride levels in normal subjects in Japan in the past twenty years. Research committee on familial hyperlipidemia in Japan. *Japanese Circulation Journal*, 47(12):1351-8.
279. Shah N.P. & Jelen P. (1990). Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *Journal of Food Science*, 55: 506–509.
280. Shah N.P., Lankapulhira W.E.V., Britz M.L. & Kyle W.S.A. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yogurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 5:515–521.
281. Sher J., Pronczuk A., Hajri T. & Hayes K.C. (2003). Dietary conjugated linoleic acid lowers plasma cholesterol during cholesterol supplementation, but accentuates the atherogenic lipid profile during the acute phase response in hamsters. *Journal of Nutrition*, 133: 456–60.

282. Sheu T.Y. & Marshall R.T. (1993). Microentrapment of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 58: 557–561.
283. Shinohara K. (1995). Functional foods for specific health use. The needs for compositional data. In: Greenfield H., ed. *Quality and accessibility of food related data. Proceedings of the 1<sup>st</sup> International food data base conference, 22-24 September, 1993, Australia*. Arlington, VA, USA: AOAC International, 305-310.
284. Smidsrod O. & Skjak-Braek G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8 (3): 71-78.
285. Smittle R.B., Gilliland S.E., Speck M.L. & Walter W.M. (1974). Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. *Applied Microbiology*, 27: 738–743.
286. Sodini I., Lucas A., Oliveira MN., Remeuf F. & Corrieu G. (2002). Effect of Milk Base and Starter Culture on Acidification, Texture, and Probiotic Cell Counts in Fermented Milk Processing. *Journal of Dairy Science*, 85: 2479–2488.
287. Sohail A., Turner M.S., Coombes A., Bostrom T. & Bhandari B. (2010). Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 162–168.
288. Song H.J., Grant I., Rotondo D., Mohede I., Sattar N., Heys S.D. & Wahle, K.W. (2005). Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59: 508–517.
289. Sridevi N., Vishwe P. & Prabhune A. (2009). Hypocholesteremic effect of bile salt hydrolase from *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005. *Food Research International*, 42: 516-520.
290. SSTC (2002). *Des risques pour la santé liés à l'alimentation aux normes des produits alimentaires : rapport de synthèse*. Bruxelles : Politique scientifique fédérale.
291. Stachowska E, Baskiewicz M, Marchlewicz M, Czupryńska K, Kaczmarczyk M, Wiszniewska B., Machaliński B. & Chlubek D. (2010). Conjugated linoleic acids regulate triacylglycerol and cholesterol concentrations in macrophages/foam cells by the modulation of CD36 expression. *Acta Biochimica Polonica*, 57(3):379-84.
292. Stangl GI. (2000). High dietary levels of conjugated linoleic acid mixture alter hepatic glycerophospholipid class profile and cholesterol-carrying serum lipoproteins of rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11:184–91.
293. Stanton C., Ross R.P., Fitzgerald G.F. & Van Sinderen D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 198-203.
294. Stoffel W., Chu F. & Ahrens Jr.E.H. (1959). Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography. Micromethod for preparation of methyl esters. *Analytical Chemistry*, 31: 307–308.
295. St-Onge M.P., Franworth E.R. & Jones. P.J.H. (2000). Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 674- 681.
296. Sultana K., Godward G., Reynolds N., Arumugaswamy R., Peiris P. & Kailasapathy, K. (2000) Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, . 62, 47-55.
297. Sun W. & Griffiths M. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan xathan beads. *International Journal of Food Microbiology*, 61: 17-25.

-T-

- 298.Tabas I. (2002). Cholesterol in health and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 110:583-590.
- 299.Tahri K., Crociani J., Ballongue J. & Schneider, F. (1995). Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 149–151.
- 300.Tahri K., Grill J.P. & Schneider F. (1996). Bifidobacteria strain's behavior towards cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilations. *Current Microbiology*, 33: 187- 193.
- 301.Tahri K., Grill J.P. & Schneider F. (1997). Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria. *Current Microbiology*, 34: 79-84.
- 302.Tanaka H., Hashiba H., Kok J. & Mierau, I. (2000). Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum* – biochemical and genetic characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2502–2512.
- 303.Tannock G.W. (2004). A Special Fondness for *Lactobacilli*. Minireview. *Applied Environmental Microbiology*, 3189–3194.
- 304.Tannock G.W. (2002). Probiotics and prebiotics: where are we going? In: Tannock G.W., ed. *Probiotics and prebiotics: where are we going?* Norfolk, U.K.: Caister Academic Press, 1-40.
- 305.Taranto M.P., Medici M., Perdigon G., Ruiz Holgado A.P. & Valdez GF. (1998) Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *Journal of Dairy Science*, 81: 2336–2340.
- 306.Taranto M.P., Perez-Martinez G. & Valdez G.F.. (2006). Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Research in Microbiology*, 157:720–725.
- 307.Terzaghi B.E. & Sandine W.E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29: 807-813.
- 308.Tokuşoğlu Ö. (2008). Conjugated linoleic acid (CLA). *Cis 9, trans 11 and trans 10, cis 12 isomer detection in crude and refined corn oils by capillary GC. Grasas y Aceites*, 59 (2): 146-151.
- 309.Tortuero F., Fernandez E., Ruperez P. & Moreno M. (1997). Raffinose and lactic acid bacteria influence caecal fermentation and serum cholesterol in rats. *Nutrition Research*, 17: 41- 49.
- 310.Turini, M.E. & Martin, J.C. (2001). Sources, Functions, and Analysis of Conjugated Linoleic Acid and Its Metabolites. Dans: Gunstone, F.D. (Ed), *Structured and Modified Lipids, Marcel Dekker, New York*, 251-284.
- 311.Turpeinen A.M., Mutanen M., Aro A., Salminen I., Basu S., Palmquist D.L. & Griinari, J.M. (2002). Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 504 - 510.

-U-

- 312.Umeki M., Oue K., Mochizuki S., Shirai Y. & Sakai K. (2004). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* KY-3 and cellobiose as synbiotics on lipid metabolism in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 50: 330-4.
- 313.Usman Hosono A. (2000). Effect of administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and faecal steroids in hypercholesterolemic rats. *Journal of Dairy Science*, 83: 1705–1711.

-V-

- 314.Vallée F. (2007). Synthèse et caractérisation d'un hydrogel d'alginamide pour la régénération de voies nerveuses lésées au sein du Système Nerveux Central chez le rat. Thèse de doctorat en Génie des procédés et des produits de l'INPL- Institut National Polytechnique de Lorraine (Lorraine, France).

315. Valeille K., D. Gripois, M. F. Bloquit, M. Souidi, M. Riottot, J. C. Bouthegourd, C. Serougne, & J.C. Martin. (2004). Lipid atherogenic risk markers can be more favourably influenced by the *cis-9, trans-11* octadecadienoate isomer than a conjugated linoleic acid mixture or fish oil in hamsters. *British Journal of Nutrition*, 91:191-199.
316. Vandamme F.T., Lenourry A., Charrueau C. & Chaumeil, J. (2002). The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate Polymers*, 48: 219–231.
317. Van der Meulen R., Makras L., Verbrugghe K., Adiany T. & De Vuyst L. (2005). In Vitro Kinetic analysis oligofructose consumption by *bacteriodes* and *bifidobacterium* spp. Indicates different degradation mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1006- 1012.
318. Vasiljevic T. & Shah N.P. (2008). Probiotics-from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18: 714– 728.
319. Vermeirssen V., Van der Bent A., Van Camp J., Van Amerongen A. & Verstraete W. (2004). A quantitative in silico analysis calculates the angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests. *Biochimie*, 86: 213–239.
320. Vinderola C.G. & Reinheimer J.A. (1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*, 9(8): 497-505.
321. Vinderola C.G., Bailo N. & Reinhemier J.A. (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinian yogurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33:97–102.

-W-

322. Walker D.K. & Gilliland S.E. (1993). Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 76:956–961.
323. Wang K. Y., Li S. N., Liu, C. S., Perng D. S., Su Y. C., Wu D.C. & al. (2005). Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 939-940.
324. Whitehead K., Versalovic J., Roos S. & Britton R.A. (2008). Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Applied Environmental Microbiology*, 74:1812–1819.
325. Wijaya A.A., Hermann H., Abriouel I., Specht N.M., Yousif W.H., Holzapfel V.H. & Franz C.M. (2004). Cloning of the bile salt hydrolase (*bsh*) gene from *Enterococcus faecium* FAIR-E-345 and chromosomal location *bsh* genes in food enterococci. *Journal Food Protection*, 67:2772–2778.

-X-

326. Xiao J.Z., Kondo S., Takahashi N., Miyaji K., Oshida K., Hiramatsu A., Iwatsuki K., Kokubo S. & Hosono A. (2003). Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *Journal of Dairy Science*, 86: 2452–2461.

-Y-

327. Yan Li X., Guang Chenb X., Suna Z.W., Park H.J. & Cha D.S. (2010). Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydrate Polymers*, 83: 1479–1485.
328. Yeung C.H.T., Yang L., Huang Y., Wang J. & Chen Z. Y. (2000). Dietary conjugated linoleic acid mixture affects the activity of intestinal acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase in hamsters. *British Journal of Nutrition*, 84: 935–941.

**-Z-**

329. Zhao Q.Z., Wang J.S., Zhao M.M., Jiang Y.M. & Chunl C. (2006). Effect of Casein Hydrolysates on Yogurt Fermentation and Texture Properties during Storage. *Food Technology and Biotechnology*, 44: 429-434.
330. Zhang F., Hangb X., Fanb X., Lia G. & Yang, H. (2007). Selection and optimization procedure of synbiotic for cholesterol removal. *Ecology/Environmental Microbiology Anaerobe*, 13: 185-192.
331. Ziar H. (2007). Effet du miel sur les aptitudes fermentaire de quelques souches de bifidobactéries sur milieu lait. Mémoire de Magister, université de Mostaganem.
332. Ziarno M. (2007). The influence of cholesterol and biomass concentration on the uptake of cholesterol by *Lactobacillus* from MRS broth, *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6: 29-40.
333. Zuidam N.J. & Shimoni E. (2009). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to take them. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V. (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer-Verlag, *New York Inc*, 3-29.
334. Zou Q., Zhao J., Liu X., Tian F., Zhang H., Zhang H. & Chen W. (2011). Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/ internal gelation. *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 1672-1678.

# **ANNEXES**

## ANNEXES

### - Annexe 1

La composition des milieux de culture ci-après, est calculée pour un litre de milieu de culture. Tous les milieux préparés (bouillons ou gélosés) sont autoclavés à 121°C/15min.

#### -Milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) sans sucre (De Man et al., 1960)

Peptone .....	10g
Extraits de viande de bœuf .....	8g
Acétate de sodium, 3H <sub>2</sub> O .....	5g
Extraits de levure .....	4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2g
Citrate d'ammonium .....	2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0.2g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O .....	0.05g
H <sub>2</sub> O .....	1000mL
Tween 80 .....	1.0 mL
pH.....	6.5±0.2

#### -Dilution simple (DS) (Nebra et Blanch, 1999)

Peptone.....	1g
NaCl.....	8.5g
L-cystéine-HCl.....	0.5g
H <sub>2</sub> O .....	1000mL
pH.....	7.0±0.2

#### -Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

Peptone tryptique de caséine.....	10g
Peptone pepsique de viande.....	2.5g
Peptone papaïque de soja.....	5g

Extrait de levure.....	2.5g
Extrait de viande.....	5g
D-glycérophosphate de sodium.....	13g
Mg SO <sub>4</sub> .....	0.25g
Lactose.....	5g
Acide ascorbique.....	0.5g
H <sub>2</sub> O .....	1000mL
pH.....	7.1±0.1

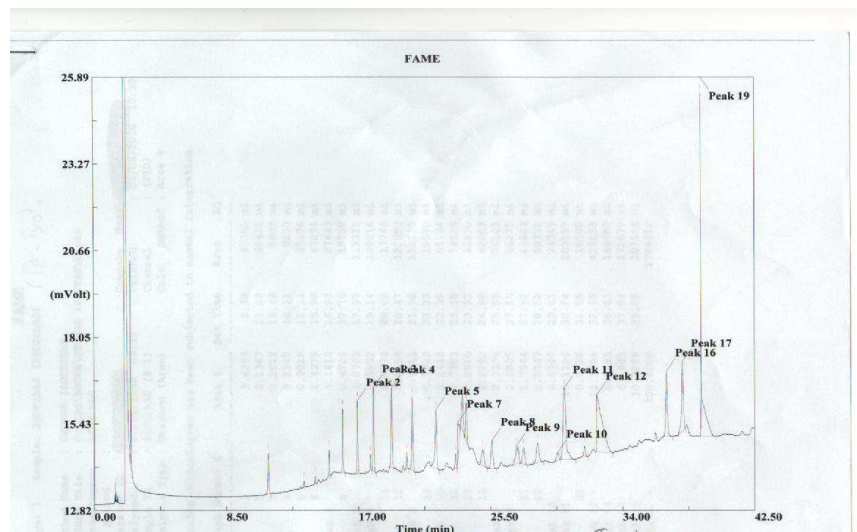
**-Milieu ST (*Streptococcus thermophilus* Agar)**

Tryptone.....	10g
Sucrose.....	5g
Extrait de levure.....	5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2g
H <sub>2</sub> O .....	1000mL
pH.....	6.8±0.1

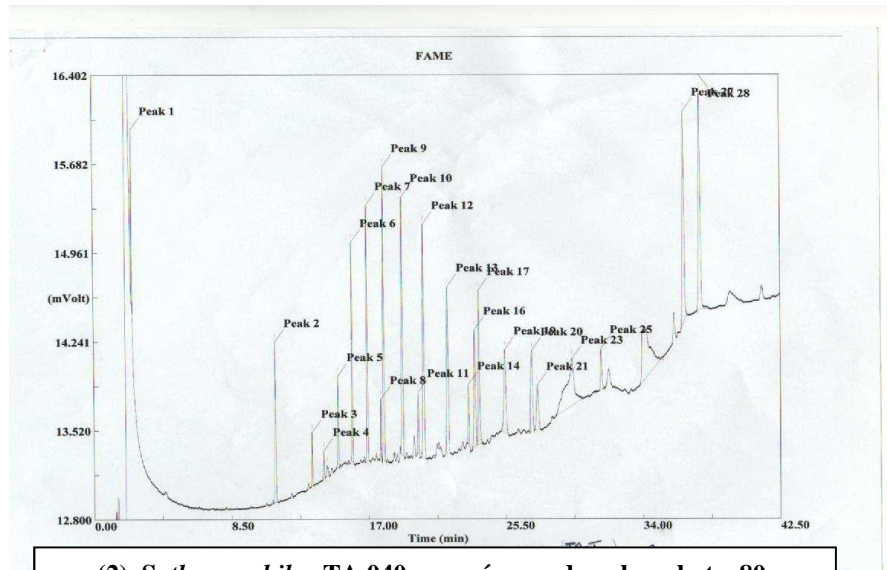
Après ajustement du pH à 6.8, une solution à 0.5% de pourpre de bromocrésol et 12g d'Agar-Agar sont ajoutés au milieu (Dave et Shah, 1996).

**- Annexe 2**

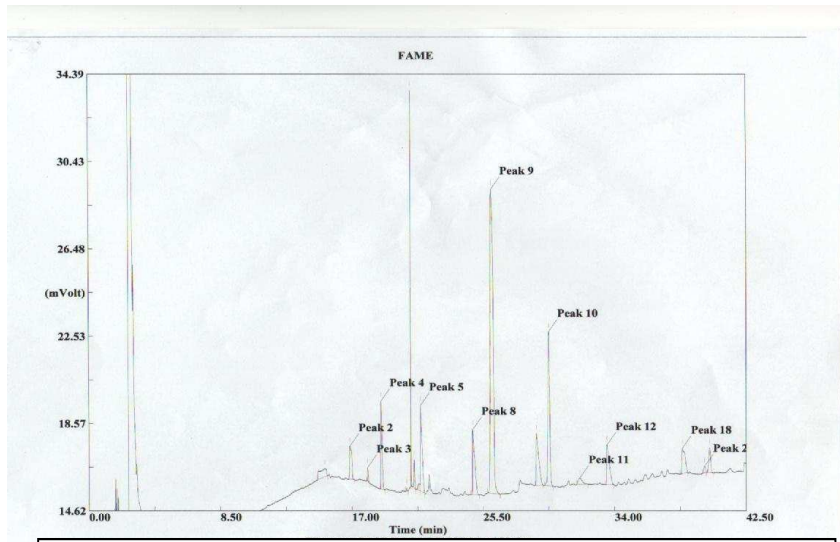
- **Les changements apportés par la présence de polysorbate 80 sur les profils lipidiques des cellules starters du yaourt en réponse à la présence de la bile à 0.3% (p/v), tels que démontrés par CPG.**



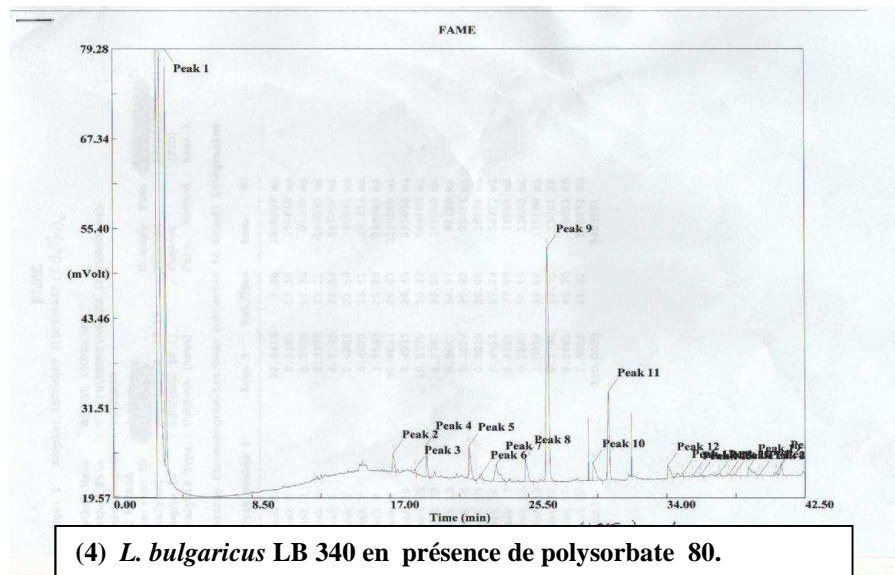
**(1) *S. thermophilus* TA 040 en présence de polysorbate 80.**



(2) *S. thermophilus* TA 040 en présence de polysorbate 80.



(3) *L. bulgaricus* LB 340 en absence de polysorbate 80.

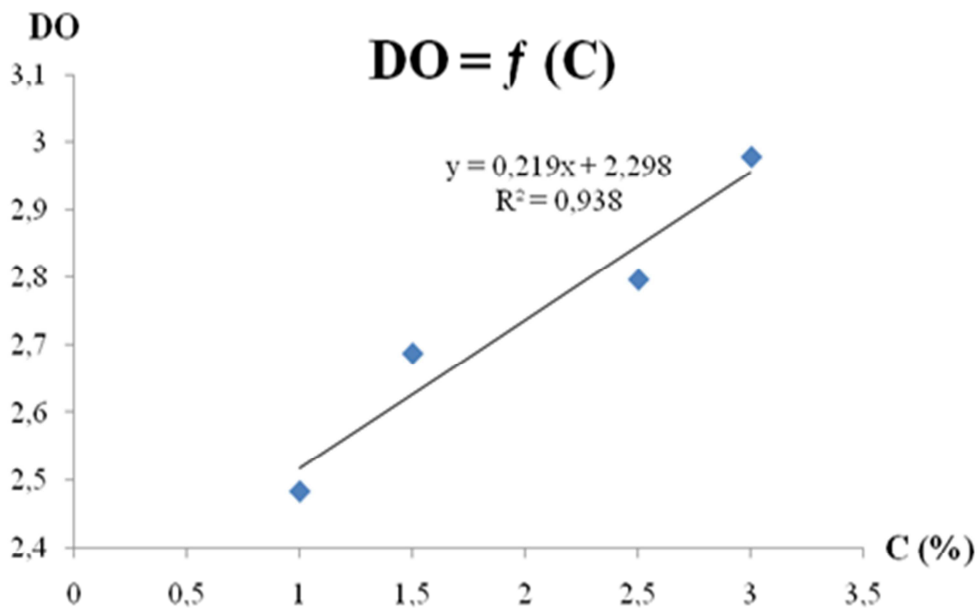


(4) *L. bulgaricus* LB 340 en présence de polysorbate 80.

- Annexe 3

• Courbe d'étalonnage à la glycine

- Préparer les solutions filles de glycine dont les concentrations sont 0, 1, 1.5, 2.5 et 3% sous un volume de 2 mL maximum.
- Ajouter 2 mL de tampon acétate de sodium à pH= 5.5 et le même volume de réactif à la ninhydrine.
- Mélanger et boucher soigneusement les tubes avec du coton cardé et du papier aluminium.
- Placer les tubes 15 min dans un bain-Marie bouillant modérément.
- Après refroidissement sous un courant d'eau, ajouter 3ml d'éthanol à 50%.
- Attendre 10 min (maximum 90 min), puis lire les densités optiques à 570 nm au spectrophotomètre (Optizen Mecasys 7, Corée du sud).

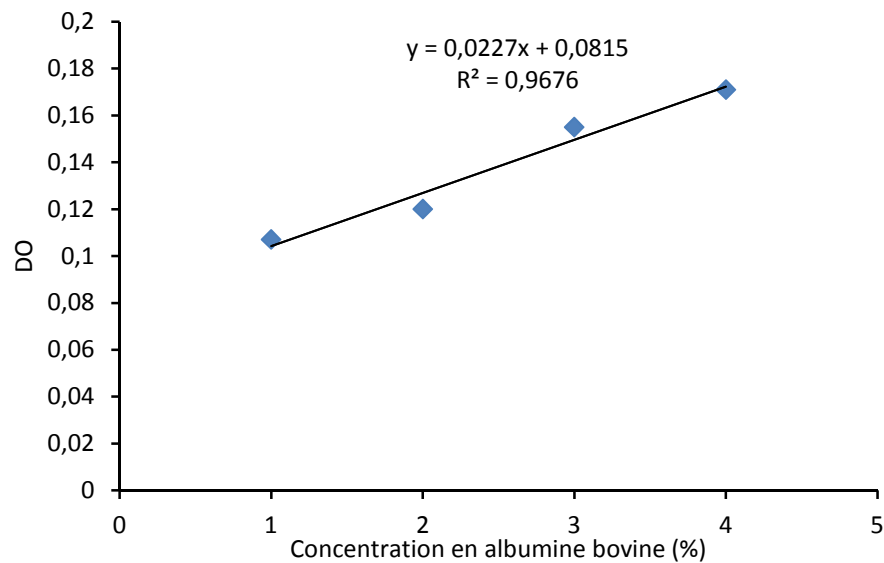


La courbe d'étalonnage Glycine.

D'où: DO: la densité optique des échantillons lue à une longueur d'onde 570 nm.

C: la concentration de la glycine exprimée en %.

- **La courbe d'étalonnage au sérum albumine bovine**



D'où: DO: la densité optique des échantillons obtenue à une longueur d'onde 595 nm.

C: la concentration du sérum albumine bovine exprimée en %.

#### - Annexe 4

- **Résultats relatifs aux quantités d'acides aminés libérés dans le milieu de culture en présence de 11 mg. mL<sup>-1</sup> de source protéique et de 65-85 µg de cholestérol par mL de MRS.**

Avec cholestérol	Souches	% 24H	% 48H
Caséine	LBRE-LSAS	57	57
	Bb12	71	43
	TA 040	57	57
	LB340	57	00
Hydrolysats De Protéines Laitiers	LBRE-LSAS	92	88
	Bb12	91	83
	TA 040	94	91
	LB340	92	87
Lysine	LBRE-LSAS	89	92
	Bb12	93	91
	TA 040	92	88
	LB340	80	91

Original article

## Calcium alginate-resistant starch mixed gel improved the survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS in yogurt and simulated gastrointestinal conditions

Hasnia Ziar,<sup>1,2\*</sup> Philippe Gérard<sup>2</sup> & Ali Riazi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire des Micro-organismes bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé LMBAFS, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, 27000, Algeria

<sup>2</sup> INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France

(Received 8 October 2011; Accepted in revised form 6 February 2012)

**Summary** The aim of this study was to investigate the protective effect of microencapsulation in calcium alginate-resistant starch mixed gel of a new human isolated strain of *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS compared with the probiotic strain of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12. Influence of microencapsulation was tested under deleterious digestive environment, when challenged to salivary  $\alpha$ -amylase, to simulated gastric fluid and to simulated intestinal fluid. Bacterial survival, post-acidifying activity and exopolysaccharides (EPS) content in stored mix yogurt were assessed. Integrity of the beads was acceptable under  $\alpha$ -amylase levels largely higher than those found in human saliva. Under simulated gastrointestinal model, viable cell counts of encapsulated cells were significantly higher than those observed with free cells and remained at the recommended levels. Additionally, microencapsulation allowed an improved viability of bacteria and generated higher EPS amounts in mix yogurt stored at 4 °C. Our results indicate that calcium alginate-resistant starch beads extend survival under digestive conditions and in yogurt and could be used as an efficient delivery system for probiotics.

**Keywords** *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12, calcium alginate-resistant starch beads, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS, simulated digestive environment, viability, yogurt.

### Introduction

Probiotic foods are supplements, which contain sufficient amounts of viable and active micro-organisms (single or associated culture) that have beneficial effects on the consumer, such as improving lactose tolerance, control of gastrointestinal infections, reduction in serum cholesterol, increasing the digestibility of foods, immune stimulation and suppression of cancer (Sanders & Klaenhammer, 2001). Members of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are mainly used, but not exclusively, as probiotic micro-organisms. However, reproducing all these benefits depends on high survival rates of potential probiotic bacteria during manufacture, storage and gastrointestinal passage. Therefore, International Dairy Federation (IDF) has suggested that a minimum of  $10^7$  probiotic bacterial cells should be alive at the time of consumption per gram of the product

(Kailasapathy & Chin, 2000). The main challenges to probiotics whilst passing through the digestive tract are acidic pH of the stomach and bile salts released in duodenum (Lo *et al.*, 2004).

The physical protection *via* microencapsulation is a new approach to increase the survival of probiotic bacteria in food products and the gastrointestinal tract (GIT) (Fávaro-Trindade & Grosso, 2002). In addition, encapsulation may enhance microbial survival during fermentation (Champagne *et al.*, 1994). Encapsulation involves the envelopment of tissues or biologically active substances in a semi-permeable membrane to protect the enclosed biological structures from potential hazardous processes in the direct environment. Alginate, a non-toxic polymer extracted from seaweed, is an ideal encapsulation agent because it is entirely biocompatible, inexpensive and widely used in many dairy preparations. The ease of solubilising alginate gel (by  $\text{Ca}^{2+}$  sequestration) and its release of entrapped cells within the human intestine are additional benefits (Nazzaro *et al.*, 2009). Furthermore, incorporating both prebiotics (i.e.

\*Correspondent: Fax: +21345214445;  
e-mail: hasnia\_hasni@yahoo.fr

resistant starch) and calcium alginate in coating materials may improve protection of active bacteria in food systems and in the upper gastrointestinal tract (Chen *et al.*, 2005). By adopting microencapsulation methods to enhance the survival and stability of beneficial bacteria including their protection in biopolymeric structures, an increased delivery of viable cells in human intestine can be achieved. Nevertheless, although microencapsulation is increasingly used, only a few parameters were taken into account in previous studies describing the beneficial effect of this technique. As an example, *in vitro* methods studying the survival of encapsulated cells in starch-based beads often neglected the starch digestion by  $\alpha$ -amylase in the mouth. Finally, the encapsulation procedure using starch reinforced alginate capsule, and the protective properties of the resulted beads against adverse gastrointestinal conditions and in products' shelf life are still not clearly defined.

In this study, our objectives were to extensively characterise the effect of microencapsulation on probiotic survival and activities. Resistant starch was mixed with sodium alginate (Ca-alginate-RS mixed gel) to encapsulate separately a new human isolated strain of *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS and the well-known probiotic strain *Bifidobacterium lactis* Bb12. The ability of these starch-containing beads to withstand high concentrations of salivary  $\alpha$ -amylase and gastrointestinal conditions in simulated food matrix to imitate the food intake was investigated. Their survival rates, post-acidifying activities and exopolysaccharides (EPS) production capacities in stored yogurt were also assessed.

## Materials and methods

### Bacterial strains and materials

*Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (*Lactobacillus Rhamnosus* Expérimentale-Laboratoire de Sécurité Alimentaire et Santé) was obtained from our laboratory's collection (faecal strains isolated from healthy Algerian neonates). It was genetically identified by 16S RNA sequencing method and studied herein as an experimental strain. This strain was a good milk fermenter and produced a very low quantity of exopolysaccharides. LBRE-LSAS was also evaluated for a number of probiotic characteristics *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, this strain displayed adherence to hexadecane support, bile salt resistance, salt tolerance, low pH survival, cholesterol assimilation and antimicrobial activity. It also adhered to mouse intestinal mucosa and reduced the incidence of *Shigella dysenteriae* symptoms (data not shown).

The well-known probiotic strain of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Chr. Hansen, ATCC 27536)

was obtained in frozen form from Chris Hansen (Hørsholm, Denmark).

Sodium alginate E401 (GRINDSTED R. Alginate FD, Material no 120059912) and resistant starch (Hi-maize™ 260, RS<sub>2</sub>) were provided free of cost by Danisco (Algiers, Algeria).

### Encapsulation procedure

Individual bacterial cell suspensions were prepared by centrifuging 80 mL of a 24 h culture at 5000 g. Following centrifugation, the cells were washed twice with saline solution (20 mL). The washed bacterial cells were mixed individually with 10 mL of 18 g L<sup>-1</sup> of sodium alginate and 20 g L<sup>-1</sup> resistant starch (RS). Concentrations of sodium alginate and RS were selected after preliminary studies. The RS was incorporated in the alginate to improve beads rigidity. One millilitre of the microbial suspension was introduced into 5 mL sterile syringe fitted on a 27.5 G needle (Terumo, Leuven, Belgium). The suspension was dropped aseptically into 100 mL of vegetable oil (canola and sunflower oil) containing 1 mL polysorbate 80 (E 433; A and Z Food Additives Co. Ltd, China). After 20 min of agitation at 200–400 rpm, 100–200 mL of 0.1 M calcium chloride was added quickly along the side of the beaker, when the phase separation of oil/water emulsion occurred. Beads of Bb12 or LBRE-LSAS were separated by decantation and rinsed with a solution containing 0.1 M calcium chloride and 5% glycerol.

The distance between the syringe and the CaCl<sub>2</sub> solution was kept to 20 cm, to yield capsules of 0.2–0.3 mm in diameter. The beads were then aliquoted into separate vials and used within 2 days.

### Effect of salivary $\alpha$ -amylase on the integrity of beads containing microencapsulated cells

Bead integrity was evaluated according to the method of Haider & Husain (2008) by calculating the percentages of released cells upon  $\alpha$ -amylase exposure. Briefly, Beads containing *B. lactis* Bb12 or *L. rhamnosus* LBRE-LSAS were incubated with increasing concentrations of salivary  $\alpha$ -amylase (Alpha-amylase from human saliva; Sigma, Schnellendorf, Germany) (0, 50, 75, 150 and 250 U) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.6 for 4 h at 37 °C. The activity of the enzyme without salivary amylase was considered as control (100%) for the calculation of the remaining activity.

### Viability of free and microencapsulated cells in simulated gastrointestinal model

The beads were first exposed to the stomach compartment (simulated gastric fluid: SGF) consisting of a food suspension adjusted to pH 2 at 37 °C for 2 h under

100 rpm and on anaerobiosis (Anaerocult; Merck, Darmstadt, Germany) as described by Martoni *et al.* (2007).

The food suspension consisted of starch (3 g L<sup>-1</sup>), pectin (2 g L<sup>-1</sup>), mucin (4 g L<sup>-1</sup>), glucose (0.4 g L<sup>-1</sup>), yeast extract (3 g L<sup>-1</sup>), peptone (1 g L<sup>-1</sup>) and cysteine (0.5 g L<sup>-1</sup>). The control isotonic medium regarding SGF was prepared by culturing beads containing bacteria (Bb12 or LBRE-LSAS) in NaCl solution (0.86%, w/v, pH 6.5) during 2 h at 37 °C as described by Xiao *et al.* (2003).

After 2 h exposure, beads from the food suspension in the SGF were washed with phosphate buffer (PBS) by centrifugation at 3200 g for 10 min and the pellet was transferred to the small intestine compartment (simulated intestinal fluid: SIF) consisting of the same food suspension supplemented with 0.5% oxgall, and 2.5 g L<sup>-1</sup> sodium bicarbonate and readjusted to pH 6.5. This preparation was incubated in the simulated small intestine conditions for 16 h at 37 °C on anaerobiosis. The non-incubated food suspension was considered as a second control medium with respect to SIF.

Control cultures with free cells were subjected to treatment similar to encapsulated cells. Viability of free or encapsulated cells of Bb12 and LBRE-LSAS was assessed at the end of the exposure periods to SGF and SIF.

#### Preparation of yogurt containing encapsulated cells

The micro-organisms were first activated by three successive transfers for the preparation of mother cultures for yogurt making. Four batches of yogurt were prepared by aerobic fermentation at 42 °C in tyndallized (steamed repeatedly for 30 min on three successive days) reconstituted skimmed milk (RSM 18%, p/v). Each batch contained mixed culture of free or encapsulated cells of Bb 12 or LBRE-LSAS and yogurt starters, each inoculated at the concentration of 1%. The yogurt starters (Danisco, France) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB 340, which did not produce EPS and *Streptococcus thermophilus* TA040, a fair EPS-producing strain (Foligne *et al.*, 2007), will hereafter be termed Lb and St, respectively, in the text. All cultures were added at the beginning of fermentation at final counts of  $\sim 1 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> in milk. Afterwards, the fermentation was stopped as soon as pH of yogurt reached the value of 4.7, followed by cooling to 4 °C and storing for 4 weeks.

#### Viability and post-acidification assessment

Viable encapsulated cell counts were monitored by sampling dilutions from pellets (SGF or SIF) on MRS-Cysteine agar after being released from Ca-algi-

nate-RS beads by sequestering calcium ions with sodium PBS.

Samples of different yogurts (containing free or encapsulated cells) were assessed for viability during refrigerated storage. One gram of each sample was diluted with 99 mL of sterile PBS buffer (0.2 M, pH 7, 20 min vigorous disruption at 4 °C) before making serial dilutions in 0.1% (w/v) sterile peptone buffered water (Difco laboratories, Detroit, MI, USA). Control cultures (with free cells) were subjected to similar treatment.

An aliquot of 100 µL of each sample was taken to enumerate the viable cell counts. Viability tests were performed in triplicate, and cell counts were calculated from the colonies on appropriate medium plates after suitable incubation. *B. lactis* and *L. rhamnosus* were enumerated in Lactobacilli MRS agar (Difco Laboratories) containing 0.1% (p/v) lithium chloride and 0.3% sodium propionate (p/v) (GasPak anaerobic system 37 °C for 72 h). Lactobacilli MRS agar, pH 5.2 (anaerobic environment 42 °C for 72 h) and *Streptococcus thermophilus* agar (ST agar, aerobic environment 37 °C for 72 h), respectively, were used to enumerate *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (Tharmaraj & Shah, 2003).

Viable cells were expressed as colony forming units per gram (Log CFU g<sup>-1</sup>).

Post-acidifying activities were measured on samples taken from the different preparations of yogurt during storage at 4 °C using a digital pH-meter (microprocessor pH-meter, model pH 537; WTW, Weilheim, Germany).

#### EPS production in stored yogurt

Proteins in 50 mL of diluted yogurt sample (1:1 yogurt: Milli-Q water) were precipitated by adding 4 mL of 20% (w/v) TCA (Sigma Chemical Co.). Precipitated proteins were separated by centrifugation at 3313 g for 30 min at 4 °C. The pH of supernatant was adjusted to 6.8 with 40% (w/v) NaOH followed by boiling at 100 °C for 30 min to denature whey proteins. Denatured whey proteins were separated by centrifugation at 3313 g for 30 min at 4 °C. Equal volume of cold absolute ethanol was mixed with the supernatant to precipitate the carbohydrate from the supernatant. The precipitation was carried out overnight at 4 °C, and the precipitate was separated by centrifugation at 3313 g for 30 min at 4 °C. The resultant carbohydrate pellet was completely dissolved by adding 10 mL of Milli-Q water, and the resultant suspension was subjected to sonication for 1 h at room temperature. Then, the solution was dialysed at 4 °C in a dialysis membrane tube with a molecular weight cut-off of 13 000 Da against tap water over a 2-week period. Water was changed twice a day. The EPS concentration was quantified using the

phenol-sulphuric method of Dubois *et al.* (1956) and was expressed as glucose equivalent.

All food composition materials were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Chimie) and chemicals from Difco (Difco Laboratories), unless otherwise specified.

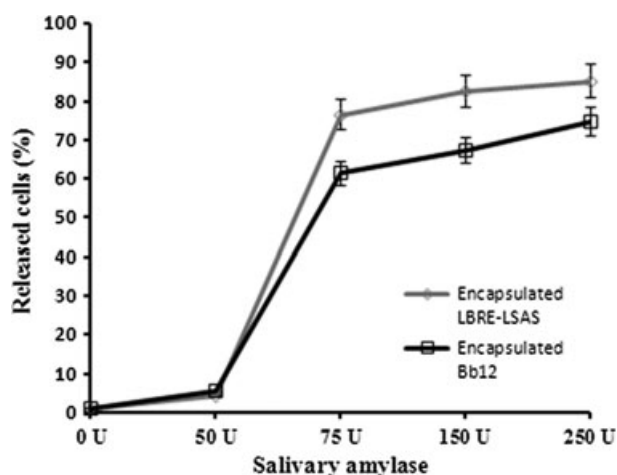
### Statistical analysis

Data analysis was performed using STATISTICA data analysis software system, version 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA, 2008). One way ANOVA analysis was used to evaluate the significant differences between sample means, with significance level set at  $P < 0.05$ . Mean comparisons were assessed by Tukey's test. All data presented are mean values of triplicates obtained from three separate runs ( $n = 9$ ).

## Results

### Effect of salivary $\alpha$ -amylase on Ca-alginate-RS beads

The effect of salivary  $\alpha$ -amylase on integrity of Ca-alginate-RS beads is shown in Fig. 1. In absence of amylase, there was a slight cell release ( $< \text{Log } 5 \text{ C-FU mL}^{-1}$ ) for both assayed strains (data not shown). The percentages of liberated cells from Ca-alginate-RS beads were not statistically ( $P > 0.05$ ) significant when treated with 0–50 U of  $\alpha$ -amylase for 4 h at 37 °C. When treated with 75 U of  $\alpha$ -amylase, 38.7 and 23.5% of enclosed Bb12 and LBRE-LSAS were released,



**Figure 1** Effect of salivary amylase on Ca-alginate-RS beads. Beads were inoculated with increasing concentrations of salivary amylase (50–250 U) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.6 for 4 h at 37°C. Control for the calculation of released cells per cent after  $\alpha$ -amylase exposure was count without salivary amylase treatment.

respectively. Following exposure to higher concentration of  $\alpha$ -amylase (250 U), the beads became weak and approximately 74.6 of encapsulated Bb12 and 84.1% of LBRE-SAS were released ( $P < 0.05$ ).

### Survival of free and encapsulated Bb12 and LBRE-LSAS in SGF and SIF

The viability of free and encapsulated bacteria under simulated gastrointestinal conditions is represented in Fig. 2.

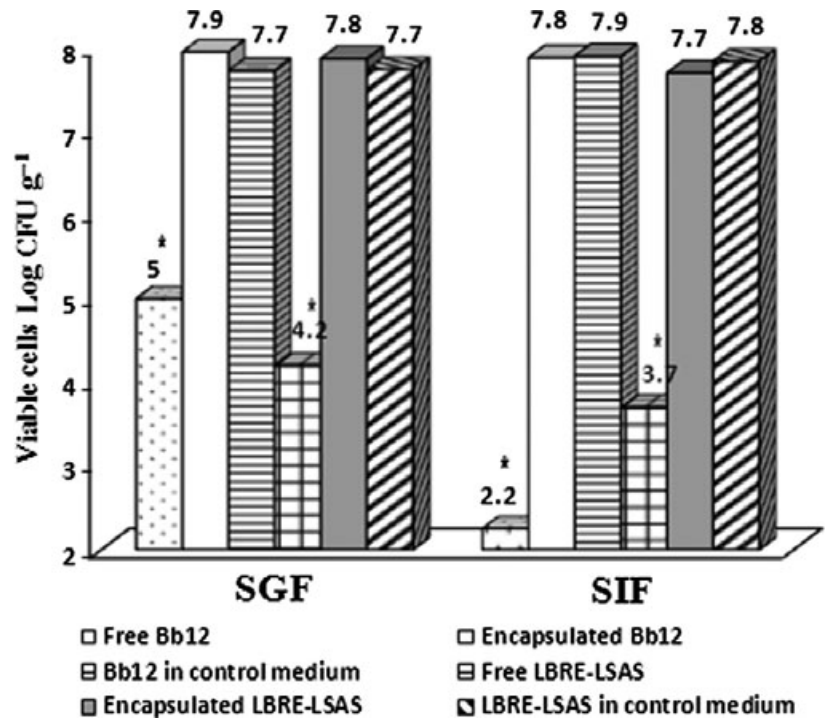
Food suspension containing encapsulated cells showed no significant ( $P > 0.05$ ) decline in population from initial inoculated counts for both strains after exposure to SGF as compared to the isotonic control medium. High viable loads of 7.9 and 7.8 of  $\sim 8 \text{ Log C-FU g}^{-1}$  of Bb12 and LBRE-LSAS (Fig. 2) were registered, respectively. Conversely, the non-encapsulated bacterial levels strongly ( $P < 0.05$ ) decreased during exposure to SGF, displaying a reduced viability of 3–3.8 logs.

After 2 h in SGF, cell pellets of Bb12 and LBRE-LSAS were transferred separately to SIF. The load of bacteria was not influenced ( $P > 0.05$ ) by oxgall present at the level of 0.5% after 16 h of incubation in SIF. After 16 h of that residence, cells were released automatically and 7.8 and 7.7 viable Log CFU  $\text{g}^{-1}$  of Bb12 and LBRE-LSAS (Fig. 2) were detected, respectively, demonstrating a viability very similar to the one obtained in control medium.

In comparison, viability of free cells was markedly ( $P < 0.05$ ) impaired after SIF residence resulting in 2.2 and 3.7 viable Log CFU  $\text{g}^{-1}$  of Bb12 and LBRE-LSAS, respectively.

### Viability of free and encapsulated *B. lactis* Bb12 and *L. rhamnosus* LBRE-LSAS in stored yogurt

Viability of bacteria in yogurt is reported in Table 1. The free or encapsulated *B. lactis* Bb12 and *L. rhamnosus* LBRE-LSAS counts were converted to decimal logarithm scale before the data were analysed statistically. No differences in bacterial counts were observed between encapsulated and free cells at the beginning of the storage period. Conversely, the numbers of viable bacteria were significantly different ( $P < 0.05$ ) between the encapsulated and free cells from first week onwards. In control yogurts containing free cells, viable counts decreased significantly by 1.6 (LBRE-LSAS) and 1.88 (Bb12) log cycles from week one to week 4 of the refrigerated storage period. On the other hand, losses in bacterial viability were  $< 1$  log cycle (from week one to week 4) with the use of encapsulated cells. Interestingly, viable counts of encapsulated cells of both organisms remained higher than 8.5 Log CFU  $\text{g}^{-1}$  at the end of 4 weeks storage, whereas 7.2



**Figure 2** Viable free or encapsulated cells of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS at the end of the exposure period to simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF). Controls are NaCl solution (0.86%, pH 6.5) at 37°C/2 h (SGF) and non-incubated food suspension SIF. Inoculated counts were 8 ± 0.5 Log CFU g<sup>-1</sup>. \*Denotes statistically significant (P < 0.05).

**Table 1** Number of viable cells (Log CFU g<sup>-1</sup>) of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS under free and encapsulated states at 4 °C in yogurt<sup>†</sup>

Storage period (weeks)	Bb 12		LBRE-LSAS	
	Free	Encapsulated	Free	Encapsulated
0	10.2 ± 0.1dA	10.2 ± 0.1dA	10.4 ± 0.3dA	10.4 ± 0.3dA
1	6.9 ± 0.1cA	9.7 ± 0.3dD	8.8 ± 0.2cB	9.3 ± 0.9cC
2	5.6 ± 0.3bA	9.1 ± 0.5bC	8.7 ± 0.2cB	9.2 ± 1.2bcC
3	5.3 ± 0.3bA	9.3 ± 0.8cD	8.4 ± 0.1bB	9.1 ± 0.9bC
4	5.1 ± 0.1aA	8.9 ± 0.6bC	7.2 ± 0.2aB	8.6 ± 0.7aC

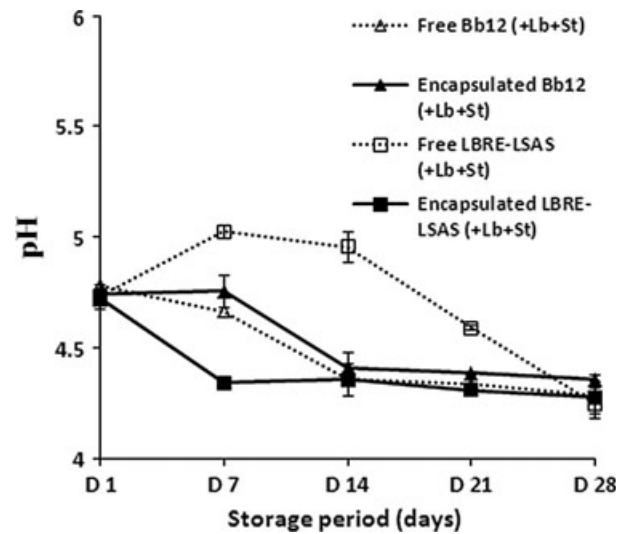
Survival represents the mean ± SD (n = 9). For comparative purposes, all counts were adjusted to 'the day 0' values of free treatments of Bb12 or LBRE-LSAS.

<sup>†</sup>Yogurt was made by associated culture between one strain of Bb12 or LBRE-LSAS and yogurt starters.

<sup>abcd</sup>Means in the same column with different small letter superscripts are significantly different (P < 0.05).

<sup>ABCD</sup> Means in the same row for a particular strain with different capital letter superscripts are significantly different (P < 0.05).

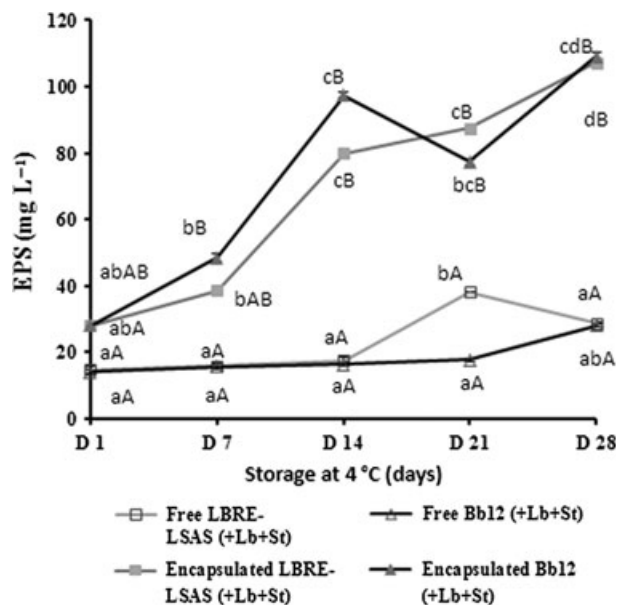
and 5.1 Log CFU g<sup>-1</sup> were detected for free LBRE-LSAS and free probiotic strain of Bb12, respectively (Table 1). Consequently, the gain in viable biomass as a result of microencapsulation in Ca-alginate-RS gel was notably higher for the probiotic strain of Bb12, compared with LBRE-LSAS.



**Figure 3** Effect of microencapsulation on post-acidifying activity of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS in stored yogurt, expressed as pH.

**Changes in pH**

Figure 3 shows the changes in pH of the different preparations of yogurt during storage at 4 °C for 28 days. Microencapsulation of Bb12 has no effect



**Figure 4** Exopolysaccharides amounts ( $\text{mg L}^{-1}$ ) produced in stored yogurt containing free and encapsulated *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 or *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS and in the presence of yogurt starters. (abcd) Means with different small letter super-scripts are significantly different within each type of yogurt; ABCD Means with different capital letter super-scripts are significantly different between each type of yogurt for a particular day of storage.

( $P > 0.05$ ) on pH values measured from day 1 to 28 (D1 to D28) (Fig. 3). Conversely, in yogurt with LBRE-LSAS, a significant ( $P < 0.05$ ) decrease in pH is only obtained from D7 with encapsulated cells (Fig. 3). pH values were then significantly ( $P < 0.05$ ) lower in yogurt with encapsulated LBRE-LSAS compared with yogurt with free LBRE-LSAS from D7 to D14. After 28 days, final pH values were almost similar ( $P > 0.05$ ) in all batches, ranging from 4.2 to 4.3.

### EPS production

Results relating to the EPS production of microencapsulated cells during yogurt storage are shown in Fig. 4. After 1 day at 4 °C, the quantities of EPS were slightly higher in yogurt made with encapsulated cells (Fig. 4). EPS production increased significantly during storage of yogurts containing encapsulated cells. Indeed, amounts of EPS were nearly quadrupled ( $P < 0.05$ ) in yogurts containing encapsulated Bb12 or LBRE-LSAS during the storage, reaching 109 and 107  $\text{mg L}^{-1}$ , respectively. On the contrary, no (Bb12) or a weak (LBRE-LSAS) increase in EPS amounts was observed in yogurt containing free cells during the 4 weeks of storage.

### Discussion

Probiotic bacteria must survive transit through the digestive tract and reach the colon in large quantities (Mainville *et al.*, 2005). An attempt has been made herein to examine the effectiveness of Ca-alginate-RS beads in adverse conditions when used to protect beneficial bacteria taken *via* an oral route.

In our study, resistant starch was incorporated at the concentration of 2% (w/v). This concentration is higher than that used in previous studies on encapsulating probiotic bacteria in starch-based matrix (Sultana *et al.*, 2000; Iyer & Kailasapathy, 2005; Zou *et al.*, 2011) and may ensure a better protection against salivary  $\alpha$ -amylase. Therefore, our results indicate that our Ca-alginate-RS beads were stable enough under higher salivary  $\alpha$ -amylase concentrations and longer residence time than that occurring in adult human's buccal cavity. This suggests that the modified starch employed herein was advantageously incorporated in the alginate matrix, allowing more rigidity to beads, and confirms the study by Haider & Husain (2008), where the concanavalin A layered calcium alginate-starch beads immobilised  $\beta$ -galactosidase were significantly stable after 4 h (37 °C, pH 4.6) exposure to 200 U of salivary amylase.

Viability of probiotic cultures in the GIT is affected mainly by gastric acid present in the stomach and bile in the duodenum (Lo *et al.*, 2004). The effect of encapsulation on the survival of bacteria under adverse conditions has been reported with contrasting results. Indeed, the advantage of encapsulating lactic acid bacteria over that of free cells under *in vitro* gastric conditions has been reported (Chandramouli *et al.*, 2004; Iyer & Kailasapathy, 2005; Muthukumarasamy *et al.*, 2006) whereas other studies showed that encapsulation does not effectively protect these bacteria from strong acidic conditions (Gbassi *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2011). Similarly, Sultana *et al.* (2000) reported that survival of probiotics in alginate-starch microspheres did not improve after exposure to acidic and bile salt solutions.

The addition of starch to alginate matrix was recently found inefficient to improve the survival of encapsulated cells (Zou *et al.*, 2011), whereas the microencapsulation of probiotics using alginate with starch by extrusion provided greater protection against gastric juice than using pure alginate beads (Iyer & Kailasapathy, 2005). Here, we assessed the survival of a new human isolated lactobacilli LBRE-LSAS compared with the probiotic strain of *Bifidobacterium* Bb12 under simulated conditions of GIT and highlighted the role of the protecting capacity of Ca-alginate-RS matrix in improving survival of cells in presence of food matrix. Interestingly, our microencapsulation method was able to protect both probiotic strains with the same efficiency despite probable different acid and bile salt tolerances of these two strains. This suggests that our Ca-alginate-RS

matrix could be used to encapsulate and protect a large panel of probiotic strains. Therefore, we believe that our microencapsulation procedure consisting of mixing the sodium alginate gel with resistant starch confers stability to beads and leads to a better protection against harmful environmental conditions. This could be explained by the fact that resistant starch and sodium alginate tend to be synergistic in gelling and as a result may help in providing additional protection to the entrapped bacterial cells. In addition, we postulate that the diffusion of bile salts into the beads may be limited by the sodium alginate gel matrix reinforced herein by incorporation of resistant starch.

In addition, resistant starches added to foods are classified as functional fibre under the American Association of Cereal Chemists (AACC) and the National Academy of Sciences (NAS) definition (Sajilata *et al.*, 2006). Resistant starch is largely undegraded in the small intestine and constitutes a major part of the carbohydrate available in the human colon for bacterial fermentation leading to the production of short chain fatty acids and gases (Brown, 1996). In this study, we used Type II resistant starch, representing starch with a granular structure characterised by B-type crystallinity. These granules, with water in the centre of the array, display strong resistance to enzymatic digestion (Brown, 1994) implying they can enter the colon and be used as substrates for fermentation by the colonic microbial community. Thus, besides increasing the protection of probiotic bacteria from adverse conditions, starch included in the microcapsule may also confers health benefits through fermentation products. In this work, the beads of Ca-alginate-RS containing entrapped cells fulfilled the established criterion of a minimum of  $6 \text{ Log CFU g}^{-1}$  viable beneficial cells, frequently cited to gain the therapeutic benefit in the intestine (Gardiner *et al.*, 2000). Indeed, the slow release of encapsulated cells from Ca-alginate-RS beads should protect the probiotic bacteria during the passage in the small intestine whose duration is about 3–4 h in humans (Chan & Zhang, 2005). Moreover, as the transit time in the colon can range from 0.8 to more than 20 h (Vandamme *et al.*, 2002), our Ca-alginate-RS beads should assure an efficient delivery in this distal part of the digestive tract.

The enhancement in bacterial survival in yogurt is an attractive aspect for any commercial exploitation because bacteria will remain intact in the food until consumption. The effects of microencapsulation on bacterial survival in yogurt largely depend on the method of encapsulation. Indeed, alginate microspheres blended with pectin did not improve survival of encapsulated cells after 1 month of storage at 4 °C, whereas the alginate microspheres blended with starch or coated with chitosan maintained the initial level of survival (Zou *et al.*, 2011). In this study, microencapsulation in

Ca-alginate-RS was found to improve the viability and to maintain a suitable post-acidifying activity of beneficial organisms in yogurt after 1 month of storage at 4 °C reinforcing the valuable role of adding starch to microcapsule for an efficient protection of probiotics. Moreover, this is the first study to our knowledge where alginate-resistant starch-encapsulated probiotic strain (Bb12) and/or intestinal human isolated strain (*L. rhamnosus*) were incorporated in yogurt mix in the presence of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*, the traditional starters of yogurt. From a biotechnological point of view, the appropriate production process depends on fermentability and acid tolerance of the added probiotic micro-organisms. Only a few can be used as sole starter cultures. In most of the cases, fermentation occurs exclusively or predominantly through an associated culture between probiotic and conventional starter cultures (*Streptococcus thermophilus* and others). Here, the survival of oxygen-sensitive bacteria (e.g. bifidobacteria) in the product is favoured by oxygen-consuming conventional starter cultures (*S. thermophilus*), and by the lowering of the redox potential (de Vrese & Schrezenmeir, 2008). Furthermore, in our study, microencapsulation resulted in dramatic increase in EPS amounts in yogurt. Literature reporting EPS production by mixed culture containing encapsulated probiotic cells in presence of starter of yogurt is, to our knowledge, very scarce. EPS are produced by a great variety of bacteria, including lactic acid bacteria (LAB). The greatest potential of bacterial EPS is related to their use in high value market niches, such as cosmetics, pharmaceuticals and biomedicine. Therefore, EPS-producing strains are of commercial value for both their technological and presumed probiotic properties (Zhang *et al.*, 2011). By incorporating resistant starch to encapsulate bacteria, it may be possible not only to increase survival but also to improve thickening and gelling properties of yogurt. Our hypothesis that the encapsulation of Bb12 or LBRE-LSAS may enhance EPS production by streptococci culture, which is recognised as an EPS producer strain, was proven during mix yogurt storage. The population of St in the mix was stimulated in presence of encapsulated cells and maintained higher survival rates during refrigerated storage compared with plain yogurt (data not shown). Finally, the increase in EPS amounts in yogurt may also have beneficial effects on human physiology. Apart from their prebiotic potentialities, EPS have been identified as blood cholesterolemia reducer, immunomodulator, antitumoral and antiulcer agents (Badel *et al.*, 2011). EPS may also allow the bacteria to better withstand stomach acid and bile salts thanks to their protective coating effect. Indeed, a likely relationship between EPS production and resistance to bile salts or tolerance to low pH of strains has been recently underlined (Alp & Aslim, 2010).

## Conclusion

In this study, we have demonstrated that the Ca-alginate-resistant starch beads displayed strong resistance when treated with high salivary amylase. In addition, both encapsulated assayed strains showed increased survival to simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid compared with free cells. Such data may allow us to gain further knowledge on the controlled-release application of the tested bacteria when administered *via* the oral route. Indeed, the beads developed would provide a suitable form to adapt for sensitive beneficial bacteria that cannot survive the highly challenging conditions of the digestive tract. Furthermore, we hypothesise that food components appear to have a protective effect as an isotonic medium regarding bacterial cell viability. The microencapsulation in Ca-alginate-RS was also effective in maintaining higher viable probiotic bacteria during refrigerated storage. Moreover, appreciable amounts of EPS produced in yogurt made with milk containing encapsulated cells could constitute an interesting benefit for industries. We believe that this study leads to a better understanding of the real behaviour of microencapsulated bacteria in the gut and in a favourable food carrier such as yogurt and emphasises the beneficial effects of microencapsulation of probiotic strains.

Finally, the *in vitro* bacterial survival observations need to be confirmed by testing encapsulated acid sensitive beneficial strains *in vivo*.

## Acknowledgment

This work was supported by the University of Abdelhamid Ibn Badis- Mostaganem & the Algerian ministry of Scientific Research (CNEPRU grant N°: F 022 20070100).

## References

- Alp, G. & Aslim, B. (2010). Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, **16**, 101–105.
- Badel, S., Bernardi, T. & Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, **29**, 54–66.
- Brown, I.L. (1994). High amylose starches-New developments in human nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia*, **18**, 33–39.
- Brown, I.L. (1996). Complex carbohydrates and resistant starch. *Nutrition Review*, **54**, 115–119.
- Champagne, C.P., Lacroix, C. & Sodini-Gallot, I. (1994). Immobilized cell technologies for the dairy industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, **14**, 109–134.
- Chan, N.T. & Zhang, Z. (2005). Bioencapsulation by compression coating of probiotic bacteria for their protection in acidic medium. *Process Biochemistry*, **40**, 3346–3351.
- 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**, 27–35.
- Chen, K.N., Chen, M.J., Liu, J.R., Lin, C.W. & Chiu, H.Y. (2005). Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science*, **70**, 260–266.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350–356.
- Fávoro-Trindade, C.S. & Grosso, C.R.F. (2002). Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, **19**, 485–494.
- Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C. *et al.* (2007). Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology*, **13**, 236–243.
- Gardiner, G.E., O'Sullivan, E., Kelly, J. *et al.* (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**, 205–212.
- Gbassi, G.K., Vandamme, T., Ennahar, S. & Marchioni, E. (2009). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*, **129**, 103–105.
- Haider, T. & Husain, Q. (2008). Concanavalin A layered calcium alginate–starch beads immobilized  $\beta$  galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients. *International Journal of Pharmaceutics*, **359**, 1–6.
- Iyer, C. & Kailasapathy, K. (2005). Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under *in vitro* acidic and bile salt conditions and in yogurt. *Journal of Food Science*, **70**, M18–M23.
- Kailasapathy, K. & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, **78**, 80–88.
- Lo, P.R., Yu, R.C., Chou, C.C. & Huang, E.C. (2004). Determinations of the antimutagenic activities of several probiotic bifidobacteria under acidic and bile conditions against benzo[a]pyrene by a modified Ames test. *International Journal of Food Microbiology*, **93**, 249–257.
- Mainville, I., Arcand, Y. & Farnworth, E. (2005). A dynamic model that simulates the upper gastro-intestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, **99**, 287–296.
- Martoni, C., Bhatena, J., Jones, M.L., Urbanska, A.M., Chen, H. & Prakash, S. (2007). Investigation of microencapsulated BSH active *Lactobacillus* in the simulated human GI tract. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **7**, 136–184.
- Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P. & Holley, R.A. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in Different Types of Microcapsules. *Journal of Food Science*, **71**, M20–M24.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Sada, A. & Orlando, P. (2009). Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Food*, **1**, 319–323.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S. & Kulkarni, P.R. (2006). Resistant starch – A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **5**, 1–17.
- Sanders, M.E. & Klaenhammer, T.R. (2001). The Scientific Basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a Probiotic. *Journal of Dairy Science*, **84**, 319–331.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, **62**, 47–55.
- Tharmaraj, N. & Shah, N.P. (2003). Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lacto-*

- bacillus rhamnosus* and Propionibacteria. *Journal of Dairy Science*, **86**, 2288–2296.
- Vandamme, F.T., Lenourry, A., Charrueau, C. & Chaumeil, J. (2002). The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate Polymers*, **48**, 219–231.
- de Vrese, M. & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **111**, 1–66.
- Xiao, J.Z., Kondo, S., Takahashi, N. *et al.* (2003). Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *Journal of Dairy Science*, **86**, 2452–2461.
- Zhang, Y., Li, S., Zhang, C., Luo, Y., Zhang, H. & Yang, Z. (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum* F6 in skim milk. *African Journal of Biotechnology*, **10**, 2080–2091.
- Zou, Q., Zhao, J., Liu, X. *et al.* (2011). Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *International Journal of Food Science and Technology*, **46**, 1672–1678.

**RESUME**  
**PUBLIE**

<sup>3</sup>LIP6 Département DÉsir Équipe Décision, université Pierre-et-Marie Curie-Paris-6, campus Jussieu,

<sup>4</sup>Service de Biochimie et Hormonologie, hôpital Tenon,

<sup>5</sup>Département de Lipide, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, <sup>6</sup>Unité d'Écologie et de Physiologie du Système digestif, Inra, Jouy-en-Josas, France

**Introduction et but de l'étude.** – Bien que l'étude d'intervention (perte de poids-stabilisation) améliore en moyenne comme attendu les paramètres de composition corporelle, métabolique et inflammatoire, il existe une grande variabilité dans les profils de réponses. Nous avons voulu étudier les prédicteurs potentiels des changements de poids après une intervention diététique.

**Matériel et Méthodes.** – Cinquante sujets obèses ou en surpoids ont été soumis à un régime hypocalorique pendant six semaines, suivi pendant six autres semaines par un régime de stabilisation pour maintenir la perte de poids. Nous avons évalué l'évolution du poids et les marqueurs de l'adiposité, ainsi que la cinétique des changements des profils glucidique, lipidique et inflammatoires plasmatiques. Les marqueurs inflammatoires dans le tissu adipeux, et sept groupes bactériens dans les échantillons fécaux ont été également étudiés.

**Résultats.** – Une analyse de Clustering cinétique a retrouvé trois grands profils principaux de l'évolution du poids : Groupe A (n = 17) et Groupe B (n = 15) ont perdu beaucoup de poids pendant la période du régime hypocalorique, mais pendant la période de stabilisation, les sujets du Groupe A ont continué à perdre du poids, tandis que ceux du Groupe B ont maintenu leur poids. Les sujets du Groupe C (n = 17) ont moins perdu pendant la période du régime hypocalorique et ont repris rapidement du poids pendant la stabilisation. Avant l'intervention, les marqueurs d'insulinorésistance (ex. insulinémie, HOMA-IR) et d'inflammation (ex. IL-6 dans le plasma, HAM56 dans le tissu adipeux) étaient plus élevés chez les sujets du Groupe C. De plus, pour un groupe bactérien : *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* nombre s'est avéré également plus élevé dans le Groupe C. Nous avons recherché des prédicteurs de ces réponses biocliniques en utilisant en particulier une analyse de réseaux Bayésien. Selon la structure et l'inférence du réseau Bayésien, les niveaux de 4 bio-marqueurs (insulinémie, IL-6, nombre de leucocytes et HAM56) avant l'intervention étaient suffisants pour caractériser la distribution des 3 groupes de sujets. Le taux de prédiction était 75,5 % (37 parmi 49 sujets).

**Conclusion.** – Dans cette étude, les réponses individuelles à une intervention diététique (une phase de restriction calorique suivie d'une phase de stabilisation) pourraient être prédites par 4 bio-marqueurs. Les sept groupes de bactéries fécales n'étaient pas utiles pour la prédiction des répondants.

## P068

### Effets des caséines et des hydrolysats protéiques laitiers sur l'assimilation *in vitro* de cholestérol par certaines bactéries lactiques

Ziar H<sup>\*1</sup>, Riazi A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Microorganismes bénéfiques, des Aliments fonctionnels et de la Santé (LMBAFS), université de Mostaganem-Algérie, Mostaganem, Algérie

**Introduction et but de l'étude.** – La relation entre l'alimentation et la santé est actuellement considérée comme l'un des moyens de prévention de certaines maladies métaboliques. De nombreux peptides bioactifs sont imbriqués dans les protéines laitières et demeurent inactifs jusqu'à ce qu'ils soient libérés et activés pendant la digestion gastro-intestinale ou la transformation des aliments. Ils sont naturellement présents dans le lait et ses dérivés. Les protéines du lait exercent un large éventail d'activités biologiques, fonctionnelles et nutritionnelles. Récemment, Alhaj *et al.* (2010) ont montré qu'*in vitro*, la souche probiotique *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb-12) est potentiellement capable de réduire (> 87 %) le contenu en cholestérol du milieu de culture en présence d'hydrolysats de caséines bovines. Dans la présente étude, quatre souches lactiques *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB 340 et *Streptococcus thermophilus* TA 040 ont été cultivées en anaérobiose sur milieu MRS-0,3 % (P/V) glucose et en présence de 1,1 % (P/V) de différentes sources azotées (caséines, hydrolysats de protéines laitières ou lysine prise comme témoin).

**Matériel et Méthodes.** – Les souches ont été explorées sur le plan de leur pouvoir fermentaire (biomasse et pH), la présence d'une activité Bile Salt Hydrolase (BSH), leur tolérance à 0,3 % (P/V) de bile et de leur pouvoir d'assimilation du cholestérol (%.g<sup>-1</sup> poids bactérien sec). L'activité antimicrobienne des fermentas de 24 heures obtenus en présence de caséines a également été explorée.

**Résultats.** – Le pouvoir de croissance des souches étudiées est plus stimulé par la caséine et l'hydrolysats de protéines laitières que par la lysine. Ces souches tolèrent mieux la bile utilisée à 0,3 % (P/V) dans le milieu additionné d'hydrolysats de protéines laitières ; ce qui pourrait être lié à leur forte activité BSH observée. La plus forte assimilation *in vitro* de cholestérol du milieu (exprimée en %g<sup>-1</sup> poids sec bactérien) a été observée en présence de caséine (variable de 58 à 99 % selon la souche cultivée pendant 24 h) et d'hydrolysats de protéines laitières (de 37 à 53 % après 48 h de culture des différentes souches). Les surnageants des fermentas de 24 heures des quatre souches testées en présence de caséine ont manifesté une activité antimicrobienne vis-à-vis d'*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 49444 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

**Conclusion.** – Les protéines laitières semblent pouvoir constituer un palliatif au problème des hypercholestérolémies par leur effet stimulateur de l'assimilation du cholestérol alimentaire par des bactéries lactiques si cela viendrait à être confirmé par des études *in vivo*.

Mots clefs. – Bactéries lactiques, Cholestérol, Protéines laitières, Activité BSH.

1. Alhaj, O. A., Kanekanian, A. D., Peters, A. C et Tatham, A.S. (2010). *Food chemistry*, 123:430-435.

## P069

### Dépistage d'une carence en vitamine D chez des sujets obèses de l'ouest de la France grâce à un score d'exposition solaire

Picot D<sup>1</sup>, Alamine Y<sup>\*1</sup>, Guillo P<sup>1</sup>, Layec S<sup>1</sup>, Lefeuvre C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinique Saint Yves, Rennes, France

**Introduction et but de l'étude.** – Les besoins en vitamine D sont couverts moins par l'alimentation que la photosynthèse cutanée sous l'action des rayons solaires UVB. L'obésité est un risque

## CURRICULUM VITAE

### I- Etat Civil

**Nom :** ZIAR

**Prénom :** Hasnia

**Grade :** Maître assistante A

**Nationalité :** Algérienne.

**Adresse professionnelle :** Laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS), Université Abdelhamid Ibn Badis, BP. 300, rue Hocine Hamadou, Mostaganem 27000 – Algérie.

**Fax:** (+213) 45 21 44 45.

**Courriel :** hasnia\_hasni@yahoo.fr.

### II- Diplômes, Titres et Formation

- **Etudes secondaires :** lycée Ouel Kablia Saliha ; Mostaganem
- **BAC :** 1996, filière sciences de la vie
- **Etudes universitaires :**
  - 1) Diplôme d'ingénieur d'état en biologie ; option génie biologique (2002) ; thème du mémoire «*Comportement d'un stock de dattes ; variété Deglet-Nour, traité par thermisation et conservé en atmosphère modifiée (OPP) et au froid- Etude de la fraction phénolique*», avis du jury : mention très bien (17/20) avec félicitation du jury ; résultats publiés, Université de Mostaganem.
  - 2) Diplôme en magister; option hygiène et sécurité agroalimentaire; thème du mémoire : *Effet prébiotique du miel sur les aptitudes fermentaires de quelques souches de bifidobactéries sur milieu lait*; avis du jury : mention très bien (16/20) avec félicitation du jury ; résultats publiés; Université de Mostaganem (2006-2007).
- 28 Sep. 2010 : Intégration dans le corps des Maîtres Assistants « A ».
- Membre dans le projet de recherche national CNEPRU « N° projet: F 02220070100 » ; 2008-2012 : clôturé.
- Membre propre dans le laboratoire de recherches LMBAFS « micro-organismes bénéfiques, aliments fonctionnels et de santé » (agrée en Juin 2010).
- Membre dans le nouveau projet de recherche national CNEPRU « N° projet: F02220110021 » ; « le caroubier : utilisation technologique et effets bénéfiques sur la santé ».
- Membre dans le projet de recherche national PNR « Utilisation de souches bénéfiques locales et de substances bioactives naturelles dans l'élaboration et la préservation d'aliments fonctionnels».
- Responsable de la spécialité Master académique Nutrition et santé.

- Reviewer chez Food Hydrocolloids (Elsevier, IF=2.61).
- Membre dans la société algérienne de nutrition (SAN).

### III- Publications nationales et internationales

- **H. Ziar**, P. Gérard and A. Riazi (2013). Effect of prebiotic carbohydrates on growth, Bile survival and Cholesterol-lowering activities of dairy-related bacteria. Soumis à *Functionnal Foods Journal*.
- **H. Ziar**, I. Yahla et A. Riazi (2013). Pouvoir d'assimilation de cholestérol chez des souches lactiques encapsulées dans un gel à base de galactomannanes de caroube. Soumis à *Nature et Technologie*.
- **H. Ziar** and A. Riazi (2013). Effect of the polysorbate 80 "E 433" on the survival of yogurt starters with Cholesterol-lowering activities under digestive conditions. En cours de préparation.
- **H. Ziar**, P. Gérard and A. Riazi (2012). Calcium alginate-starch improved the survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 1421–1429.
- A. Riazi and **H. Ziar** (2012). Effect of honey and starter culture on growth, acidification, sensory properties and bifidobacteria cell counts in fermented skimmed milk. *African Journal of Microbiology Research*, 6 (3), pp. 486-498,
- **H. Ziar** et A. Riazi (2011). Effets des caséines et des hydrolysats protéiques laitiers sur l'assimilation *in vitro* de cholestérol par certaines bactéries lactiques. *Cahiers de nutrition et de diététique*. Vol. 46-Suppl. 1, p. S85 (Abstract).
- A. Riazi et **H. Ziar** (2010). Croissance et viabilité des Bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille. *Revue « Nature et Technologie »*. n° 02/Janvier 2010. Pages 17 à 24.
- A. Riazi and **H. Ziar** (2008). Growth and viability of yogurt starter organisms in honey-sweetened skimmed milk. *African Journal Of Biotechnology*. 7 (12), pp. 2055-2063.

### IV- Communications nationales et internationales

- **H. Ziar** et A. Riazi. Effets des protéines de caroube sur l'assimilation *in vitro* de cholestérol par certaines souches lactiques. Communication affichée aux Journées Francophones de Nutrition « JFN » du 12 au 14 Décembre 2012, Lyon.
- **H. Ziar** et A. Riazi. Effet du germe de caroube sur la survie de souches lactiques à l'hostilité digestive. Communication affichée au 1<sup>er</sup> Congrès International de la SAN 05 et 06 Décembre 2012, Oran.
- **H. Ziar** et A. Riazi. Effet du lactulose sur le pouvoir de croissance et de production d'isomères conjugués d'acide linoléique chez certaines bactéries lactiques. Communication orale aux 18èmes Journées Nationales de microbiologie organisées par la Société Algérienne de Microbiologie (SAM) - les 26 et 27 Novembre 2012, Tizi Ouzou.

- H. **Ziar** et A. Riazi. Les prébiotiques améliorent le pouvoir d'assimilation de cholestérol chez les bactéries lactiques. Communication orale aux 3<sup>èmes</sup> Journées de la faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie, 11 et 12 Avril 2012 – Université de Mostaganem.
- H. **Ziar** et A. Riazi. Effets des caséines et des hydrolysats protéiques laitiers sur l'assimilation *in vitro* de cholestérol par certaines bactéries lactiques. Communication affichée aux Journées Francophones de Nutrition « JFN » du 7 au 9 Décembre 2011, Reims.
- H. **Ziar** et P. Gérard et A. Riazi. Aptitudes fermentaires et survie de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* et *Lactobacillus rhamnosus* encapsulées dans un gel mixte d'alginate-Calcium-Amidon résistant. Communication affichée aux 17<sup>èmes</sup> Journées Nationales de microbiologie organisées par la Société Algérienne de Microbiologie (SAM) - les 21 et 22 Novembre 2011, Sétif.
- H. **Ziar** et A. Riazi. Amélioration de la résistance des starters du yaourt à la bile par le polysorbate 80 « E433 ». Communication orale aux 2<sup>èmes</sup> Journées de la faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie, 25 et 26 Mai 2011 – Université de Mostaganem.
- H. **Ziar** et A. Riazi. Effets de différents prébiotiques sur la tolérance à la bile de quelques souches lactiques. Communication affichée au Colloque international de Nutrition les 22 et 23 Mai 2011, Oran.
- H. **Ziar** et A. Riazi. Effet des synbiotique sur l'assimilation *in vitro* du cholestérol. Communication affichée aux 16<sup>èmes</sup> Journées Nationales de microbiologie organisées par la Société Algérienne de Microbiologie (SAM) les 28 et 29 Octobre 2010 - Université Hassiba Ben Bouali, Chlef.
- H. **Ziar** et A. Riazi. Capacité de réduction du taux de cholestérol chez quelques souches lactiques bénéfiques en présence de prébiotiques. Communication affichée au 17<sup>ème</sup> colloque international du club des bactéries lactiques CBL, Nancy (27-29 Oct, 2010).
- H. **Ziar** et A. Riazi. Microencapsulation de *Lactobacillus rhamnosus* et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 et leur survie aux conditions gastro-intestinales simulées. Communication orale aux 1<sup>ères</sup> Journées de la faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie, 12 et 13 avril 2010 – Université de Mostaganem.
- H. **Ziar** et A. Riazi. Effets du Tween 80 sur la Résistance des Starters du Yaourt à l'Acidité, aux Sécrétions Biliaires et Conséquences sur le Pouvoir d'Assimilation de Cholestérol. Communication affichée au 15<sup>èmes</sup> Journées Nationales de Microbiologie à Béjaia (15 et 16 Novembre, 2009) : Société Algérienne de Microbiologie, Université A. Mira de Béjaia.
- H. **Ziar** et A. Riazi. Effet du miel sur le développement et la survie de souches de bifidobactéries au cours de la fermentation du lait écrémé par les starters du yaourt. Communication orale au colloque international « filière lait : production, technologie et santé » à l'université UHB de Chlef (2 et 3 Déc, 2008).
- H. **Ziar** et A. Riazi. Croissance et viabilité des bactéries lactiques dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille. Communication orale au séminaire national « filière lait : production, technologie et santé » à l'université UHB de Chlef (11 et 12 Déc, 2007).

- A. Riazi et H. **Ziar**. Croissance et viabilité des souches de bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille. Communication orale au séminaire national « filière lait : production, technologie et santé » à l'université UHB de Chlef (11 et 12 Déc, 2007).
- A. Riazi and H. **Ziar**. Growth and viability of lactic acid bacteria in honey-sweetened skim milk. Communication affichée au 15<sup>ème</sup> colloque international du club des bactéries lactiques CBL, Rennes (13-15 Nov, 2007).

## V- Tâches pédagogiques

### V.1. Enseignements

- Chargée des travaux pratiques du module bioprocédés pour les étudiants de la 5<sup>ème</sup> année biotechnologie; département de biotechnologie; Université de Mostaganem (2006-2007).
- Chargée du module « techniques de contrôle microbiologiques » pour les étudiants de la 4<sup>ème</sup> A. Génie Biol. (2007-2008 ; 2008-2009), Univ. Chlef.
- Chargée de cours du module « conditionnement et emballage des aliments » pour les étudiants de la 5<sup>ème</sup> A. Sci. Alim. (2007-2008), Univ. Chlef.
- Chargée des TP du module « microbiologie alimentaire » pour les étudiants de la 3<sup>ème</sup> A. LMD. Sci. Alim. (2007-2008), Univ. Chlef.
- Chargée du module « bioconversion et bioprocédés » pour les étudiants de la 5<sup>ème</sup> A. Biotech. (2008-2009), Univ. Chlef.
- Chargée du module « biochimie microbienne » pour les étudiants de la 3<sup>ème</sup> A. LMD. Génie Biol. (2008-2009), Univ. Chlef.
- Chargée des TP des modules : biochimie et microbiologie alimentaires (2009-2010) et d'analyses instrumentales (2009-2010, 2010-2011, 2012-2013) dispensés aux étudiants de la 4<sup>ème</sup> A. TAA, Univ. Mostaganem.
- Chargée de cours et TP du module « microbiologie générale» dispensé aux étudiants de la 2<sup>ème</sup> A. Agronomie Tronc Commun (2009-2010, 2010-2011, 2011-2012). Univ. Mostaganem.
- Chargée de cours du module « hygiène, sécurité alimentaire et pollution» dispensé aux étudiants de la 5<sup>ème</sup> A. TAA- Agronomie (2010-2011, 2011-2012). Univ. Mostaganem.
- Chargée de cours et TP du module « microbiologie appliquée à l'hygiène alimentaire» dispensé aux étudiants en 1<sup>ère</sup> année magister, option : hygiène et sécurité alimentaire (2010-2011). Univ. Mostaganem.
- Chargée de cours de la matière « biochimie cellulaire» dispensée aux étudiants en 3<sup>ème</sup> année LMD, option : biotechnologie et santé (2011-2012; 2012-2013). Univ. Mostaganem.
- Chargée des TP de la matière « analyses biochimiques» dispensée aux étudiants en 3<sup>ème</sup> année LMD, option : biotechnologie et santé (2011-2012; 2012-2013). Univ. Mostaganem.
- Chargée de cours de la matière « médiateurs de la signalisation cellulaire» dispensée aux étudiants en Master 1, option : nutrition et santé (2011-2012; 2012-2013). Univ. Mostaganem.

- Chargée de cours de la matière « technologie de sucre » dispensé aux étudiants de la 4<sup>ème</sup> A. TAA et Master 1 biotechnologies alimentaires, (2011-2012 ; 2012-2013) Univ. Mostaganem.
- Chargée de cours de la matière « initiation à la recherche » dispensé aux étudiants de Master 2 nutrition et santé, (2012-2013) Univ. Mostaganem.

## V.2. Direction et évaluation de travaux de recherches pédagogiques entrant dans le cadre de la thèse

- **Promotrice** : K. Chouieur (2008). *Capacité d'hydrolyse des sels biliaires et d'assimilation du cholestérol par les starters de yaourt*. Ingéniorat en Sciences Alimentaires. Univ. Chlef.
- **Promotrice** : A. Chérif Taiba & A. Belhireche (2009). *Sélection in vitro de la meilleure combinaison synbiotique à caractère abaissant du taux de cholestérol*. Ingéniorat en Sciences Alimentaires. Univ. Chlef.
- **Promotrice** : B. Adjim & A. Aissaoui (2009). *Capacité de croissance et de survie de L. rhamnosus et Bifidobacterium lactis Bb12 encapsulées dans le lait et aux conditions gastro-intestinales simulées*. Ingéniorat en Sciences Alimentaires. Univ. Chlef.
- **Promotrice** : R. Hocine & M. Kaisserli (2011). *Capacité de conversion de l'acide linoléique chez certaines bactéries bénéfiques en présence de lactulose*. Ingéniorat en Biologie. Univ. Mostaganem.
- **Promotrice** : A. Mokhefi & I. Yahla (2011). *Effet hypocholestérolémiant des hydrolysats de caséine produits par certaines souches lactiques bénéfiques*. Ingéniorat en Biologie. Univ. Mostaganem.
- **Promotrice** : A. Mokhefi (2012). *Amélioration du pouvoir d'assimilation de cholestérol chez certaines souches lactiques bénéfiques par les protéines de germe de caroubes*. Master en génie-biologique. Univ. Chlef.
- **Promotrice** : I. Yahla (2012). *Exploration du pouvoir d'assimilation de cholestérol chez certaines souches lactiques bénéfiques microencapsulées*. Master en nutrition humaine. Univ. Chlef.
- **Promotrice** : F. Bebey Ejenguele et F. Koffi Niamien Kouame (2012). *Survie de L. rhamnosus LBRE-LSAS et de B. animalis subsp. lactis Bb12 encapsulées dans un gel mixte d'alginate calcium et de galactomannanes de caroubes aux conditions digestives simulées*. Ingéniorat en Biotechnologie. Univ. Mostaganem.
- **Co-Promotrice** : F. Bouabane (2012). *Amélioration de la survie des bactéries bénéfiques sous conditions digestives simulées par des ingrédients bioactifs extraits du caroubier*. Ingéniorat en Biotechnologie. Univ. Mostaganem.

## IV- Divers

- Maîtrise des langues, Arabe : très bien, Français ; très bien et Anglais : bien.
- Maîtrise de l'outil informatique : MS Word, MS Excel et Internet.

## RESUME

Cette étude a pour objectif principal la promotion de la survie de quatre bactéries lactiques d'intérêt laitier aux hostilités digestives simulées *in vitro* et aux conditions qui règnent dans l'aliment vecteur (le yaourt mixte) entreposé à 4°C pendant quatre semaines. Il s'agit des starters du yaourt (*Streptococcus thermophilus* TA040 et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340), de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 qui ont, d'abord, fait l'objet d'une série de tests d'amélioration de leur survie aux hostilités digestives simulées *in vitro* pour qu'elles puissent assurer efficacement leur rôle physiologique bénéfique attendu chez l'hôte et, ensuite, été explorées pour leur pouvoir à assimiler du cholestérol et à bioconvertir l'acide linoléique en ses isomères conjugués (CLA ou conjugated linoleic acid). En présence de bile ou d'acide cholique, le polysorbate 80 (additif alimentaire autorisé) améliore sensiblement la survie des starters du yaourt (souches LB340 et TA040) qui incorporent l'acide oléique exogène dans leur membrane où le profil en certains acides gras (les acides octadécanoïques C18 et leurs dérivés méthyliques: C19 cyc, ainsi que les acides gras en C20 ou C21) révélé par l'analyse chromatographique en phase gazeuse varie en réponse à la présence de bile dans le milieu. Le polysorbate 80 induit une augmentation du rapport acides gras insaturés/acides gras saturés chez ces deux souches starters. Leur survie est également préservée en milieu gastrique simulé (pH 2.5). Leur activité enzymatique BSH (Bile Salt Hydrolase) se trouve accentuée. La microencapsulation des deux bactéries bénéfiques (*L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. lactis* Bb12) dans le gel d'alginate de calcium-amidon résistant s'est révélée comme un outil efficace pour la préservation de leur survie *in vitro* aux hostilités digestives (alpha amylase salivaire, acidité gastrique et sécrétions biliaires). La microencapsulation exerce le même effet promoteur de la survie de ces deux bactéries dans le yaourt mixte (en présence des souches starters) entreposé quatre semaines à 4°C. Le pouvoir bactérien assimilateur *in vitro* (MRS) de cholestérol s'est révélé souche-dépendant et se déroule au cours des premières 24 h de culture. Il est stimulé par les divers prébiotiques (mannitol, raffinose, pectine et lactulose) et ingrédients laitiers ( $\beta$ -caséine et hydrolysats protéiques laitiers) testés. L'acide linoléique ajouté à 0.5 ou 1 mg.mL<sup>-1</sup> dans les monocultures MRS et lait est bioconverti par les quatre souches étudiées en ses isomères conjugués, les CLA, avec la prédominance de l'isomère 9-*cis*,11-*trans* ou acide ruménique. Les souches *S. thermophilus* et *B. lactis* sont les plus actives dans cette production de CLA.

**Mots clefs:** Bactéries lactiques– Survie- Prébiotiques- Protéines lactières-Polysorbate80- Microencapsulation- Cholestérol - Acide linoléique – CLA.

## ABSTRACT

The main goal of this study is to improve the survival of four dairy-related bacteria: *Streptococcus thermophilus* TA040, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12, when present in four weeks stored yogurt or exposed to *in vitro* simulated deleterious digestive conditions in order to ensure that they can express their expected beneficial effects in the host. Cholesterol assimilation and linoleic acid bioconversion activities of these strains were then explored. Polysorbate 80, an authorized food emulsifier, significantly improved the survival of bile or cholic acid stressed yogurt starters (strains TA040 and LB340), and increased the ratio of the unsaturated and saturated fatty acids in their cell membranes. Such effect is probably related to the bacterial uptake of exogenous oleic acid supplied by polysorbate 80, since the revealed gas chromatographic profiles of some fatty acids (octadecanoic acid C18 and its methylic form C19 cyc, and C20-21 fatty acids) varied with the presence of bile. Moreover, increased Bile Salt Hydrolase activity and survival to pH 2.5 by the presence of polysorbate 80 in the starter cultures, were monitored. The protective effect of microencapsulation in calcium-alginate-resistant starch mixed gel of *L. rhamnosus* LBRE-LSAS and *B. lactis* Bb12, in the simulated gastro-intestinal conditions (salivary alpha amylase, gastric acidity and bile secretions), as well as in four weeks stored mix yogurt (with free starter strains), was herein clearly demonstrated. The main *in vitro* (MRS) bacterial cholesterol assimilation occurred during the first 24 h of culture and seems to be strain-dependent. It could be markedly improved by the different assayed prebiotics (mannitol, raffinose, pectin and lactulose) or milk proteins ( $\beta$ -casein, dairy protein hydrolysates). All the four assayed strains (monocultures) were able to transform the added linoleic acid (0.5 and 1 mg.mL<sup>-1</sup> in MRS or milk) into its conjugated isomers (CLA) with the predominance of *cis*-9, *trans*-11 namely rumenic acid. *S. thermophilus* and *B. lactis* strains were the most efficient in this CLA production.

**Keywords:** Lactic acid bacteria– Survival- Prebiotics - Milk Proteins- Polysorbate 80-Microencapsulation- Cholesterol – Linoleic acid - CLA.