



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Par Justine GUERIN

Influence de l'ajout d'ingrédients fonctionnels laitiers sur l'encapsulation de *L. rhamnosus* GG

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)

Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio)

Soutenue le 20 octobre 2017

Devant le jury d'examen composé de :

Pr. Thierry Vandamme	Université de Strasbourg	Rapporteur
Dr. Christelle Turchiuli (HDR)	AgroParisTech	Rapporteur
Pr. Véronique Delcenserie	Université de Liège, Belgique	Examinatrice
Dr. Audrey Beaussart	Université de Lorraine	Examinatrice
Pr. Claire Gaiani	Université de Lorraine	Directrice de thèse
Pr. Joël Scher	Université de Lorraine	Co-directeur de thèse
Dr. Grégory Francius (HDR)	Université de Lorraine	Invité

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) de l'Université de Lorraine.

J'exprime toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse, Claire GAIANI, pour sa présence, son soutien, sa réactivité et sa bonne humeur quotidienne. Merci pour le travail que tu as effectué pour moi en Australie et merci pour ta patience lors de la relecture de mes articles. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi pendant ces trois années de thèse.

Un grand merci également à Joël SCHER, mon co-directeur de thèse, pour avoir accepté de co-diriger ce travail et pour toute la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie Madame Christelle TURCHIULI d'AgroParisTech et Monsieur Thierry Vandamme de l'Université de Strasbourg pour avoir accepté de juger ces travaux en qualité de rapporteurs.

Je remercie également Madame Véronique DELCENSERIE de l'Université d'Anvers et Madame Audrey Beaussart de l'Université de Lorraine pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci à Madame Sarah Leeber de l'Université d'Anvers pour sa collaboration au cours de ce travail.

Merci à Grégory FRANCIUS pour le temps que tu as passé à m'expliquer l'AFM et pour ton aide lors des analyses. Je garderai en tête tes petites anecdotes dépaysantes sur la Guadeloupe. Merci également à Jalal BACHAROUHE pour ta disponibilité et ton aide précieuse lors de mes analyses AFM. Merci aussi à Sofiane EL CHIRAT CHATEL pour nos échanges sur l'AFM et pour le partage de tes connaissances sur les pili de LGG.

Remerciements

Je tiens à remercier Yves LEROUX, Claire SOLIGOT et Marion HUGUET pour m'avoir appris leur secret sur la culture cellulaire et pour leur implication dans le projet, notamment quand il fallait venir changer le milieu des cellules le week-end.

Un grand merci à tous les membres du LIBio pour leur sympathie, leur conseil et les bons moments passés pendant ces trois années. Merci notamment à Carole JEANDEL pour la purification de la MFGM, à Carole PERROUD pour les journées atomisation et Myriam et Sylvie pour votre aide en microbiologie. Merci à Cécile, Florentin et Jordane pour votre bonne humeur.

Je remercie Michel pour avoir partagé avec moi ses connaissances sur les plans de mélanges.

Merci beaucoup à Jérémy pour son aide précieuse lors de nos journées atomisation. Cette tour de séchage nous en aura fait voir de toutes les couleurs... Nous sommes maintenant devenus des experts en débouchage de buse. Merci aussi pour tes conseils et le temps que tu as passé dans la relecture de mon manuscrit de thèse.

Je tiens également à remercier Fred, pour ses conseils en microbiologie et ses précieuses idées. Merci pour ta bonne humeur, tes encouragements et ta participation à la relecture de mes travaux. Ce fut un plaisir de travailler avec toi.

Je remercie les deux stagiaires avec qui j'ai eu le plaisir de travailler pendant cette thèse, Dana HELFRIED et Nuray ABDULOVA. Merci d'avoir aussi contribué à ces travaux.

J'ai une pensée sympathique pour mes collègues thésard passés et présents : Marie, Loïc, Faustine, Mahmoud, Mouna, Hassan, Ghazi, Adrien, Christelle, PH... Un merci tout particulier à Marie-Céleste et Yoana, pour leur gentillesse, nos discussions et les bons moments passés au bureau. Une pensée pour Charlotte, je suis heureuse d'avoir fait un petit bout de chemin avec toi au début de ma thèse et ravie de te revoir à chaque sortie entre filles.

Remerciements

Un merci tout particulier à Aya, Jennifer et Magda pour votre soutien, nos discussions de filles, nos fous rires. J'ai vraiment passé de très bons moments avec vous trois et ce fut un réel plaisir de venir au laboratoire chaque matin pour vous retrouver.

Encore une fois merci à Jenni, ma voisine de bureau et ma conseillère en schéma, je ne te remercierai jamais assez pour toute l'aide que tu m'as donnée, pour tous tes conseils et pour le temps que tu as passé à relire mes articles et mon manuscrit... la liste serait longue alors merci pour tout.

Un grand merci à Sophie et Léna pour votre amitié, votre soutien et nos sorties nancéennes qui me changeaient les idées. Merci également à Sophie, Lucie, Anthéa, mes deux Fanny et Marine pour votre amitié qui dure depuis plus de 15 ans. Nos retrouvailles de temps en temps m'auront dépayées et fait beaucoup de bien.

Merci aussi à Christine, Gilles, Paul et PH pour votre soutien et les agréables moments que l'on partage ensemble.

Je remercie mes deux sœurs, Louise et Constance, pour avoir toujours été à mes côtés depuis toutes ces années. Votre soutien, vos encouragements et votre amour m'ont portée jusque-là.

A toi, mamie, tu me manques, mais je suis sûre que là où tu es, tu dois être très fière de moi.

Un grand merci à mes parents, qui m'ont toujours soutenue dans mes choix. Merci pour votre amour et votre bienveillance. C'est avec un immense plaisir que je vous dédie ce travail.

Merci à JC de partagé ma vie. Merci d'avoir toujours cru en moi et d'avoir toujours été là, dans les bons comme dans les mauvais moments. Je sais que ça n'a pas été facile tous les jours. Merci pour ton amour et ton soutien sans faille. C'est avec bonheur que je pense à l'avenir qu'il nous reste à construire et c'est avec plaisir que je te dédie, à toi aussi, ce travail.

SOMMAIRE

Remerciements

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des équations

Abréviations

Introduction générale

1.	Contexte de l'étude.....	1
2.	Objectif de la thèse.....	2
3.	Structure de la thèse.....	3
4.	Valorisations scientifiques.....	5
4.1.	Publications.....	5
4.2.	Communications orales.....	6
4.3.	Présentations par affiche.....	7

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

I.	Les bactéries probiotiques.....	9
1.	Définition.....	9
2.	Mode d'action des bactéries probiotiques.....	9
3.	Capacité d'adhésion des bactéries probiotiques.....	10
4.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.....	13
4.1.	Des molécules de surface bien caractérisées.....	13
4.2.	Adhésion de LGG aux cellules hôtes et immunomodulation.....	17
5.	Aliments fonctionnels contenant des probiotiques et réglementation.....	19
II.	Microencapsulation des bactéries dans des matrices laitières.....	23
1.	Définition et objectifs.....	23
2.	Les protéines laitières utilisées pour l'encapsulation.....	25
2.1.	Les caséines.....	25
2.2.	Les protéines solubles.....	28

Sommaire

2.3. Utilisation des protéines du lait pour l'encapsulation.....	29
3. Les procédés d'encapsulation.....	33
3.1. Emulsification.....	34
3.2. Extrusion.....	35
3.3. Enrobage par lit fluidisé.....	37
3.4. Séchage par atomisation.....	38
3.5. Impact du séchage par atomisation sur les bactéries et choix des paramètres.....	40
4. Adhésion des bactéries aux matériaux d'encapsulation.....	44
4.1. Mécanismes d'adhésion des bactéries.....	44
4.2. Adhésion des bactéries aux matériaux d'encapsulation.....	46
III. Les glycoprotéines de la membrane des globules gras du lait : des ingrédients prometteurs pour l'encapsulation des bactéries?.....	49
1. Introduction.....	49
2. La membrane des globules gras du lait.....	50
2.1. Structure.....	50
2.2. Les glycoprotéines de la MFGM.....	51
2.3. Extraction et purification de la MFGM.....	52
3. Effets de la MFGM sur la santé.....	55
3.1. Effets des protéines de la MFGM sur la santé.....	55
3.2. Effets d'une supplémentation en MFGM sur la santé.....	56
4. Adhésion entre les bactéries et les glycoprotéines de la MFGM.....	58
4.1. Adhésion entre les bactéries et la MFGM.....	58
4.2. MUC1 : une glycoprotéine de la MFGM impliquée dans l'adhésion avec les bactéries	60
5. Propriétés techno-fonctionnelles de la MFGM.....	61
5.1. Propriétés émulsifiantes.....	61
5.2. Utilisation de phospholipides dérivés de la MFGM pour encapsuler des composés bioactifs.....	62
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	
I. Matériels.....	65
1. Souches bactériennes.....	65
2. Protéines laitières.....	66

3.	Purification de la MFGM	66
II.	Caractérisation physicochimique de la MFGM	68
1.	Dosage des protéines	68
2.	Caractérisation des protéines par SDS-PAGE	69
3.	Dosage des lipides	70
III.	-Etude de l'adhésion	71
1.	Adhésion bactéries-protéines laitières par microscopie à force atomique	71
1.1.	Principe et fonctionnement	71
1.2.	Pointes et surface utilisées pour les mesures AFM.....	73
1.3.	Conditions d'acquisition	74
1.4.	Détermination du pourcentage d'évènements adhésifs.....	75
1.5.	Ajustement des courbes de retrait par des modèles prédictifs	76
2.	Adhésion bactéries-cellules intestinales humaines	79
2.1.	Cellules épithéliales et conditions de culture.....	79
2.2.	Conditions de culture de LGG	80
2.3.	Tests d'adhésion.....	80
2.4.	Test de toxicité MTT de la MFGM.....	81
IV.	Techniques utilisées pour l'encapsulation de LGG.....	83
1.	Encapsulation de LGG par émulsification	83
2.	Encapsulation de LGG par séchage par atomisation.....	84
2.1.	Préparation des solutions protéiques.....	84
2.2.	Préparation de la suspension bactérienne	85
2.3.	Séchage par atomisation	85
V.	Digestion des microparticules	87
1.	Préparation des solutions.....	88
2.	Digestion gastrique et intestinale	88
VI.	Caractérisation des poudres produites par atomisation	90
1.	Taux de survie des bactéries.....	90
1.1.	Dénombrement de LGG avant et après séchage	90
1.2.	Effet du cisaillement induit par la buse bi-fluide sur la viabilité et l'organisation cellulaire de LGG	90

Sommaire

2.	Caractérisation physicochimique des poudres	91
2.1.	Détermination de la teneur en eau	91
2.2.	Détermination de la taille des particules	92
2.3.	Détermination de la capacité de réhydratation des poudres.....	92
VII.	Techniques de microscopie	94
1.	Microscopie électronique à balayage	94
2.	Microscopie confocale à balayage laser	95
VIII.	Rhéologie	98
1.	Mesure de viscoélasticité	98
2.	Etude de la déformation des gels.....	100
IX.	Plan de mélange	101
X.	Statistiques	104

Chapitre 3 : Résultats et discussion

I.	Etude de l'adhésion entre LGG et les protéines laitières	105
1.	Adhésion entre LGG et les PS.....	106
1.1.	Adhésion de LGG WT	106
1.2.	Adhésion de LGG <i>spaCBA</i>	110
1.3.	Adhésion de LGG <i>welE</i>	112
1.4.	Adhésion de LGG <i>welEspaCBA</i>	118
2.	Adhésion de LGG à la MFGM.....	119
3.	Conclusion.....	126
II.	La structuration de la matière est-elle influencée par l'adhésion entre bactéries et matrice ? 128	
1.	Impact de la composition de la matrice d'encapsulation dans la protection et la libération de LGG	129
1.1.	Choix des formulations utilisées.....	129
1.2.	Caractérisation structurale des microparticules	129
1.3.	Caractérisation des microparticules au cours de la digestion gastrique et intestinale <i>in vitro</i> . 131	
1.4.	Survie des bactéries au cours de la digestion.....	135
1.5.	Conclusion	140
2.	Incorporation de la MFGM dans la matrice d'encapsulation	141

2.1.	Intérêt de l'utilisation de la MFGM	141	
2.2.	Caractérisation de la MFGM	142	
2.3.	Effet de l'addition de MFGM sur la rhéologie et la structure des gels obtenus	143	
3.	Conclusion.....	147	
III.	Stabilisation de LGG par séchage par atomisation	149	
1.	Optimisation du procédé d'encapsulation par séchage par atomisation	151	
1.1.	Choix des conditions de séchage	151	
1.2.	Choix de la matrice d'encapsulation.....	151	
1.3.	Impact des conditions de séchage sur la survie de LGG	152	
1.4.	Impact des conditions de séchage sur les propriétés physicochimiques des poudres	155	
1.5.	Effet de la chymosine sur les propriétés de reconstitution des poudres	158	
1.6.	Choix de la formulation et des conditions de séchage pour l'encapsulation de LGG	160	
2.	Caractérisation de la poudre optimale : protéines préalablement incubées avec de la chymosine et séchées par atomisation à 85 °C.....	161	
3.	Conclusion.....	165	
IV.	Interaction entre LGG et les cellules intestinales Caco-2	168	
1.	Rôle du pilus SpaCBA de LGG dans l'interaction avec les cellules Caco-2.....	170	
2.	Impact de l'ajout de MFGM sur l'adhésion de LGG aux cellules Caco-2	171	
3.	Conclusion.....	174	
Conclusions et perspectives			
1.	Conclusions	177	
1.1.	Encapsulation de LGG	180	
1.2.	Impact de l'ajout de PS dans la matrice d'encapsulation	180	
1.3.	Impact de l'ajout de MFGM dans la matrice d'encapsulation.....	181	
1.4.	Impact de l'ajout d'ingrédients fonctionnels laitiers sur l'adhésion de LGG aux cellules intestinales.....	181	
2.	Perspectives.....	182	
Références			187

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation des résultats et discussions de ce manuscrit	4
Figure 2 : Principaux mécanismes d'action des bactéries probiotiques	10
Figure 3 : Composition de la paroi cellulaire des bactéries Gram positive (adaptée de Burgain <i>et al.</i> , 2014a)	12
Figure 4 : Image de microscopie électronique à transmission de LGG marquée avec des anticorps anti-SpaA avec des particules d'or de 10 nm (issus de Reunanen <i>et al.</i> , 2012).....	14
Figure 5 : Représentation de la structure du pilus SpaCBA de LGG (adapté de Reunanen <i>et al.</i> , 2012) ..	15
Figure 6 : Exopolysaccharides présents à la surface de LGG (A). Structure des longs EPS riches en galactose (B) (adapté de Lebeer <i>et al.</i> , 2009).....	16
Figure 7 : Processus simplifié d'évaluation des allégations santé par l'EFSA.....	20
Figure 8 : Nombre de publications sur les bactéries probiotiques de 1986 à 2016 (source : Pubmed, juin 2017).....	21
Figure 9 : Architecture des microparticules produites selon le type de procédé	24
Figure 10 : Modèles de la structure des micelles de caséines proposés au cours des dernières années	27
Figure 11 : Structures des protéines majeures du lactosérum : β -lactoglobuline bovine (RCSB PDB code 1BEB) (Brownlow <i>et al.</i> , 1997) (A) ; α -lactalbumine bovine (RCSB PDB code 1ALC) (Pike <i>et al.</i> , 1996) (B) et sérum albumine bovine (RCSB PDB code 3V03) (Majorek <i>et al.</i> , 2012)	29
Figure 12 : Coagulation enzymatique des micelles de caséines	31
Figure 13 : Encapsulation de bactéries probiotiques par émulsification en utilisant la gélification des protéines de lait par l'action de la chymosine	35
Figure 14 : Encapsulation de bactéries probiotiques par extrusion dans une matrice de protéines laitières	36
Figure 15 : Encapsulation de bactéries par enrobage en lit fluidisé	38
Figure 16 : Encapsulation de bactéries par séchage par atomisation dans une matrice de protéines laitières	39
Figure 17 : Contraintes défavorables pour la survie des bactéries et principaux facteurs à contrôler pour assurer leur survie au cours du séchage par atomisation	42
Figure 18 : Différentes interactions impliquées dans l'adhésion bactérienne (adapté de Ofek <i>et al.</i> , 2003)	45
Figure 19 : Composition de la membrane des globules gras du lait	50
Figure 20 : Différentes étapes d'extraction de la MFGM à l'échelle laboratoire.....	53

Liste des figures

Figure 21 : Différentes étapes d'extraction de la MFGM à l'échelle industrielle	54
Figure 22 : Composition et localisation des bactéries dans des matrices fromagères	60
Figure 23 : Mutants de LGG utilisés dans ce travail	65
Figure 24 : Purification de la MFGM à partir de lait cru	66
Figure 25 : Principe de la microscopie à force atomique	71
Figure 26 : Différents modes d'acquisition de la microscopie à force atomique pour l'analyse de la surface de bactéries (A). Mode imagerie permettant l'acquisition d'images 3D de la surface des bactéries. A gauche, organisation des EPS ((Francius <i>et al.</i> , 2009) et à droite, organisation des pili (Tripathi <i>et al.</i> , 2012a) à la surface de LGG (B). Mode spectroscopie de force permettant d'obtenir différentes propriétés de surface des bactéries (C)	73
Figure 27 : Obtention de cartographies de force par AFM et analyse des courbes de retrait. Carte de force obtenue lors de l'analyse AFM (A). Calcul du pourcentage d'évènements d'adhésion (B). Différenciation des signatures spécifiques et non spécifiques (C)	76
Figure 28 : Illustration des données fournies par l'ajustement des courbes de retrait avec les modèles FJC et WLC	78
Figure 29 : Procédé d'encapsulation par émulsification (repris de Burgain <i>et al.</i> , 2014b)	84
Figure 30 : Encapsulation de LGG par séchage par atomisation.....	86
Figure 31 : Etapes de digestion gastro-intestinale simulée in vitro (adapté de Minekus <i>et al.</i> , 2014). SSG : solution saline gastrique ; SSI : solution saline intestinale.....	89
Figure 32 : Principe de la mesure de turbidité avec le Turbiscan.....	93
Figure 33 : Suivi des modules d'élasticité (G' , courbe en pointillé) et de viscosité (G'' , courbe pleine) et du déphasage lors de la coagulation enzymatique de protéines laitières.....	99
Figure 34 : Suivi de la force lors de la compression du gel protéique.....	100
Figure 35 : Vue d'ensemble des résidus: probabilité normale et tracé des valeurs résiduelles.....	103
Figure 36 : Image 3D (A) et image de hauteur (B) obtenues en milieu liquide dans du tampon phosphate à pH 6,8 par AFM (mode contact) pour LGG WT.....	106
Figure 37 : Evènements d'adhésion mesurés par AFM entre LGG WT et les différentes protéines laitières : caséines, β -LG, α -LA et BSA (A). Composition de surface simplifiée de LGG WT (B)	107
Figure 38 : Exemple de signature spécifique observée lors de l'adhésion entre LGG WT et la β -LG (A). Superposition de courbes de retrait montrant la reproductibilité des signatures obtenues lors de l'adhésion entre LGG WT et la β -LG (B). Les valeurs de k_p sur les pentes représentent les constantes de raideur du pilus SpaCBA, alors que les valeurs de F_p et L_p correspondent aux forces et à la longueur des plateaux	108
Figure 39 : Exemple de signatures spécifiques observées lors de l'adhésion entre LGG WT et l' α -LA (gauche) et la BSA (droite)	109

Figure 40 : Evènements d'adhésion mesurés par AFM entre LGG *spaCBA* et les différentes protéines laitières : caséines, β -LG, α -LA et BSA (A). Composition de surface simplifiée de LGG *spaCBA* (B).. 111

Figure 41 : Exemple de signatures spécifiques observées lors de l'adhésion entre LGG *spaCBA* et la β -LG (A), l' α -LA (B), la BSA (C) ou les caséines (D) 111

Figure 42 : Evènements d'adhésion mesurés par AFM entre LGG *welE* et les différentes protéines laitières : caséines, β -LG, α -LA et BSA (A). Composition de surface simplifiée de LGG *welE* (B) 113

Figure 43 : Signatures obtenues sur les courbes de retrait lors de l'adhésion entre la β -LG et LGG WT (A) ou LGG *welE* (B). Les modèles FJC et WLC ont été appliqués sur ces courbes de retrait. Un coefficient de détermination, R^2 , est calculé pour chaque partie de la courbe de retrait modélisée..... 115

Figure 44 : Exemples de signatures spécifiques observées lors de l'adhésion entre LGG *welE* et l' α -LA (A), la BSA (B) ou les caséines (C) 117

Figure 45 : Evènements d'adhésion mesurés par AFM entre LGG *welEspaCBA* et les différentes protéines laitières : caséines, β -LG, α -LA et BSA (A). Composition de surface simplifiée de LGG *welEspaCBA* (B) 118

Figure 46 : Courbes de retrait présentant des signatures spécifiques observées lors de l'interaction entre LGG *welEspaCBA* et la β -LG (A), l' α -LA (B) ou la BSA (C)..... 119

Figure 47 : Quantification des évènements d'adhésion entre la MFGM et LGG sauvage et deux de ses mutants de surface (LGG *spaCBA* et LGG *welE*)..... 120

Figure 48 : Courbes de retrait obtenues par AFM présentant des signatures spécifiques lors de l'adhésion de LGG WT avec la MFGM. Exemples de courbes de retrait caractéristiques de l'interaction entre la MFGM et LGG WT (A). Lors de l'adhésion de la MFGM et LGG WT, des signatures spécifiques de l'étirement de pili *SpaCBA* sont retrouvées (B)..... 121

Figure 49 : Courbes de retrait obtenues par AFM présentant des signatures spécifiques lors de l'adhésion de LGG *spaCBA* ou LGG *welE* avec la MFGM. Exemples de courbes de retrait caractéristiques de l'adhésion de la MFGM avec LGG *spaCBA* (A) et LGG *welE* (B)..... 121

Figure 50 : Quantification des évènements d'adhésion entre la mucine purifiée et LGG sauvage et deux de ses mutants de surface (LGG *spaCBA* et LGG *welE*) 123

Figure 51 : Courbes de retrait obtenues par AFM présentant des signatures spécifiques lors de l'adhésion de LGG WT, LGG *spaCBA* ou LGG *welE* avec la mucine purifiée. Exemples de courbes de retrait caractéristiques de l'adhésion de la MFGM avec LGG WT (A), LGG *spaCBA*(B) et LGG *welE* (C)..... 124

Figure 52 : Comparaison des profils des courbes de retrait observées entre LGG WT (A) ou LGG *welE* (B) et la MFGM ou la mucine purifiée 125

Figure 53 : Bilan de l'adhésion entre LGG et la matrice laitière..... 127

Liste des figures

Figure 54 : Localisation de LGG à l'intérieur (1) et à la surface (2) des microparticules pour les trois formulations contenant divers rapports de caséines / PS : 100/0 (A) ; 80/20 (B) et 60/40 (C). L'observation a été faite par MEB à deux grossissements 5000 × et 10 000 ×. Pour une meilleure visualisation, les bactéries ont été colorées artificiellement en bleu avec le logiciel ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Etats-Unis)	130
Figure 55 : Microparticules prélevées en début de digestion gastrique in vitro et observées par MEB à deux grossissements 5 000 × (1) et 10 000 × (2). Les trois formulations contiennent divers ratios de caséine/PS 100/0 (A); 80/20 (B) et 60/40 (C)	132
Figure 56 : Microparticules prélevées en fin de digestion gastrique in vitro et observées par MEB à deux grossissements 5 000 × (1) et 10 000 × (2). Les trois formulations contiennent divers ratios caséine/PS : 100/0 (A), 80/20 (B) et 60/40 (C).....	133
Figure 57 : Microparticules prélevées en fin de digestion intestinale in vitro et observées par MEB à deux grossissements 5 000 × (1) et 10 000 × (2). Les trois formulations contiennent divers ratios caséine/PS : 100/0 (A), 80/20 (B) et 60/40 (C).....	134
Figure 58 : Structure résiduelle des microparticules observées à la fin de la digestion intestinale in vitro par MEB au grossissement 10 000 ×. Les deux formulations contiennent des ratios de caséine/PS de 100/0 (A) et 80/20 (B).....	135
Figure 59 : Viabilité bactérienne observée par CLSM lors de la digestion gastrique et intestinale in vitro. Des images ont été réalisées en début de digestion gastrique, en fin de digestion gastrique et en fin de digestion intestinale. Les bactéries présentant une paroi cellulaire intacte (et considérées comme vivantes) apparaissent en vert et les bactéries présentant une paroi cellulaire endommagée (et considérées comme mortes) apparaissent en rouge	136
Figure 60 : Courbes de déplacement de force pour les trois formulations de ratios caséine/PS (100/0, 80/20 et 60/40) avant et après digestion gastrique (A). Représentation schématique du comportement de la matrice pendant la compression (B).....	139
Figure 61 : Synthèse sur l'influence de la composition de la matrice d'encapsulation sur la structure des microparticules et leur comportement lors de la digestion.....	141
Figure 62 : Composition protéique de la MFGM par gel SDS-PAGE 8 %.....	142
Figure 63 : Variation des différentes réponses (température de gélification, G', G'' et teneur en eau) en fonction de la composition en protéines. La proportion de caséines est fixée à 80 %.	145
Figure 64 : Bilan sur le plan de mélanges	148
Figure 65 : Adaptation d'un procédé d'encapsulation par émulsification sur un procédé d'encapsulation par séchage par atomisation.....	150
Figure 66 : Effet du cisaillement induit par la pulvérisation sur l'organisation cellulaire	153

Figure 67 : Distribution granulométrique des poudres produites	156
Figure 68 : Poudres obtenues après séchage par atomisation (grossissement $\times 3\ 000$) par MEB. LGG a été encapsulé dans une matrice laitière non incubée (1, 2 et 3) ou incubée (1', 2' et 3') avec de la chymosine. Différentes températures d'air de sortie ont été utilisées : 85 (1 et 1'), 70 (2 et 2') et 55 °C (3 et 3').....	157
Figure 69 : Propriétés de réhydratation des poudres. Mouillabilité (A), dispersibilité (B) et solubilité (C) des poudres obtenues à partir d'un concentré non incubé (barres pleines) ou préalablement incubé (barres rayées) avec de la chymosine à une température de sortie de 85 (gris), 70 (vert foncé) ou 55 °C (vert clair). La présence de lettres différentes au-dessus des barres signifie que les valeurs sont significativement différentes ($p < 0,05$).....	158
Figure 70 : Microparticules reconstituées dans de l'eau pendant 2 h et sous agitation à 8 °C (A, B et C) et à 40 °C (D, E et F) observées par MEB ; $\times 2\ 000$ (A et D), $\times 10\ 000$ (B et E), $\times 50\ 000$ (C et F)	162
Figure 71 : Action de la chymosine sur les protéines laitières avant le séchage par atomisation et lors de la reconstitution des poudres obtenues dans de l'eau à 8 ou 40 °C. CMP : caséinomacropéptide.....	163
Figure 72 : Evolution de la lumière transmise et rétrodiffusée après la reconstitution de la poudre dans de l'eau à 8 °C (A) ou 40 °C (B). Les flèches indiquent la direction de l'évolution depuis le début jusqu'à la fin de la mesure (20 min). La rétrodiffusion et la transmission sont utilisées pour suivre la sédimentation des microparticules au fond du tube et la clarification du milieu en haut du tube respectivement	165
Figure 73 : Avantages et inconvénients du procédé de séchage par atomisation	167
Figure 74 : Adhésion de LGG sauvage et ses mutants de surface aux cellules épithéliales de l'intestin Caco-2. La présence de lettres différentes au-dessus des barres de l'histogramme signifie que les différences observées sont significativement différentes ($p < 0,05$).....	170
Figure 75 : Effet de la MFGM sur la viabilité des cellules Caco-2. La présence de lettres différentes au-dessus des barres de l'histogramme signifie que les différences observées sont significativement différentes ($p < 0,05$).....	172
Figure 76 : Impact de l'ajout de MFGM sur l'adhésion de LGG sauvage et de ses mutants (<i>spaCBA</i> et <i>welE</i>) aux cellules épithéliales de l'intestin Caco-2. La présence de lettres différentes au-dessus des barres de l'histogramme signifie que les différences observées sont significativement différentes, ($p < 0,05$).....	173
Figure 77 : Compétition entre l'adhésion de LGG à la MFGM et l'adhésion de LGG aux cellules épithéliales de l'intestin Caco-2	175
Figure 78 : Résumé des connaissances acquises lors de ce travail de thèse	178
Figure 79 : Impact de la présence de pili SpaCBA dans la localisation de LGG dans la microparticule. 183	
Figure 80 : Comportement des poudres produites par atomisation et reconstituées dans de l'eau à différentes températures observé par CLSM.....	184

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Facteur d'adhésion à la mucine des lactobacilles (adapté de Nishiyama <i>et al.</i> , 2016).....	11
Tableau 2 : Mutants de LGG retrouvés dans la littérature	17
Tableau 3 : Composition protéique du lait de vache (d'après Fox, 2008; Livney, 2010)	26
Tableau 4 : Avantages et inconvénients des différents procédés d'encapsulation utilisés pour l'encapsulation de bactéries.....	33
Tableau 5 : Paramètres de séchage utilisés pour l'encapsulation de bactéries et survie des bactéries. UFC : Unité Formant Colonie.....	41
Tableau 6 : Composition de la fraction protéique de la MFGM, adapté de Singh, 2006; Dewettinck <i>et al.</i> , 2008; Jiménez-Flores & Brisson, 2008	52
Tableau 7 : Effets des protéines majeures de la MFGM sur la santé	56
Tableau 8 : Etudes cliniques présentant les effets d'une supplémentation alimentaire en MFGM sur la santé	58
Tableau 9 : Paramètres mesurés lors du séchage par atomisation (température d'air de sortie, température d'air d'entrée et humidité relative en sortie de cyclone)	86
Tableau 10 : Composition des solutions salines gastriques et intestinales.....	88
Tableau 11 : Limites inférieures et supérieures choisies pour la proportion des constituants des mélanges	101
Tableau 12 : Matrice du plan de mélanges et réponses expérimentales. La colonne « Rang » représente l'ordre du déroulement des expériences.....	102
Tableau 13 : Paramètres de force mesurés lors de l'adhésion entre la β -LG et LGG WT ou LGG <i>welE</i> 116	
Tableau 14 : Paramètres de force déterminés durant l'adhésion de la MFGM aux différentes souches de LGG.....	122
Tableau 15 : Coefficient du modèle mathématique dérivé de la matrice de Scheffé pour les réponses : température de gélification, module élastique, module visqueux et teneur en eau pour les différentes formulations de la matrice. Le coefficient R^2 pour chaque modèle utilisé est présenté en dessous de chaque colonne	144
Tableau 16 : Composition du mélange optimal pour atteindre les réponses choisies : température de gélification minimale, G' et G'' maximaux	146
Tableau 17 : Conditions de séchage et matrices testées lors de l'encapsulation de LGG par atomisation	152
Tableau 18 : Concentration en bactéries avant et après séchage par atomisation	152

Liste des tableaux

Tableau 19 : Concentration en bactéries avant et après séchage par atomisation avec la réduction logarithmique associée. Un facteur de cisaillement est utilisé pour corriger les valeurs avant séchage pour prendre en compte l'effet du cisaillement lors de la pulvérisation grâce au calcul suivant : concentration en bactéries ($\log_{10}\text{CFU/g}$) = concentration avant séchage \times log (facteur de cisaillement)	154
Tableau 20 : Propriétés physicochimiques des poudres produites. Les résultats en colonne, associés à des lettres identiques ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$)	155
Tableau 21 : Solubilité des poudres selon la température de reconstitution ($^{\circ}\text{C}$)	164

LISTE DES EQUATIONS

Équation 1 : Détermination de la teneur en azote total	68
Équation 2 : Détermination de la teneur en azote non protéique	69
Équation 3 : Détermination de la teneur en protéines totales.....	69
Équation 4 : Détermination de la teneur en lipides	70
Équation 5 : Détermination de la longueur de contour	76
Équation 6 : Modèle FJC	77
Équation 7 : Modèle WLC	77
Équation 8 : Détermination du coefficient de détermination	77
Équation 9 : Détermination du nombre de bactéries adhérentes par cellule	81
Équation 10 : Détermination du facteur de cisaillement	91
Équation 11 : Détermination de la teneur en eau	91
Équation 12 : Détermination de la somme des constituants du mélange	101
Équation 13 : Modèle utilisé pour calculer les réponses sur l'ensemble du domaine	102

ABRÉVIATIONS

ADPH : Adipophiline	GRAS: Generally Recognized As Safe
AFM : Atomic Force Microscopy	HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
ANP : Azote non protéique	IL : Interleukine
BRCA : Breast Cancer	IMCU : International Milk Clotting Unit
BSA : Bovine Serum Albumine	L _c : Longueur de contour
BTN : Butyrophiline	LGG : Lactobacillus rhamnosus GG
CD36 : Cluster de différenciation 36	L _k : Longueur de Kuhn
CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy	L _p : Longueur de Persistance
CMP: Caséinomacropéptide	m/m : masse / masse
CMPG : Centre of Microbial and Plant Genetics	m/v : masse / volume
DLVO: Derjaguin-Landau-Verwey- Overbeek	MFGM : Milk Fat Globule Membrane
DMEM : Dulbeco's Modified Eagle Medium	MRS : De Man Rogosa Sharpe
DMSO : Diméthylsulfoxyde	MTT : sel de tétrézolium
EFSA : European Food Safety Authority	MUC : Mucine
EPS : Exopolysaccharide	Nt : Azote total
FABP : Fatty Acid Binding Protein	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture	PAS : Periodic Acid Schiff
FJC : Freely Jointed Chain	PEG : Polyéthylène Glycol
G' : module de conservation	PG : Peptidoglycane
G'' : module de perte	PP3 : Protéose Peptone 3
GDL: Glucono Delta Lactone	PS : Protéines Solubles
	SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
	SEM : Scanning Electron Microscopy
	SMFS : Single Molecule Force Spectroscopy

Abréviations

SSG : Solution Saline Gastrique

SSI : Solution Saline Intestinale

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TCA : Acide Trichloroacétique

TEM : Transmission Electron Microscopy

TNF : Tumoral Necrosis Factor

TS : Tryptone Sel

UFC: Unité Formant Colonie

v/v : volume/volume

WLC : Worm Like Chain

XDH/XO: xanthine déshydrogénase/oxydase

α -LA : α -lactalbumine

β -LG : β -lactoglobuline

INTRODUCTION GENERALE

1. Contexte de l'étude

Au début du XX^{ème} siècle, Elie Metchnikoff fut le premier à suggérer que la consommation de bactéries lactiques, retrouvées dans des laits fermentés, pouvait avoir un effet bénéfique sur la santé du consommateur. Plus d'un siècle après, les bactéries lactiques ayant un effet favorable sur la santé sont plus que jamais d'actualité et sont désormais désignées sous le terme de bactéries probiotiques. Depuis 2001 et d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), les bactéries probiotiques sont définies comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un effet bénéfique sur l'hôte » (FAO/WHO, 2002; Hill *et al.*, 2014). Si la définition d'une bactérie probiotique est simple, sa mise en œuvre n'est quant à elle pas toujours évidente. En effet, l'enjeu est de préserver les bactéries dans un état viable et fonctionnel jusqu'à leur lieu d'action, généralement, l'intestin. Le challenge est de taille puisque, pour être efficaces, ces bactéries doivent arriver en nombre suffisant, vivantes et fonctionnelles, mais avant cela elles doivent surmonter plusieurs obstacles inhérents aux procédés industriels et au tractus digestif. Dans le cas qui nous intéresse, les bactéries sont ajoutées dans des produits alimentaires, et les procédés requis pour aboutir au produit fini peuvent affecter leur survie. De plus, elles doivent survivre lors du stockage du produit et à la présence combinée de protéases et d'acide au niveau de l'estomac.

La microencapsulation est une technique de plus en plus développée pour protéger les bactéries probiotiques de l'environnement extérieur (de Vos *et al.*, 2010; Cook *et al.*, 2012; Martín *et al.*, 2015). Elle permet de protéger les bactéries lors de leur transformation (production de biomasse, lyophilisation, stockage, application dans les aliments) jusqu'à ce qu'elles atteignent l'intestin (De Prisco & Mauriello, 2016). De nombreuses études ont montré que l'encapsulation permettait aux bactéries de résister aux conditions défavorables rencontrées lors du procédé de fabrication et de conservation de l'aliment, puis au niveau du tractus digestif. Différentes techniques (émulsification, extrusion, séchage par atomisation, lit fluidisé...) et différents matériaux (alginate de sodium, κ -carraghénane, protéines du lait...) peuvent être utilisés pour encapsuler les bactéries. Les chercheurs sont constamment à la recherche d'une nouvelle formulation de matrice et d'un procédé optimal pour améliorer l'efficacité d'encapsulation. Ainsi, ils visent à améliorer les taux d'encapsulation des bactéries, protéger les bactéries lors du procédé, lors du stockage des aliments

Introduction générale

et lors du passage dans le tractus gastrique et contrôler la libération des bactéries au niveau de l'intestin pour qu'elles exercent leur effet probiotique.

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse fait suite à une thèse ministérielle (Jennifer BURGAIN, 2011-2013) intitulée « *Microencapsulation de bactéries probiotiques dans des matrices laitières : Etude des mécanismes de formation par une approche multi-échelle* ». Dans ce travail, un procédé d'encapsulation par émulsification a été mis au point avec une matrice composée uniquement d'ingrédients laitiers. Ce procédé permet la production de microparticules insolubles et stables en milieux aqueux. De bons taux d'encapsulation et de survie des bactéries ont été obtenus dans des conditions *in vitro* simulant l'estomac. Ce travail a également montré l'importance de la nature et des quantités de protéines laitières utilisées dans la matrice d'encapsulation. Une matrice composée de 90 % de caséines et de 10 % de protéines solubles (PS) dénaturées s'est révélée optimale pour piéger les bactéries probiotiques et les protéger de l'acidité gastrique. Ces résultats à l'échelle macroscopique ont pu être reliés à des données microscopiques telles que la localisation des bactéries dans les microparticules. Avec la formulation optimale les bactéries étaient retrouvées à l'intérieur des microparticules et étaient donc mieux protégées de l'environnement extérieur. Ces observations ont finalement pu être expliquées suite à l'étude des interactions entre les bactéries et la matrice laitière à l'échelle moléculaire. Cette analyse multi-échelle a donc permis de comprendre certains phénomènes observés au cours de l'encapsulation.

2. Objectif de la thèse

L'objectif général est d'étudier l'influence de l'ajout d'ingrédients fonctionnels laitiers (caséines, β -lactoglobuline – β -LG, α -lactalbumine – α -LA, sérum albumine bovine- BSA et membrane des globules gras du lait - MFGM) sur l'encapsulation de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). Les objectifs sont les suivants :

- Identifier les ingrédients laitiers pouvant éventuellement adhérer à LGG et déterminer la ou les molécules de surface de LGG mises en jeu dans ces phénomènes d'adhésion.
- Caractériser l'évolution de la structure des microparticules produites avec différentes matrice au cours de la digestion gastro-intestinale dans le but de comprendre l'impact de la

formulation sur la protection de LGG au niveau gastrique et la libération de LGG au niveau de l'intestin.

- Modifier le procédé d'encapsulation par émulsification précédemment développé (thèse J. BURGAIN) en un procédé de séchage par atomisation dans le but de rendre le procédé industrialisable et de développer des poudres avec de nouvelles fonctionnalités liées à la température de réhydratation des poudres.
- Comprendre l'impact de la présence d'ingrédients fonctionnels laitiers dans la matrice sur l'adhésion de LGG aux cellules intestinales Caco-2.

3. Structure de la thèse

Le premier chapitre de ce manuscrit concerne une synthèse bibliographique permettant de poser le contexte général de l'étude. Des généralités sur les bactéries probiotiques ainsi qu'une description plus détaillée des propriétés de surface et des propriétés d'adhésion de LGG sont tout d'abord développées. Dans un second temps, l'intérêt d'utiliser des protéines lactières dans les procédés d'encapsulation des bactéries ainsi que les procédés d'encapsulation déjà développés à cette fin sont détaillés. Les avantages et les inconvénients de chaque technique sont étudiés pour justifier le choix du procédé d'encapsulation utilisé dans ce travail. Enfin, ce chapitre se termine par l'étude de la membrane des globules gras du lait et de ses glycoprotéines. Dans cette partie, la composition de la MFGM en protéines glycosylées, les méthodes de purification de la MFGM ainsi que ses propriétés nutritionnelles et adhésives sont plus particulièrement détaillées.

Le second chapitre s'attache à définir les matériels et méthodes utilisés tout au long de ce travail. Dans un premier temps, les techniques de purification et de caractérisation de la MFGM sont précisées. Ensuite, les méthodes d'étude des propriétés adhésives de LGG avec les protéines lactières ou avec les cellules intestinales sont explicitées. Les techniques d'encapsulation utilisées dans ce manuscrit ainsi que les méthodes pour caractériser les microparticules produites sont détaillées par la suite. Pour finir, la mise en œuvre d'un plan de mélange utilisé pour formuler la matrice idéale est présentée.

Le troisième chapitre de ce manuscrit concerne les résultats et la discussion. Son organisation est présentée dans la **Figure 1**.

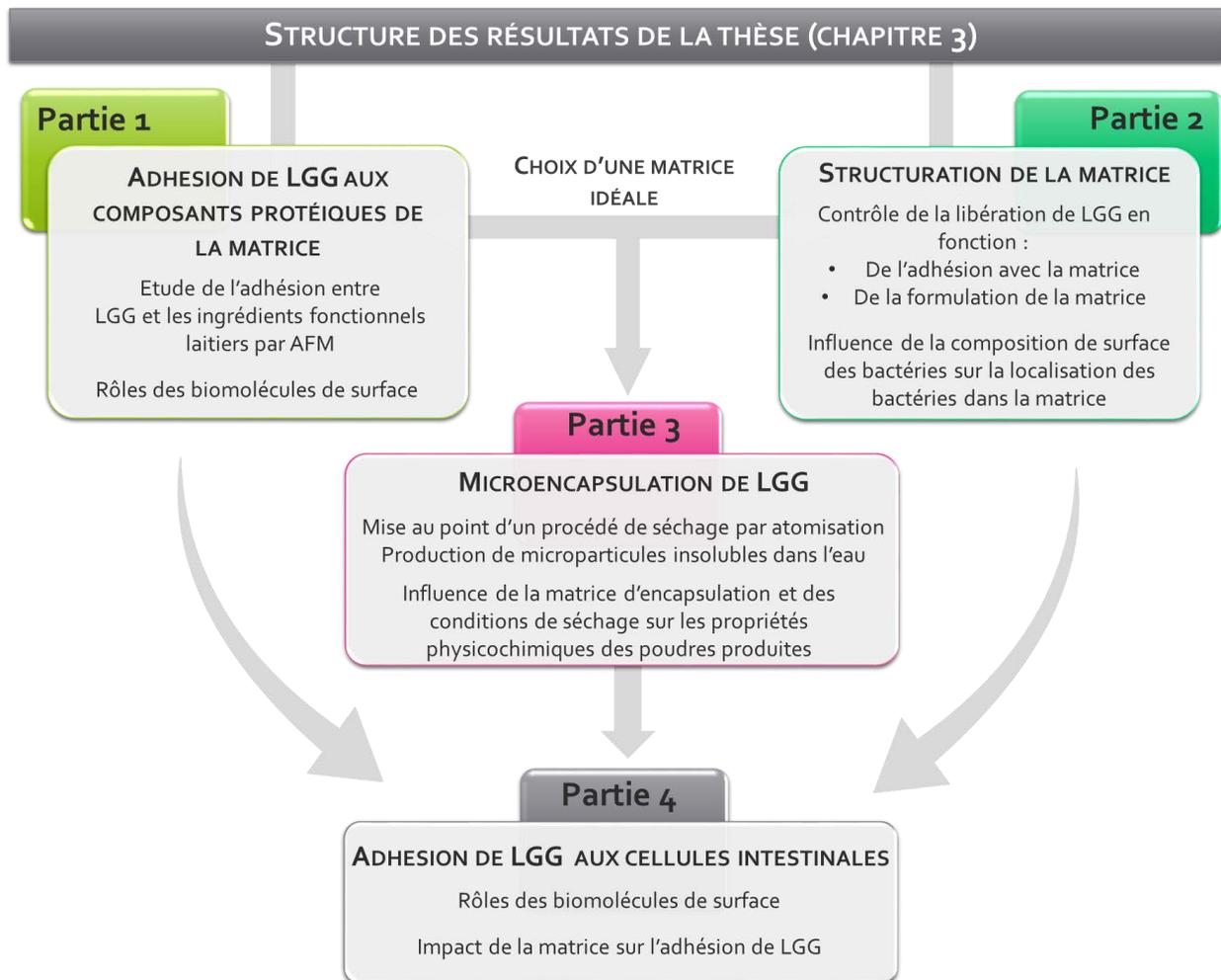


Figure 1 : Organisation des résultats et discussions de ce manuscrit

La **première partie du Chapitre 3** consiste à mettre en évidence des phénomènes d'adhésion entre LGG et la matrice protéique laitière. Des études de microscopie à force atomique sont réalisées pour déterminer les protéines du lait éventuellement impliquées dans l'adhésion avec LGG. Cette technique est également mise en œuvre pour comprendre le rôle des biomolécules de surface de LGG dans l'adhésion. La première partie se termine par l'étude du pouvoir adhésif de la membrane des globules gras du lait avec LGG.

La **deuxième partie du Chapitre 3** concerne la structuration de la matrice protéique laitière lors du procédé d'encapsulation par émulsification. L'impact des événements adhésifs entre LGG et la matrice laitière ainsi que l'impact de la formulation de la matrice sur sa structuration sont étudiés. L'effet de l'ajout de MFGM dans la matrice d'encapsulation sur la texture et la rhéologie des gels formés lors de l'encapsulation est également abordé.

Ces deux premières parties permettent d'identifier une matrice idéale pour avoir une bonne préservation de la viabilité de LGG au cours de la digestion gastrique et une libération contrôlée de LGG au niveau intestinal.

La **troisième partie du Chapitre 3** consiste à adapter le procédé d'encapsulation par émulsification développé dans la précédente thèse sur une tour de séchage par atomisation. Le but est de développer un procédé industrialisable et capable de produire des poudres avec de nouvelles fonctionnalités.

La **dernière partie du Chapitre 3** est centrée sur l'adhésion de LGG aux cellules épithéliales de l'intestin. Le rôle des biomolécules de surface de LGG dans l'adhésion aux cellules intestinales est tout d'abord abordé. Enfin l'impact de la matrice laitière sur l'adhésion de LGG aux cellules intestinales est analysé.

4. Valorisations scientifiques

4.1. Publications

4.1.1. Publications directement liées à la thèse

J. Guerin, J. Bacharouche, J. Burgain, S. Lebeer, G. Francius, F. Borges, J. Scher & C. Gaiani (2016). Pili of *Lactobacillus rhamnosus* GG mediate interaction with β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 58, 35-41.

J. Guerin, J. Petit, J. Burgain, F. Borges, B. Bhandari, C. Perroud, S. Desobry, J. Scher & C. Gaiani (2017). *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. *Journal of food engineering*, 193, 10-19.

J. Guerin, F. Borges, J. Burgain, B. Bhandari, S. Desobry, J. Scher & C. Gaiani (2017). Imaging technique tools to study the influence of milk matrix composition on *Lactobacillus rhamnosus* GG delivery systems efficiency. *Food & function*, 8, 1587-1598.

Introduction générale

J. Guerin, J. Burgain, F. Gomand, J. Scher & C. Gaiani (2017). Milk fat globule membrane glycoproteins: valuable ingredients for lactic acid bacteria encapsulation? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Soumise.

J. Guerin, C. Soligot, J. Burgain, M. Huguet, G. Francius, S. El-Kirat Chatel, F. Gomand, S. Lebeer, Y. Le Roux, F. Borges, J. Scher & C. Gaiani (2017). Adhesive interactions between milk fat globule membrane and *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibit its attachment to intestinal cell. *ACS Chemical Biology*, Soumise.

4.1.2. Publications hors travaux de thèse

J. Burgain, J. Scher, S. Lebeer, J. Vanderleyden, M. Corgneau, **J. Guerin**, C. Caillet, J.F.L. Duval, G. Francius & C. Gaiani (2015). Impacts of pH-mediated EPS structure on probiotic bacterial pili–whey proteins interactions. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 134, 332-338.

J. Guerin, A. Kriznick, N. Ramalanjaona, Y. Leroux & J.M. Girardet (2016). Interaction between dietary bioactive peptides of short length and bile salts in submicellar or micellar state. *Food chemistry*, 209, 114-122.

F. Gomand, F. Borges, J. Burgain, **J. Guerin**, A.M. Revol & C. Gaiani. Food matrix design for effective Lactic Acid Bacteria delivery. *Annual Review of Food Science and Technology*, accepted.

4.2. Communications orales

J. Guerin, J. Burgain, F. Borges, J. Bacharouche, S. Lebeer, G. Francius, J. Scher & C. Gaiani. Interaction entre pili et protéines du lait : un processus clé pour améliorer l'encapsulation de *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Club des Bacteries Lactiques*, 17-19 Juin 2015, Lille, France.

J. Guerin, J. Scher, J. Burgain, J. Bacharouche, G. Francius & C. Gaiani. Interaction between pili and whey proteins as a key processus for improving encapsulation of LGG in dairy matrices. *Delivery of functionality in complex food systems*, July 2015, Paris, France.

J. Guerin, J. Bacharouche, G. Francius, J. Burgain, J. Scher, S. Lebeer, F. Borges & C. Gaiani. Interaction between *Lactobacillus rhamnosus* GG and whey proteins: key role of pili. *NANOinBIO 2016: Advances for life & Materials Science*, June 2016, LeGosier, Guadeloupe, France.

J. Guerin, J. Scher, J. Burgain, J. Petit & C. Gaiani. A new method for probiotic encapsulation in dairy matrices allowing rehydration or suspension of the powder depending on water temperature. *ISOPOW XIII*, June 2016, Lausanne, Switzerland.

J. Guerin, J. Bacharouche, G. Francius, J. Burgain, J. Scher, S. Lebeer, F. Borges & C. Gaiani. Milk proteins and probiotic bacteria interactions monitored by Atomic Force Microscopy. *NIZO Dairy Conference – Asia Pacific*, November 2016, Singapore.

4.3. Présentations par affiche

J. Guerin, J. Petit, J. Burgain, F. Borges, B. Bandhari, S. Desobry, J. Scher & C. Gaiani. Probiotic encapsulation in milk matrices by spray-drying: matrices presenting new functionality. *World Dairy Summit*, October 2016, Rotterdam, Netherland.

➤ Bourse FIL France

J. Guerin, J. Bacharouche, G. Francius, J. Burgain, J. Scher, S. Lebeer, F. Borges & C. Gaiani. Interaction between β -lactoglobulin and *Lactobacillus rhamnosus* GG. Molecular mechanisms occurring during microencapsulation to protect the bacteria. *NIZO Dairy Conference – Asia Pacific*, November 2016, Singapore.

➤ Prix du meilleur poster

J. Burgain, J. Guerin, F. Borges, J. Scher & C. Gaiani. Design of a matrix able to control release of bacteria during in vitro digestion. *25th International Conference on Bioencapsulation*, July 2017, Nantes, France.

CHAPITRE 1:
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES BACTERIES PROBIOTIQUES

1. Définition

D'après l'OMS et la FAO, les bactéries probiotiques sont définies comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un effet bénéfique sur l'hôte » (FAO/WHO, 2002; Hill *et al.*, 2014). Le terme probiotique est maintenant très utilisé et bien accepté et cette définition a été adoptée par la communauté scientifique, les institutions réglementaires et les consommateurs. Le terme probiotique inclut principalement des bactéries mais aussi des levures. L'utilisation du terme bactéries dans ce manuscrit fait référence à des bactéries probiotiques.

2. Mode d'action des bactéries probiotiques

Les bactéries probiotiques exercent de nombreux effets positifs sur la santé de l'hôte. De manière générale, les deux principaux effets bénéfiques associés aux probiotiques sont le maintien d'un tube digestif et d'un système immunitaire sains (Hill *et al.*, 2014). Pour exercer leurs effets positifs, trois principaux mécanismes d'action sont proposés dans la littérature : l'exclusion ou l'inhibition des bactéries pathogènes directement, l'amélioration des fonctions de la barrière épithéliale ou encore la stimulation du système immunitaire (Corr *et al.*, 2009; Segers & Lebeer, 2014) (**Figure 2**).

Les bactéries probiotiques peuvent tout d'abord exclure les bactéries pathogènes en bloquant leurs sites d'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin (1) (Lebeer *et al.*, 2010; Tytgat *et al.*, 2016a; Campana *et al.*, 2017). Elles peuvent également agir en inhibant directement les bactéries pathogènes grâce à la production de composés antimicrobiens (2) (Rushdy & Gomaa, 2013; Arqués *et al.*, 2015) ou en exerçant un effet de compétition pour certains nutriments (3) (Lebeer *et al.*, 2008). Les bactéries probiotiques ont également la capacité d'améliorer les fonctions de la barrière épithéliale en modulant la production de mucine suite à leur adhésion (Mack *et al.*, 2003) ou encore en améliorant le fonctionnement des jonctions serrées (des jonctions permettant l'adhésion des

Synthèse bibliographique

cellules intestinales entre elles et assurant l'étanchéité de l'épithélium) (4) (Rao & Samak, 2013). Enfin, les bactéries probiotiques stimulent la réponse immunitaire en régulant l'expression de cytokines ou en modulant les fonctions des cellules dendritiques (5) (Ashraf & Shah, 2014; Fong *et al.*, 2016; Tytgat *et al.*, 2016b; Wan *et al.*, 2016).

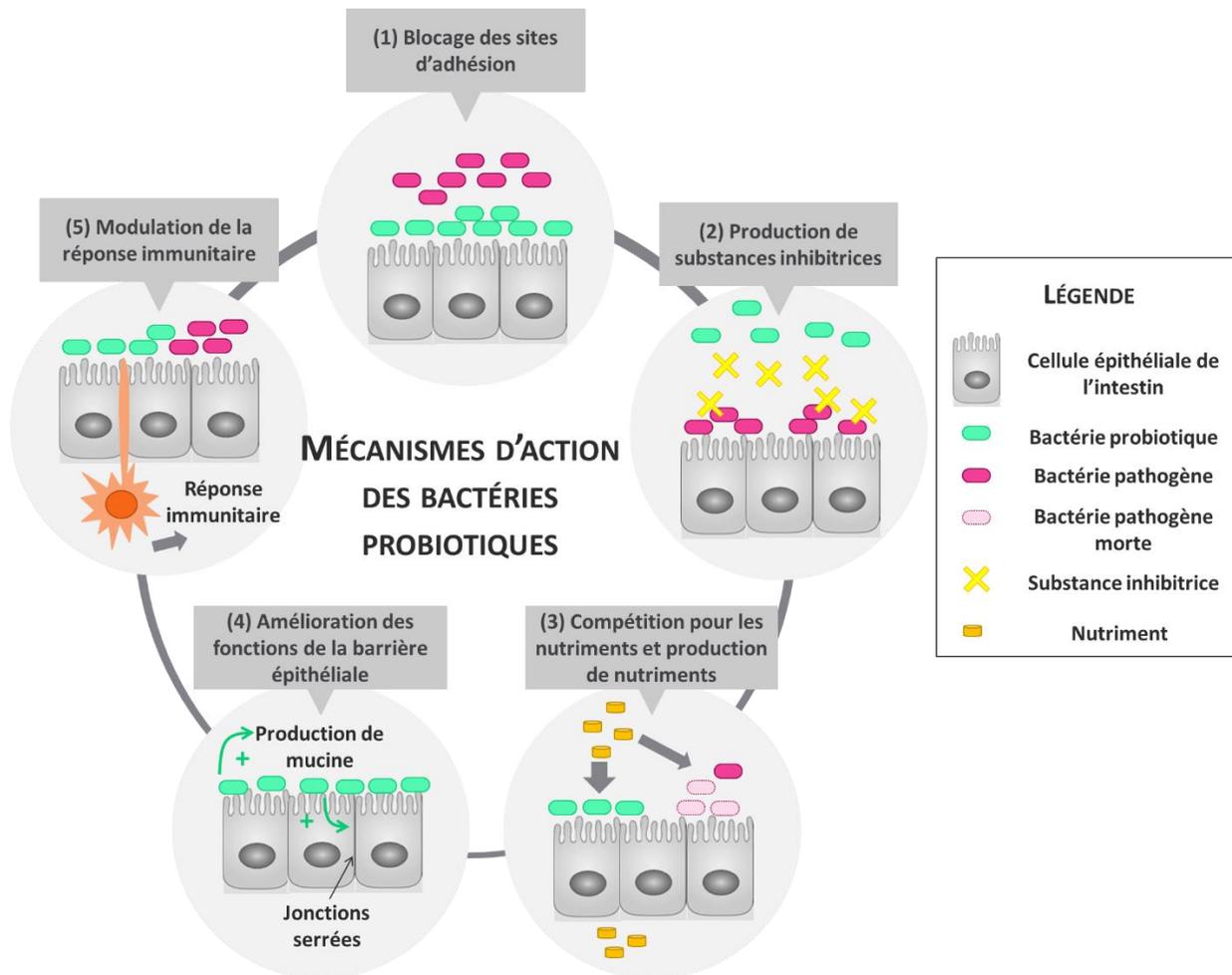


Figure 2 : Principaux mécanismes d'action des bactéries probiotiques

3. Capacité d'adhésion des bactéries probiotiques

Les bactéries peuvent exercer certains de leurs effets probiotiques (blocage des sites d'adhésion, modulation de la réponse immunitaire) grâce à leur capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale. De nombreux travaux ont étudié cette particularité en utilisant divers modèles *in vitro* et *in vivo* se rapprochant au mieux de l'intestin humain (Arena *et al.*, 2017). Parmi les modèles *in vitro*, les

lignées cellulaires des cellules épithéliales de l'intestin comme les cellules Caco-2 ou HT-29 (von Ossowski *et al.*, 2010; Polak-Berecka *et al.*, 2014) et les mucus ou les molécules de la matrice extracellulaire immobilisées (Le *et al.*, 2013) sont souvent utilisés. L'utilisation de cellules dendritiques, de cellules mononucléaires du sang périphérique ou de macrophages est également possible pour étudier l'effet immunomodulateur de certaines souches probiotiques (van Hemert *et al.*, 2010; Vargas García *et al.*, 2015; Tytgat *et al.*, 2016b). Des études *in vivo* chez des mammifères comme la souris ou chez l'Homme ont été également publiées afin d'évaluer la persistance des bactéries probiotiques au niveau de l'intestin (Marco *et al.*, 2010; Van Bokhorst-van de Veen *et al.*, 2012).

L'épithélium intestinal est protégé par une couche de mucus servant de niche aux bactéries commensales. Le mucus est constitué majoritairement de protéines glycosylées appelées mucines mais aussi de protéines, de lipides et de glycolipides (Juge, 2012). La capacité d'adhésion des bactéries probiotiques à la mucine intestinale, et plus particulièrement des lactobacilles, est possible grâce à la présence de facteurs d'adhésion présents à la surface de leur cellules (Nishiyama *et al.*, 2016) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Facteur d'adhésion à la mucine des lactobacilles (adapté de Nishiyama *et al.*, 2016)

Facteur d'adhésion	Espèces	Références
Protéine de la famille Mub	<i>L. acidophilus</i> <i>L. reuteri</i>	Roos & Jonsson, 2002; Buck <i>et al.</i> , 2005
Adhésine spécifique au mannose, Msa	<i>L. plantarum</i>	Pretzer <i>et al.</i> , 2005
Facteur d'adhésion MBF	<i>L. rhamnosus GG</i>	von Ossowski <i>et al.</i> , 2011
Protéine CmbA	<i>L. reuteri</i>	Etzold <i>et al.</i> , 2014; Jensen <i>et al.</i> , 2014
Pili SpaCBA	<i>L. rhamnosus GG</i>	Kankainen <i>et al.</i> , 2009; von Ossowski <i>et al.</i> , 2010; Reunanen <i>et al.</i> , 2012
Facteur d'élongation Tu	<i>L. johnsonii</i>	Granato <i>et al.</i> , 2004
GAPDH	<i>L. plantarum</i>	Kinoshita <i>et al.</i> , 2008
Protéine chaperone GroEL	<i>L. johnsonii</i>	Bergonzelli <i>et al.</i> , 2006
Protéine MapA	<i>L. reuteri</i>	Miyoshi <i>et al.</i> , 2006
Protéine Lam29	<i>L. mucosae</i>	Watanabe <i>et al.</i> , 2012

Les mécanismes biochimiques des interactions restent cependant très difficiles à déterminer du fait de l'hétérogénéité des constituants du mucus intestinal et de la multitude de facteurs impliqués dans le processus d'adhésion (Juge, 2012). Il est toutefois bien établi que l'architecture de l'enveloppe cellulaire des bactéries est impliquée dans les mécanismes d'adhésion avec l'hôte. En

Synthèse bibliographique

effet, la structure et la composition de la paroi cellulaire des bactéries influencent leur capacité d'adhésion. La membrane cellulaire des bactéries (**Figure 3**), et notamment des bactéries Gram positif, est enveloppée par une couche épaisse de peptidoglycane (PG) dans laquelle sont enchâssés des acides téichoïques, des pili, des protéines et des exopolysaccharides (EPS). Chez certaines espèces, la couche de PG peut être encore entourée par une enveloppe de protéines formant la couche S (ou S-layer) (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014). L'implication de tous ces composés dans les propriétés d'adhésion de bactéries a déjà été démontrée.

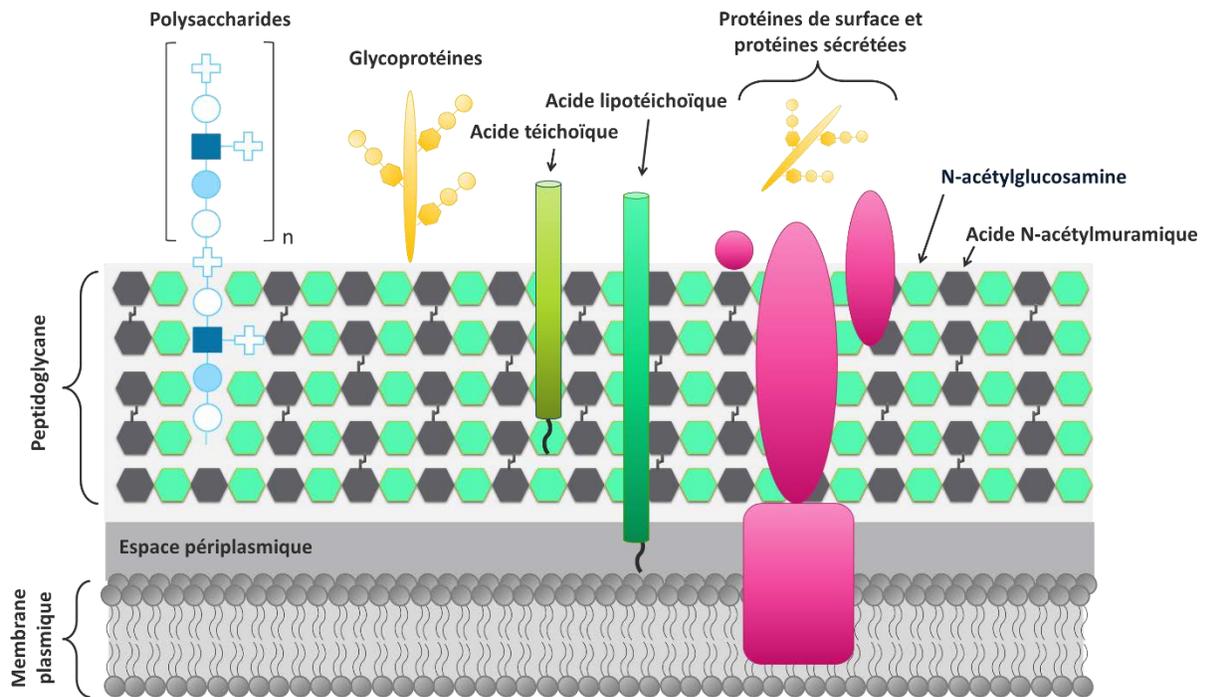


Figure 3 : Composition de la paroi cellulaire des bactéries Gram positive (adaptée de Burgain *et al.*, 2014a)

La composition de surface des bactéries probiotiques et l'implication des composés dans l'adhésion avec l'hôte est dépendante de la souche. Une des bactéries probiotiques la plus connue et la plus étudiée est LGG. Par la suite, le manuscrit sera focalisé sur cette bactérie afin de comprendre l'implication de ses composés de surface dans l'interaction avec l'hôte.

4. *Lactobacillus rhamnosus* GG

LGG est la bactérie modèle utilisée au cours de ce travail de thèse. LGG a pour la première fois été isolée à partir de microbiote intestinal sain par Gorbach et Goldin (Gorbach, 1996), d'où la dénomination « GG », et a été identifiée comme une potentielle bactérie probiotique du fait de sa grande résistance à l'acidité et à la bile, de sa capacité de croissance et de sa capacité d'adhésion à l'épithélium intestinal (Doron *et al.*, 2005). Elle est maintenant considérée comme une bactérie probiotique modèle (Segers & Lebeer, 2014). De nombreuses études cliniques ont mis en évidence les effets positifs de LGG sur la santé de l'hôte. Par exemple, l'efficacité de LGG a été démontrée dans la prévention et le traitement de nombreux troubles gastro-intestinaux comme les diarrhées aiguës ou les diarrhées associées aux antibiotiques, mais aussi sur le traitement et la prévention de maladies de type allergiques ou encore dans les soins dentaires (Doron *et al.*, 2005; Segers & Lebeer, 2014). Des premiers résultats prometteurs tendent à prouver que LGG pourrait aider à prévenir certaines maladies comme le cancer du côlon (Goldin *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 2002), la polyarthrite rhumatoïde (Hatakka *et al.*, 2003; Baharav *et al.*, 2004) ou encore le syndrome de l'intestin irritable (Gupta *et al.*, 2000; Gosselink *et al.*, 2004). Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour valider ces propriétés.

4.1. Des molécules de surface bien caractérisées

La paroi cellulaire de LGG a été beaucoup étudiée du fait de l'éventuelle contribution de ses composés dans son action probiotique. Comme toutes les bactéries Gram positives, la paroi cellulaire de LGG est constituée d'une couche de PG, d'acides téichoïques et d'une grande variété de protéines et de polysaccharides (**Figure 3**).

4.1.1. Les pili et les protéines de surface

Parmi les protéines de surface de LGG, les pili ont un rôle majeur dans la capacité d'adhésion des cellules. Les pili sont définis comme des appendices de surface, non flagellaires, protéiques et composés de plusieurs sous-unités impliquées dans l'adhésion avec d'autres bactéries, avec des cellules hôtes ou avec des surfaces abiotiques (Kline *et al.*, 2009). Les pili de LGG ont été observés pour la première fois par Lebeer *et al.* (2009) lors de l'étude d'un mutant de surface dépourvu

Synthèse bibliographique

d'EPS. Le séquençage complet du génome a également permis de déterminer les gènes codant pour le pilus (Kankainen *et al.*, 2009). Plus précisément, deux clusters de gènes codant pour deux pili bien distincts ont été mis en évidence : le premier codant pour le pilus SpaFED et le second codant pour le pilus SpaCBA (Kankainen *et al.*, 2009). Actuellement, dans les conditions de culture de laboratoire testées, seul le cluster de gènes codant pour le pilus SpaCBA est exprimé (Reunanen *et al.*, 2012; Douillard *et al.*, 2013). Des techniques d'immunomarquage ont permis de confirmer la présence du pilus SpaCBA (**Figure 4**). LGG est recouvert par 10 à 50 pili de 1 μm de long (Kankainen *et al.*, 2009; Reunanen *et al.*, 2012).

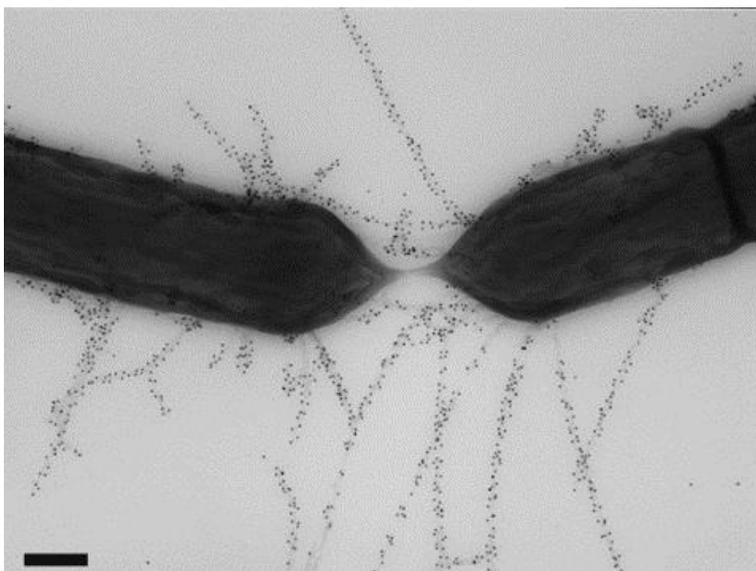


Figure 4 : Image de microscopie électronique à transmission de LGG marquée avec des anticorps anti-SpaA avec des particules d'or de 10 nm (issus de Reunanen *et al.*, 2012)

La structure du pilus SpaCBA a été étudiée plus en détail par des techniques d'immunomarquage et d'électrophorèse (Reunanen *et al.*, 2012). Le pilus SpaCBA de LGG est composé de trois sous-unités protéiques nommées SpaA, SpaB et SpaC. La sous-unité SpaA est présente tout le long du pilus et semble former l'ossature du pilus. La sous-unité SpaB est majoritairement retrouvée à la base du pilus, au niveau du point d'ancrage avec la paroi cellulaire. Très peu de sous-unités SpaB sont retrouvées le long de l'appendice. La sous-unité SpaC est également retrouvée tout le long du pilus mais également à son extrémité (**Figure 5**).

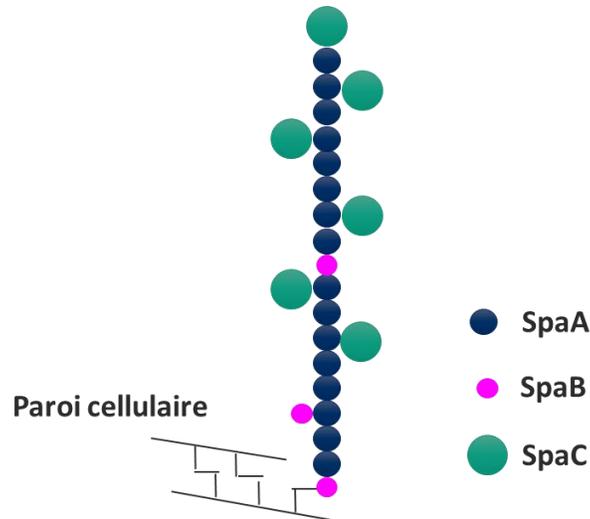


Figure 5 : Représentation de la structure du pilus SpaCBA de LGG (adapté de Reunanen *et al.*, 2012)

Récemment, la glycosylation du pilus SpaCBA a été mise en évidence (Tytgat *et al.*, 2016b). L'AFM, et en particulier, la spectroscopie de force à l'échelle de la molécule (SMFS ou Single Molecule Force Spectroscopy), requiert l'utilisation de leviers AFM fonctionnalisés avec des lectines, des protéines capables de se lier spécifiquement et de façon réversible à certains glucides. La mise en œuvre de cet outil a permis de révéler la présence de résidus mannoses et fucoses sur les pili SpaCBA de LGG (Tytgat *et al.*, 2016). Ces résultats ont été confirmés par des techniques de coloration des sucres comme la coloration PAS (Acide Périodique de Schiff) (Tytgat *et al.*, 2016b). La glycosylation semble être portée par la sous-unité SpaC du pilus. En effet, dans une étude précédente, ces mêmes auteurs ont montré le comportement élastique du pilus SpaCBA de LGG lorsqu'il était en contact avec des pointes AFM fonctionnalisées avec de l'antisérum SpaC (Tripathi *et al.*, 2013). Ces mêmes propriétés élastiques ont été observées pour le pilus SpaCBA de LGG avec des pointes fonctionnalisées avec des lectines (Tytgat *et al.*, 2016b). L'antisérum SpaC et les lectines agissent de la même façon sur les propriétés élastiques du pilus SpaCBA, ce qui tend à dire que SpaC est la protéine glycosylée.

Bien que le pilus SpaCBA soit la protéine de surface la plus connue et la plus étudiée, il existe d'autres protéines à la surface de LGG comme la protéine MBF. C'est une adhésine ancrée à la membrane de LGG et présentant un domaine de liaison à la mucine (von Ossowski *et al.*, 2011). Une protéine MabA est également ancrée à la membrane (Perea Vélez *et al.*, 2010) ainsi qu'une protéine glycosylée sécrétée dans le milieu : Msp1/p75 (Lebeer *et al.*, 2012b).

4.1.2. Les exopolysaccharides

Des études de SMFS ont été réalisées afin d'évaluer la localisation et la conformation des polysaccharides présents à la surface de LGG (Francius *et al.*, 2009). Pour cela, les auteurs ont utilisé des pointes AFM fonctionnalisées avec des lectines issues de *Pseudomonas aeruginosa* ou encore la concanavaline A pour détecter spécifiquement la présence de galactose et de mannose (ou glucose). Les analyses ont mis en évidence la présence de deux types de polysaccharides associés à la paroi cellulaire de LGG (**Figure 6A**).

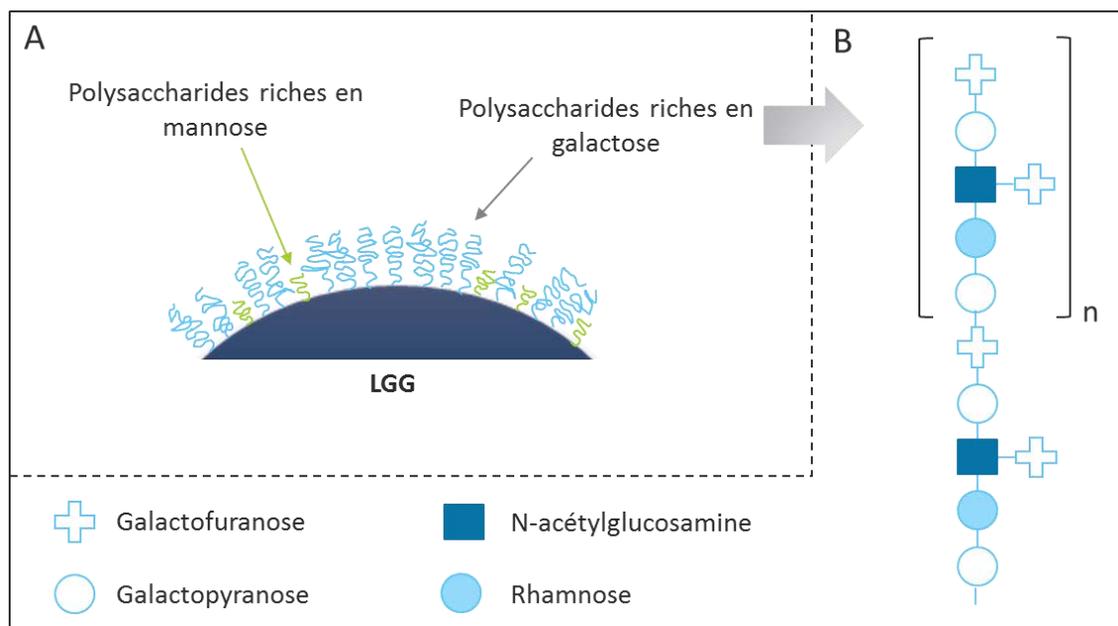


Figure 6 : Exopolysaccharides présents à la surface de LGG (A). Structure des longs EPS riches en galactose (B) (adapté de Lebeer *et al.*, 2009)

Les polysaccharides se différencient par des longueurs de chaîne variables, ainsi que des distributions et des compositions en sucres totalement différentes. Les plus longs et les plus abondants sont riches en galactose. Ces polysaccharides ont une distribution dense et homogène à la surface de la bactérie. Leur composition a déjà été décrite par Landersjö *et al.* (2002) qui souligne également la forte proportion de galactose (**Figure 6B**). Les autres polysaccharides, plus courts sont riches en mannose (ou glucose) et sont également présents à la surface de LGG mais de manière moins abondante. Ces derniers n'ont pas encore été caractérisés.

4.1.3. Disponibilité de différents mutants de surface

Les molécules de surface de LGG sont bien connues et certaines très bien caractérisées. La connaissance du génome complet de LGG facilite la construction de mutants de surface qui ont été utilisés dans différentes études afin de comprendre leur implication dans les mécanismes d'adhésion (**Tableau 2**). Toutes les souches mutantes de LGG sont issues du CMPG (Centre of Microbial and Plant Genetics).

Tableau 2 : Mutants de LGG retrouvés dans la littérature

Souche	Génotype	Nom	Caractéristiques	Références
ATCC53103	Sauvage	LGG WT	-	Doron <i>et al.</i> , 2005
CMPG5357	$\Delta spaCBA::Tc^r$	LGG <i>spaCBA</i>	Mutant dépourvu de pili SpaCBA	Lebeer <i>et al.</i> , 2012a
CMPG5351	$\Delta welE::Tc^r$	LGG <i>welE</i>	Mutant dépourvu des longs EPS riches en galactose	Lebeer <i>et al.</i> , 2009
CMPG5365	$\Delta welE::Tc^r \Omega spaC::Ery^r$	LGG <i>welE spaCBA</i>	Mutant dépourvu des longs EPS riches en galactose et du pili SpaCBA	Lebeer <i>et al.</i> , 2012a
CMPG5540	$\Delta dltD::Tet^r$	LGG <i>dltD</i>	Mutant présentant des acides lipotéichoïques modifiés	Perea Velez <i>et al.</i> , 2007
CMPG5356	$\Delta mbf::Tc^r$	LGG <i>mbf</i>	Mutant dépourvu de protéines MBF	Lebeer <i>et al.</i> , 2012a
CMPG5230	$\Delta mabA::Tc^r$	LGG <i>mabA</i>	Mutant dépourvu de protéines MabA	Perea Vélez <i>et al.</i> , 2010

4.2. Adhésion de LGG aux cellules hôtes et immunomodulation

L'adhésion de LGG aux cellules de l'hôte comme les cellules épithéliales de l'intestin ou encore les cellules de l'immunité comme les macrophages ou encore les cellules dendritiques a fait l'objet de nombreuses études.

Il est maintenant bien établi que la sous-unité SpaC du pilus SpaCBA joue un rôle majeur dans l'adhésion de LGG au mucus et que cette adhésion est responsable de la longue résidence de LGG dans l'intestin humain comparé aux lactobacilles non piliés (Tuomola *et al.*, 2000; von Ossowski *et al.*, 2011). Une récente étude a montré que l'adhésion de LGG aux cellules épithéliales intestinales Caco-2 est médiée par le pilus SpaCBA (Lebeer *et al.*, 2012). Quand les gènes codant pour le pilus sont délétés (mutant *spaCBA*), la capacité d'adhésion de LGG aux cellules intestinales Caco-2 est très affectée. Par contre, pour les mutants dépourvus des autres adhésines (comme MBF

Synthèse bibliographique

ou MabA), la capacité d'adhésion n'est pas modifiée. Il est intéressant de noter que, un mutant dépourvu d'EPS (mutant *welE*) montre une meilleure capacité d'adhésion que la souche sauvage, probablement dû à l'augmentation de l'exposition du pilus SpaCBA (Lebeer *et al.*, 2012a). Ainsi, il est fortement suggéré que l'adhésion entre le pilus SpaCBA de LGG et les cellules épithéliales de l'intestin comme les cellules Caco-2 influencent la durée de résidence de LGG dans l'intestin humain et ainsi son pouvoir probiotique. En effet, Lebeer *et al.* (2012) ont montré que le pilus SpaCBA module la production de cytokines par les cellules Caco-2. Le mutant *spaCBA* est associé à une surexpression des marqueurs pro-inflammatoires comme l'interleukine 8 (IL-8) ou encore le facteur de nécrose tumorale (TNF ou tumoral necrosis factor) et à une diminution de l'expression des marqueurs anti-inflammatoires comme l'interleukine-10 (IL-10). Le mutant *welE*, sans EPS, présente, quant à lui, une diminution de l'expression de l'IL-8 (Lebeer *et al.*, 2012a). La présence de pili SpaCBA à la surface de LGG semble nécessaire pour moduler positivement l'inflammation chez l'hôte.

Un autre facteur clé permettant d'expliquer le pouvoir probiotique de LGG est sa capacité à participer à l'adhésion avec les cellules de l'immunité (macrophages ou cellules dendritiques) pour protéger l'hôte. Une étude montre le rôle clé du pilus dans l'adhésion de LGG avec les macrophages (Vargas García *et al.*, 2015). En effet, un mutant *spaCBA*, sans pili, a tendance à diminuer l'adhésion de LGG aux macrophages alors qu'un mutant *welE*, sans EPS, a tendance à augmenter cette adhésion. En adhérant aux macrophages grâce à son pilus SpaCBA, LGG exerce son pouvoir anti-inflammatoire en augmentant la production d'IL-10 et en diminuant la production d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire (Vargas García *et al.*, 2015). LGG est également impliquée dans l'adhésion avec les cellules dendritiques de l'immunité (Tytgat *et al.*, 2016b). Les cellules dendritiques possèdent des récepteurs de type lectine à leur surface appelés DC-SIGN. Tytgat *et al.* (2016b) ont montré que la glycosylation du pilus SpaCBA permet l'adhésion de LGG aux cellules dendritiques grâce à la reconnaissance entre les molécules de mannose et de fucose présentes sur le pilus et les récepteurs DC-SIGN présents à la surface des cellules. Une forte exposition et une meilleure accessibilité des pili améliorent l'interaction entre LGG et les cellules dendritiques. Selon les auteurs, il semblerait que le pilus ne joue pas un rôle immunologique en tant que tel, mais facilite l'effet immunologique d'autres structures de surface en favorisant le contact entre ces composés et les cellules immunitaires de l'hôte (Segers & Lebeer, 2014; Vargas García *et al.*, 2015).

Grâce à la présence de son pilus SpaCBA, LGG interagit avec de nombreuses cellules comme les cellules épithéliales de l'intestin (Caco-2) et différentes cellules de l'immunité comme les macrophages ou les cellules dendritiques (Lebeer *et al.*, 2012a; Vargas García *et al.*, 2015; Tytgat *et al.*, 2016b). Des études de SMFS ont permis de montrer que les propriétés des pili SpaCBA pour contrôler l'adhésion de LGG ont lieu via un mécanisme de type « fermeture éclair » impliquant les sous-unités SpaC (Tripathi *et al.*, 2012b, 2013). La sous-unité SpaC localisée à l'extrémité du pilus, facilite le contact initial entre LGG et les cellules hôtes. Enfin, les sous-unités SpaC réparties tout le long du pilus peuvent établir des contacts plus intimes avec l'hôte (Tripathi *et al.*, 2013).

5. Aliments fonctionnels contenant des probiotiques et réglementation

En raison de leurs nombreux effets bénéfiques sur la santé de l'Homme, les bactéries probiotiques sont de plus en plus incorporées dans des produits alimentaires commercialisés. Les aliments à base de bactéries probiotiques représentent 60 à 70 % du marché global des aliments fonctionnels (Tripathi & Giri, 2014). Une analyse estime à 28,8 milliards de dollars le marché mondial industriel des bactéries probiotiques en 2015 (De Prisco & Mauriello, 2016). Les produits laitiers comme les yaourts et les laits fermentés à boire sont les aliments contenant des bactéries probiotiques les plus populaires (Sánchez *et al.*, 2012). D'autres produits comme les jus de fruit et les produits à base de chocolat peuvent être également être de bons candidats (Burgain *et al.*, 2011).

Depuis quelques années, le marché probiotique européen est affecté puisque l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA ou European Food Safety Authority) a publié une réglementation (réglementation 1924/2006) sur les allégations nutritionnelles et de santé dans les aliments (European Commission, 2006). Une allégation santé est définie comme « toute revendication qui stipule, suggère ou implique qu'il existe une relation entre une catégorie d'aliments, un aliment ou l'un de ses constituants et la santé » (European Commission, 2006). Pour que les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé de l'homme soient acceptés comme allégations santé, les revendications santé doivent être évaluées par les institutions de réglementation comme l'EFSA. La procédure d'évaluation d'une allégation santé est présentée de manière simplifiée dans la

Erreur ! Source du renvoi introuvable.. De 2005 à 2013, le groupe d'experts de l'EFSA sur les

Synthèse bibliographique

roduits diététiques, la nutrition et les allergies a analysé de nombreuses demandes d'allégation santé. L'objet de ces demandes a été considéré, à 78 %, comme susceptible d'être bénéfique pour la santé de l'Homme et notamment sur la santé intestinale, mais le manque de données scientifiques a fait que ces allégations santé ont été toutes rejetées (Binnendijk & Rijkers, 2013).

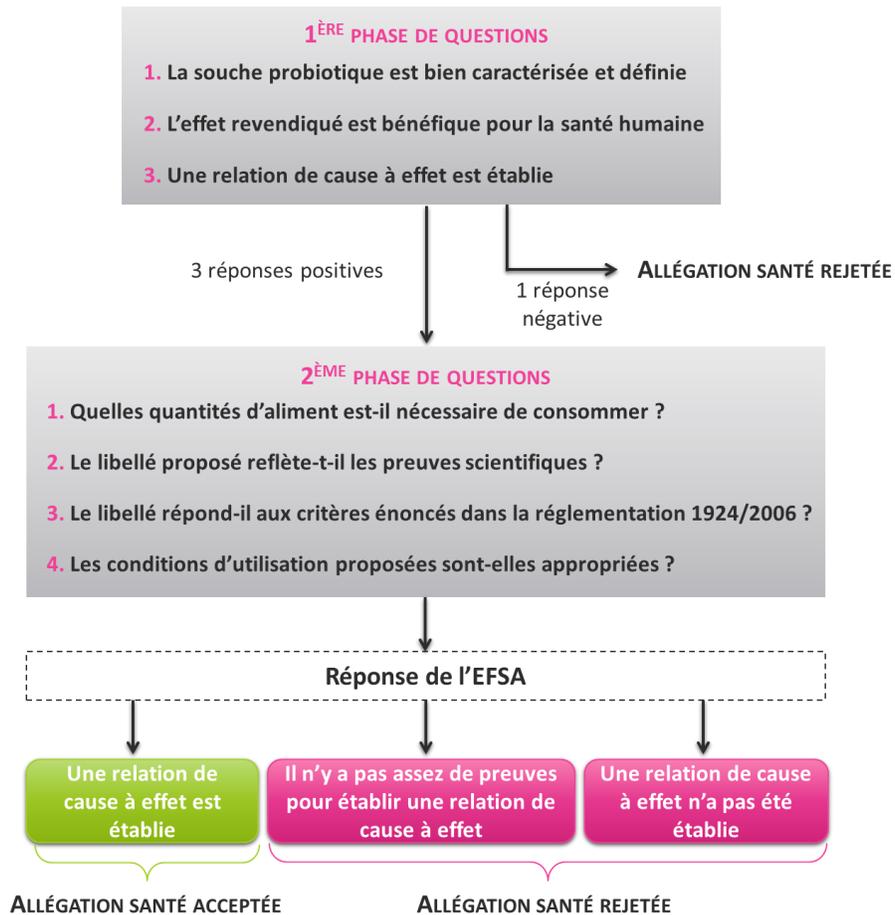


Figure 7 : Processus simplifié d'évaluation des allégations santé par l'EFSA

Les allégations santé sont maintenant très difficiles à obtenir. Pour résumer, pour qu'une allégation santé revendiquant les effets probiotiques d'une souche bactérienne soit acceptée, il faut que la souche probiotique soit bien caractérisée, que l'effet revendiqué soit prouvé par des données scientifiques et plus précisément par des études cliniques chez l'Homme et qu'une relation de causalité entre la consommation de l'aliment et les avantages pour la santé chez l'homme soit également démontrée (Verhagen et Van Loveren, 2016). Depuis 2006, seule une allégation santé prônant l'effet probiotique de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus*

thermophilus sur la digestion du lactose a été acceptée par l'EFSA (EFSA, 2010). Ces deux souches sont celles retrouvées dans le yaourt.

L'obtention des allégations santé est devenue un véritable défi scientifique, bien que le nombre d'articles sur les bactéries probiotiques ne cesse d'augmenter (**Figure 8**). L'un des principaux défis consiste à préserver la viabilité et la fonctionnalité bactérienne pendant toute la durée de conservation du produit puis pendant le tractus digestif pour que celles-ci atteignent leur site d'action.

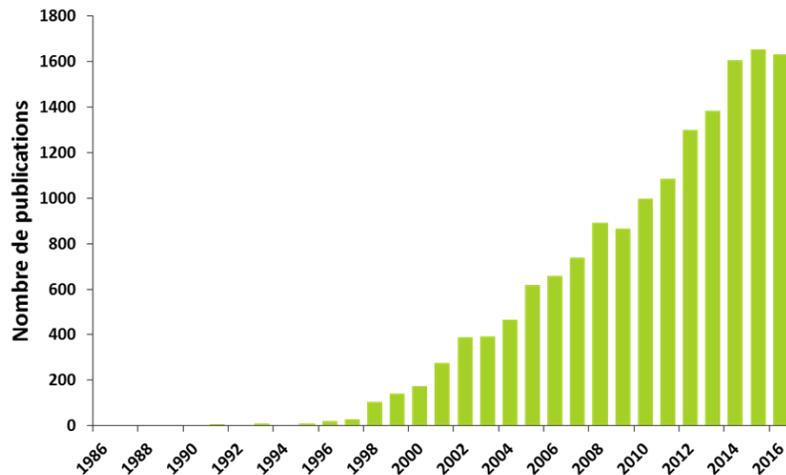


Figure 8 : Nombre de publications sur les bactéries probiotiques de 1986 à 2016 (source : Pubmed, juin 2017)

De nombreuses bactéries sont incorporées dans des produits alimentaires et notamment les produits laitiers. Néanmoins, une perte de viabilité est souvent observée lors de la conservation du produit (Shah *et al.*, 1995; Blanchette *et al.*, 1996; Ding & Shah, 2008; Tripathi & Giri, 2014). Par exemple, pendant cinq semaines de stockage réfrigéré de cinq yaourts commerciaux contenant *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium bifidum*, une diminution de la viabilité de ces deux souches a été observée (Shah *et al.*, 1995). Après cinq semaines de stockage, une perte totale de la viabilité de *B. bifidum* a été observée pour tous les yaourts. Les mêmes observations ont été faites pour *L. acidophilus*, mais pour deux yaourts seulement. En effet dans les trois autres yaourts, la viabilité était maintenue à des concentrations supérieures à 10^6 UFC/g. Dans les produits laitiers, la diminution du pH et l'accumulation de substances inhibitrices, comme l'acide lactique produit lors de la fermentation, sont les principaux facteurs identifiés comme étant responsables de la perte de viabilité des bactéries (Shah, 2000). Une diminution de viabilité a également été observée dans

Synthèse bibliographique

d'autres produits laitiers tels que les fromages (Blanchette *et al.*, 1996; Gobbetti *et al.*, 1998; Amine *et al.*, 2014) et dans de nombreux produits alimentaires comme le chocolat noir (Laličić-Petronijević *et al.*, 2015) et les jus de fruits (Saarela *et al.*, 2006; Ding & Shah, 2008). Au cours de la digestion, une diminution de viabilité des bactéries probiotiques au cours du transit gastro-intestinal est également bien documentée (Doherty *et al.*, 2012; Burgain *et al.*, 2013a; Jantzen *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2015). Par exemple, une grande perte de viabilité pour certaines souches (*L. rhamnosus* GG, *L. reuteri* et *Bifidobacterium* BB-12) a été observée au cours de la digestion gastrique simulée. Cette diminution de viabilité serait vraisemblablement due à l'acidité gastrique, ainsi qu'à la présence d'enzymes digestives et à la présence de sels biliaires (Charteris *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 2012). Toutefois, ces bactéries restent stables dans les conditions physico-chimiques de l'intestin grêle (Charteris *et al.*, 1998; Jantzen *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2015).

Dans la plupart des cas, les bactéries probiotiques exercent leur activité au niveau de l'intestin. Pour cela, il est préférable que les bactéries arrivent viables et fonctionnelles au niveau de leurs sites d'action. Cependant les bactéries perdent de leur viabilité au cours du stockage du produit et au cours de la digestion. Il est donc nécessaire de trouver une solution pour remédier à ces problèmes de survie pour que les bactéries probiotiques puissent exercer leurs effets bénéfiques au niveau de l'intestin. La solution trouvée devra permettre de faciliter l'obtention d'allégation santé par l'EFSA.

Une solution envisagée pour palier cela est la microencapsulation. La définition de la microencapsulation, ses enjeux et ses objectifs ainsi que les différentes techniques d'encapsulation sont détaillées dans la deuxième partie de cette synthèse bibliographique.

II. MICROENCAPSULATION DES BACTERIES DANS DES MATRICES LAITIERES

1. Définition et objectifs

L'encapsulation est un procédé par lequel des substances sont piégées au sein d'un matériau dispersé en vue de leur immobilisation, de leur protection, de leur libération de manière contrôlée et de leur fonctionnalisation (Vandamme *et al.*, 2007). Il existe de nombreuses raisons d'encapsuler des ingrédients avant leur introduction dans des produits alimentaires. Cela permet tout d'abord d'incorporer les ingrédients dans la matrice alimentaire sans nuire aux qualités de l'ingrédient. L'encapsulation permet également de protéger l'ingrédient contre les dégradations chimiques, physiques ou biologiques, de masquer une odeur ou de délivrer l'ingrédient au niveau de son site d'action. Elle permet aussi d'améliorer le stockage de l'ingrédient et sa durée de vie dans le produit alimentaire (McClements, 2012). L'encapsulation peut également permettre d'éviter d'affecter les propriétés de la matrice alimentaire. Par exemple, l'encapsulation d'une souche productrice d'acide permet de retenir cet acide à l'intérieur de la particule et éviter de donner un défaut de goût à l'aliment.

L'encapsulation de bactéries est une technique très utilisée pour piéger et préserver la viabilité des bactéries depuis leur incorporation dans le produit alimentaire jusqu'à leur consommation et leur passage à travers le tractus gastro-intestinal (De Prisco & Mauriello, 2016). En effet, pendant la période de production jusqu'à la consommation d'un produit alimentaire, les bactéries contenues dans le produit ont besoin d'être protégées contre différents mécanismes délétères rencontrés lors : de la production comme la chaleur et le cisaillement (i), du séchage comme la déshydratation dans le cas des produits secs (ii), du stockage des produits alimentaires (iii) et du transit gastro-intestinal comme le pH acide rencontré dans l'estomac et la présence de sels biliaires dans l'intestin grêle (iv) (Manojlović *et al.*, 2010). Différents types de problèmes se posent lors de l'encapsulation de bactéries. Tout d'abord, les bactéries ont une taille assez importante (de 1 à 5 μm), ce qui exclut automatiquement les techniques de nanoencapsulation. Une autre difficulté est le maintien de leur viabilité qui est déterminé par le choix de la méthode de microencapsulation. Les différentes techniques d'encapsulation couramment employées pour encapsuler les bactéries probiotiques sont

Synthèse bibliographique

l'émulsification, l'extrusion, le séchage par atomisation ou encore l'enrobage par lit fluidisé. Dans la littérature, de nombreuses revues ont montré le potentiel de la microencapsulation dans l'amélioration de la survie des bactéries au cours de la fabrication et du stockage du produit ainsi qu'au cours de la digestion (Anal & Singh, 2007; Burgain *et al.*, 2011; Cook *et al.*, 2012; Tripathi & Giri, 2014).

En fonction des techniques d'encapsulation utilisées, différents types de microparticules peuvent être produites : des microparticules de types matrice, réservoir ou matrice enrobée (**Figure 9**).

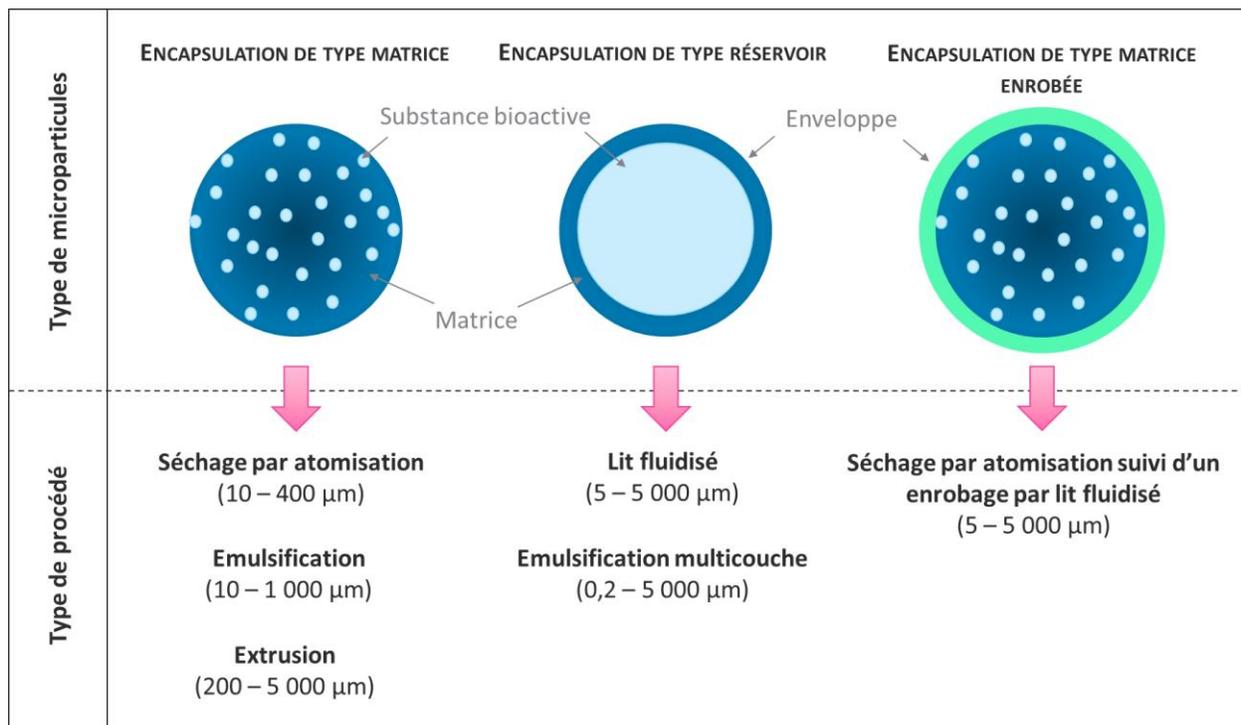


Figure 9 : Architecture des microparticules produites selon le type de procédé

Les microparticules de type réservoir sont composées d'une enveloppe entourant la substance bioactive à encapsuler. Pour les microparticules de type matrice, la substance bioactive est dispersée dans toute la matrice d'encapsulation. La substance bioactive peut être dispersée sous forme de fines gouttelettes ou distribuée de façon homogène dans toute la matrice. Les microparticules peuvent également mixer les deux types de matrice, on parle alors de type matrice enrobée. Le type matrice concerne spécifiquement les procédés d'encapsulation comme le séchage par atomisation, l'émulsification ou l'extrusion. Le type réservoir concerne plutôt les procédés d'encapsulation comme le lit fluidisé ou l'émulsification multicouche. Le type matrice enrobée

concerne une microparticule de type matrice qui a ensuite été enrobée par un procédé d'enrobage par lit fluidisé avec un autre matériau pour former un enveloppe entourant la microparticule.

Les matériaux utilisés pour encapsuler les bactéries probiotiques sont nombreux. Pour pouvoir les utiliser dans les produits alimentaires, ils doivent être reconnus comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe). Les polymères couramment utilisés sont des polysaccharides comme l'alginate, le chitosan, l'amidon, le κ -carraghénane, la gomme gellane, la gomme xanthane, la gomme arabique, des pectines, des protéines comme la gélatine et les protéines du lait (Burgain *et al.*, 2011; Sarao & Arora, 2017). Cette étude bibliographique s'intéresse plus particulièrement aux protéines du lait. Les protéines du lait possèdent des propriétés structurales et physicochimiques très intéressantes qui peuvent être exploitées pour produire des microparticules telles que leur capacité de lier des ions ou des petites molécules, leurs excellentes propriétés de surface et d'auto-assemblage, leur aptitude à la gélification, la capacité du gel protéique à gonfler en fonction du pH (très utile pour contrôler la libération des composés actifs), leur capacité d'interaction avec les composés actifs, leur biocompatibilité et leur biodégradabilité permettant de contrôler la libération du bioactif et de promouvoir sa biodisponibilité (Livney, 2010; Tavares *et al.*, 2014). Ces propriétés permettent de produire des microparticules ayant des propriétés fonctionnelles cibles.

2. Les protéines laitières utilisées pour l'encapsulation

Le lait de vache contient entre 30 et 35 g.L⁻¹ de protéines. Les protéines du lait sont divisées en deux groupes : les caséines et les PS.

2.1. Les caséines

La fraction protéique majeure du lait (entre 24 et 28 g/L) est composée des caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ (**Tableau 3**). Ces protéines ont la capacité de précipiter à pH 4,6 (pH isoélectrique des micelles de caséines) et sont considérées comme des protéines non structurées (Fox, 2008). Les caséines sont organisées en superstructures sphériques et volumineuses appelées micelles. Une micelle présente un diamètre moyen de 150 nm, pouvant aller de 50 à 500 nm. Sur la base de la matière

Synthèse bibliographique

sèche, les micelles sont composées de 94 % de caséines et de 6 % de minéraux, principalement du phosphate de calcium (Tavares *et al.*, 2014).

Tableau 3 : Composition protéique du lait de vache (d'après Fox, 2008; Livney, 2010)

		Concentration dans le lait (g/l)	Masse moléculaire (kDa)
Caséines		26 - 34	
	Caséine α_{s1}	12 - 15	22,1 - 23,7
	Caséine α_{s2}	3 - 4	25,2 - 25,4
	Caséine β	9 - 11	23,9 - 24,1
	Caséine κ	2 - 4	19,0
PS		3,8 - 7	
	β-lactoglobuline (β-LG)	2 - 4	18,3
	α-lactalbumine (α-LA)	1 - 1,5	14,2
	Sérum albumine bovine (BSA)	0,1 - 0,4	66,3
	Immunoglobulines (Ig)	0,6 - 1,0	146,0 - 1 030,0
	Lactoferrine (Lf)	0,1	80,0

La structure interne des micelles de caséines est très controversée et n'est toujours pas établie avec certitude. De nombreux modèles ont été proposés et affinés au cours des années (Schmidt, 1982; Walstra, 1990; Holt, 1992; Horne, 1998; McMahon & Oommen, 2008; Bouchoux *et al.*, 2010; Dalgleish, 2011; de Kruif *et al.*, 2012). L'évolution des modèles proposés pour la micelle de caséines est représentée dans la **Figure 10**. Au départ, l'hypothèse de l'organisation en submicelles a été émise (Schmidt, 1982; Walstra, 1990). Dans ce cas, la micelle est considérée comme un assemblage de submicelles liées entre elles par des ponts de phosphate de calcium colloïdal permettant la cohésion de la micelle. Au cœur de la micelle se trouve des submicelles composées de caséines α et β et à la périphérie de la micelle, se trouvent des submicelles composées de caséines α et κ (**Figure 10a et b**). Plus tard, d'autres modèles ont été proposés. Holt, (1992) propose une micelle où les chaînes de caséines sont dépliées et fortement hydratées, liant les nanoclusters de phosphate de calcium (**Figure 10c**). Il décrit une micelle présentant des interactions spécifiques entre caséines grâce à des interactions hydrophobes avec les nanoclusters de phosphate de calcium, rendant la micelle plus poreuse (**Figure 10d**). Par la suite, la micelle est représentée comme une structure de type « éponge », fortement hydratée et contenant des régions très riches en protéines (McMahon & Oommen, 2008; Bouchoux *et al.*, 2010) (**Figure 10e et f**). Le modèle le plus récent représente la structure interne de la micelle avec des canaux remplis d'eau, stabilisés

grâce à des interactions entre les caséines β et les portions hydrophobes des nanoclusters (Dagleish, 2011; de Kruif *et al.*, 2012) (**Figure 10g et h**).

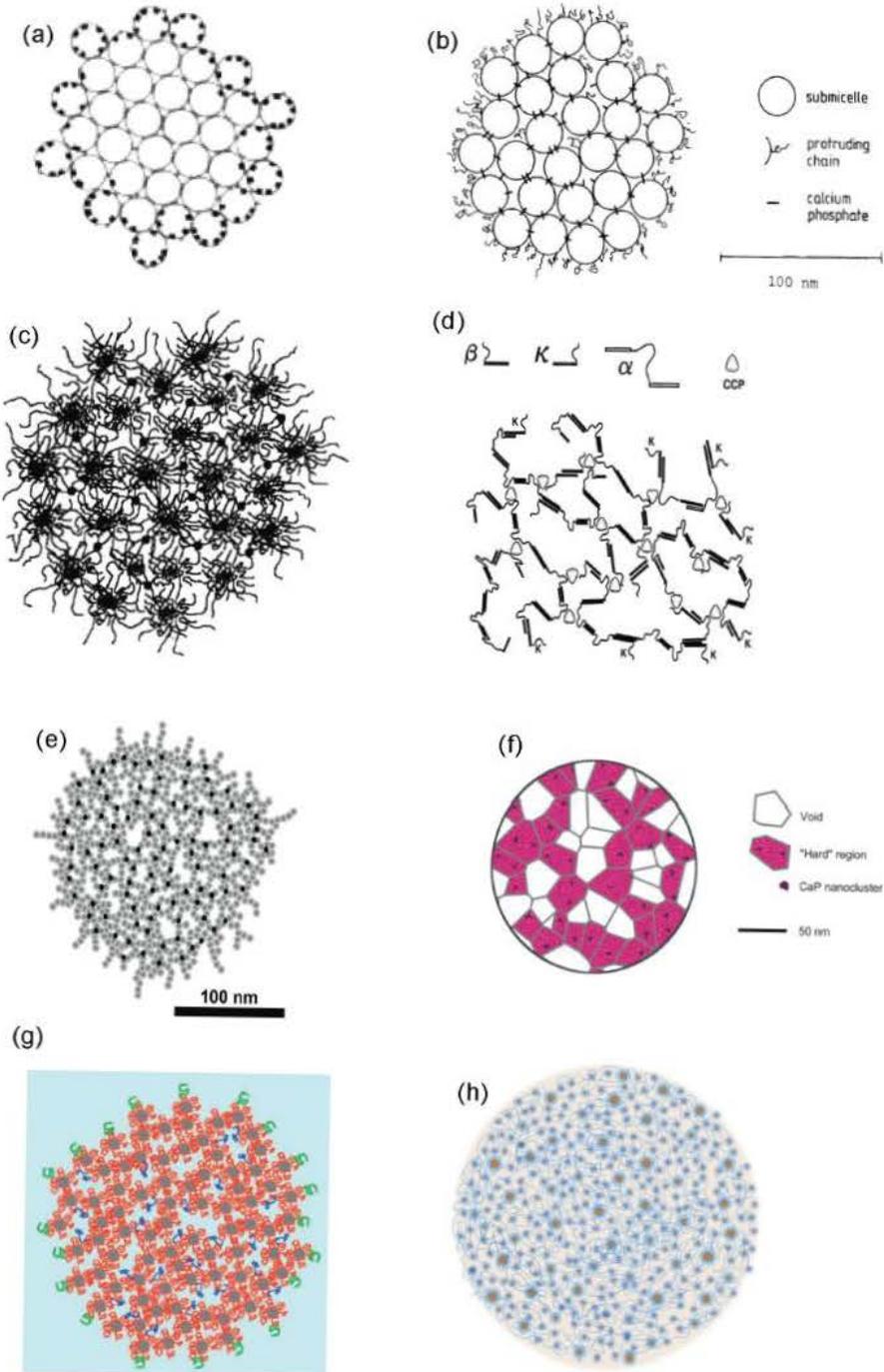


Figure 10 : Modèles de la structure des micelles de caséines proposés au cours des dernières années

Synthèse bibliographique

Malgré les controverses sur la structure des micelles de caséines, il est bien établi que la surface des micelles est composée majoritairement de caséines κ . La caséine κ possède une partie C-terminale hydrophile, chargée négativement qui permet la stabilité stérique et électrostatique des micelles de caséines dans le lait frais.

2.2. Les protéines solubles

Les PS issues du lactosérum représentent 20 % des protéines totales du lait, soit une concentration d'environ 5 à 7 g/l. Les PS comprennent la β -LG, l' α -LA, la BSA, les immunoglobulines (Ig) et la lactoferrine (Lf) (**Tableau 3**). Toutes ces protéines ont la particularité d'être solubles au point isoélectrique des caséines, soit à pH 4,6.

La β -LG est la protéine majoritaire du lactosérum avec une concentration de 2 à 4 g/l. Cette protéine possède 162 résidus d'acides aminés par monomère et une masse moléculaire de 18,3 kDa. Le pH isoélectrique de cette protéine est de 5,2 (Tavares *et al.*, 2014). Elle possède une structure secondaire composée de huit feuillets β antiparallèles qui forment une poche hydrophobe, appelée calice (ou calyx), et de trois hélices α (Monaco *et al.*, 1987; Brownlow *et al.*, 1997) (**Figure 11A**). Elle possède également deux ponts disulfures et trois groupements thiols libres (Livney, 2010). Elle est généralement retrouvée sous forme de dimère au pH natif du lait (pH 6,7). La présence d'une poche hydrophobe permet à la β -LG d'exercer son rôle de transporteur. En effet, cette protéine est capable de lier plusieurs molécules hydrophiles et hydrophobes telles que le rétinol, le cholestérol, les acides gras, la vitamine D3, la mucine et le lactose grâce à la présence de cette poche (Kontopidis *et al.*, 2002, 2004; Dominguez-Ramirez *et al.*, 2013; Çelebioğlu *et al.*, 2015).

L' α -LA est la deuxième protéine majoritaire du lactosérum avec une concentration de 1 à 1,5 g/l. C'est une petite métalloprotéine globulaire composée de 123 résidus d'acides aminés et avec une masse moléculaire de 14,2 kDa. Le pH isoélectrique de cette protéine est compris entre 4,3 et 4,7 (Tavares *et al.*, 2014). Sa structure est très proche de celle du lysozyme (**Figure 11B**). Elle possède quatre ponts disulfures (Edwards & Jameson, 2014) et contrairement à la β -LG, elle ne contient pas de groupement thiol libre.

La BSA représente moins de 5 % des PS bovines avec une concentration entre 0,1 à 0,4 g/l. C'est une protéine plus grosse, composée de 582 résidus d'acides aminés, avec une masse moléculaire de 66,3 kDa. Le pH isoélectrique de cette protéine est de 5,0 (Tavares *et al.*, 2014). La BSA a la particularité de posséder de nombreux ponts disulfures (17 au total) et un groupement thiol libre (Edwards & Jameson, 2014). Sa structure est présentée dans la **Figure 11C**.

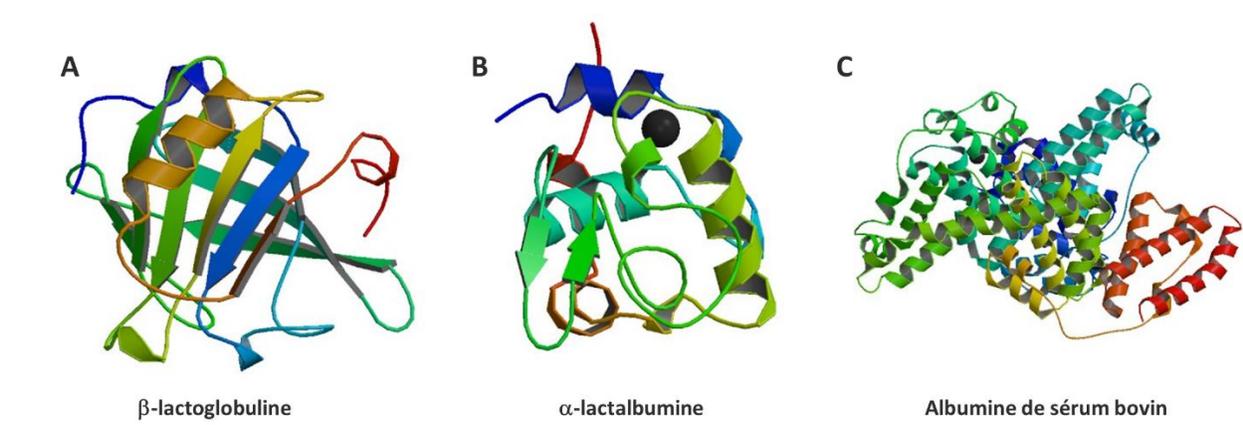


Figure 11 : Structures des protéines majeures du lactosérum : β -lactoglobuline bovine (RCSB PDB code 1BEB) (Brownlow *et al.*, 1997) (A) ; α -lactalbumine bovine (RCSB PDB code 1ALC) (Pike *et al.*, 1996) (B) et sérum albumine bovine (RCSB PDB code 3V03) (Majorek *et al.*, 2012)

2.3. Utilisation des protéines du lait pour l'encapsulation

Les protéines du lait sont largement disponibles, peu coûteuses, naturelles et reconnues comme des matériaux GRAS avec un très bon potentiel nutritionnel. Leurs nombreuses propriétés fonctionnelles et structurales font d'elles des matériaux très appropriés pour véhiculer des composés bioactifs (Livney, 2010; Tavares *et al.*, 2014). Leurs capacités à se lier, à former des émulsions ou des gels sont régulièrement utilisées pour piéger des composés bioactifs. En ce qui concerne l'encapsulation des bactéries probiotiques, leur aptitude à la gélification est très étudiée car elle permet la formation de microparticules assez grandes pour contenir des bactéries. Les gels protéiques peuvent être formés soit par coagulation (enzymatique ou acide) des caséines, soit par gélification des PS ou des protéines totales du lait induites par traitement thermique (Livney, 2010).

2.3.1. Coagulation des caséines

Le premier phénomène exploité pour encapsuler des bactéries probiotiques grâce à la gélification des caséines repose sur la coagulation du lait. La coagulation du lait est à la base d'une multitude de produits laitiers comme les yaourts et les fromages. C'est un changement irréversible de l'état liquide du lait vers l'état gélifié, par l'action d'enzymes (présure) ou par acidification (avec de l'acide gluconique – GDL ou de l'acide lactique, issu du métabolisme de bactéries lactiques) qui permet aux caséines de former des gels. La présure utilisée lors de la coagulation enzymatique est composée d'enzymes actives comme la chymosine, la pepsine ou un mélange des deux. Dans la littérature, l'encapsulation des bactéries probiotiques a été réalisée grâce à la coagulation enzymatique, c'est pour cela que la coagulation enzymatique des caséines va être détaillée ci-dessous. Plusieurs enzymes peuvent être utilisées pour induire la coagulation des caséines : la chymosine et la transglutaminase. Le mécanisme de ces deux enzymes est détaillé successivement dans ce manuscrit.

La coagulation enzymatique par action de la chymosine peut être divisée en deux phases (**Figure 12**) (Carlson *et al.*, 1987; Lucey, 2008) :

(1) Réaction enzymatique : hydrolyse de la caséine κ .

Lors de cette phase enzymatique, la chymosine hydrolyse spécifiquement la caséine κ au niveau de la liaison peptidique Phe105-Met106. Cela conduit à la libération d'un peptide hydrophile, chargé négativement, appelé caséinomacropéptide (CMP) et à la formation de para-caséine κ insoluble, associée aux micelles de caséines. La libération du CMP conduit donc à la déstabilisation des micelles par diminution des répulsions électrostatiques et stériques entre ces dernières.

(2) Réaction non enzymatique : agrégation des micelles de caséines déstabilisées et formation du réseau

Cette phase correspond à la coagulation proprement dite. Une fois déstabilisées, les micelles de caséines s'agrègent grâce à la diminution des forces répulsives (électrostatiques et stériques) et à la mise en place de liaisons hydrophobes. Ensuite, les micelles s'organisent pour former un réseau compact puis un gel par la mise en place de liaisons phosphocalciques et de ponts disulfures entre les para-caséines κ .

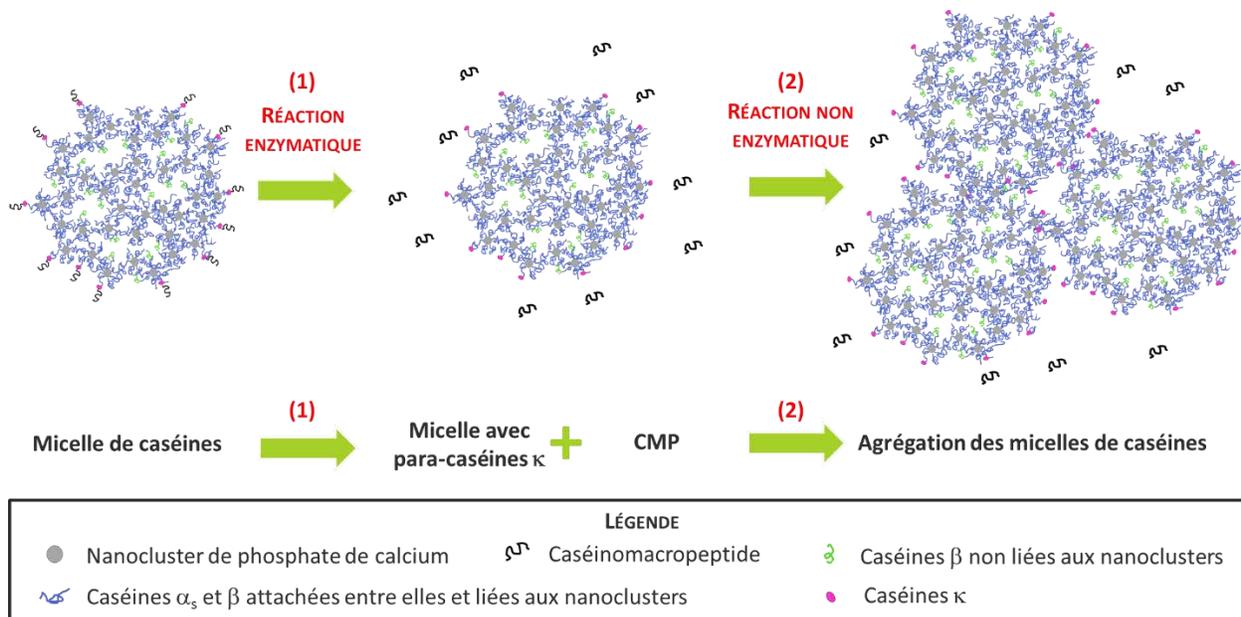


Figure 12 : Coagulation enzymatique des micelles de caséines

La coagulation enzymatique des caséines a déjà été utilisée pour microencapsuler LGG, *L. paracasei* et *B. lactis* dans des matrices composées uniquement de protéines laitières (Heidebach *et al.*, 2009a; Burgain *et al.*, 2013a). Elle permet d'obtenir de très bon taux d'encapsulation et de produire des microparticules insolubles dans des milieux aqueux, ce qui améliore la stabilité des microparticules dans les aliments. L'avantage de ces microparticules constituées de caséines ou d'un mix de caséines et de PS est à la fois leur résistance à l'action de la pepsine lors de la digestion gastrique et leur hydrolyse complète dans les conditions intestinales (Burgain *et al.*, 2015a).

Un autre mécanisme de gélification, basé sur la réticulation des caséines par la transglutaminase, a également été appliqué pour le piégeage des probiotiques (Heidebach *et al.*, 2009b, 2010). La transglutaminase est une transférase qui forme des liaisons peptidiques inter et intramoléculaires respectivement dans et entre les protéines par réticulation des résidus d'acides aminés glutamine et lysine (DeJong & Koppelman, 2002). Les caséines sont des bons substrats pour la transglutaminase du fait de l'accessibilité des acides aminés glutamine et lysine (Kurth & Rogers, 1984). Tout comme pour les microparticules produites par la coagulation à la chymosine, les microparticules issues de l'action de la transglutaminase sont également insolubles dans les milieux aqueux.

2.3.2. Gélification des PS

La gélification des PS peut également être utilisée pour encapsuler les bactéries probiotiques. Les PS sont des protéines globulaires et le chauffage induit leur dénaturation et leur agrégation. A une concentration assez élevée ($\geq 6\%$), la gélification se produit au cours du traitement thermique ou pendant le refroidissement. La formation des gels et les propriétés de gélification des PS sont influencées par différents facteurs : le pH, la concentration en protéines, la force ionique, la température, la durée du traitement thermique, la concentration en sucres, en lipides et en cations divalents (Ca^{2+} par exemple) (Lucey, 2008).

D'une manière générale, la formation de gels à partir de PS est réalisée par traitement thermique. La gélification des PS induite par la chaleur se déroule en trois grandes étapes : la dénaturation des PS, l'agrégation des protéines et la gélification (Foegeding, 2006). Au cours du traitement thermique, les PS subissent des changements conformationnels induisant une perte de leur structure native et un déploiement des protéines. Ce changement de structure permet aux protéines d'exposer leurs groupements ou sites réactifs (par exemple régions internes hydrophobes). Cela induit des interactions intermoléculaires et une agrégation des protéines (Foegeding, 2006; Lucey, 2008). La gélification des PS se fait grâce à la combinaison de forces covalentes (formation de ponts disulfures) et de forces non covalentes (formation de liaisons hydrogènes, d'interactions hydrophobes et d'interactions électrostatiques) qui lient les monomères de protéines ensemble et réticulent le réseau (Foegeding, 2006).

Les gels de PS peuvent également se former lors de l'étape de refroidissement. Pour cela, deux étapes se succèdent. Tout d'abord, les protéines subissent un traitement thermique à faible force ionique et loin de leur pH isoélectrique. Puis, elles se refroidissent sans gélification du fait de l'existence de répulsions électrostatiques intermoléculaires. Il est essentiel lors de cette étape, que la concentration en protéines soit inférieure à la concentration critique de gélification. Ensuite, la gélification se fait à faible température soit par addition de cations mono- ou polyvalents comme le calcium, soit en acidifiant jusqu'au pH isoélectrique, soit les deux, afin d'inhiber les répulsions électrostatiques (Lucey, 2008; Livney, 2010).

Différentes études rapportent l'utilisation de la gélification des PS pour encapsuler les bactéries probiotiques (Reid *et al.*, 2005, 2007, Doherty *et al.*, 2011, 2012). Les microparticules produites permettent la protection des bactéries contre l'acidité gastrique (Reid *et al.*, 2005; Doherty *et al.*,

2011, 2012), la pepsine gastrique (Doherty *et al.*, 2011) et la bile de l'intestin (Reid *et al.*, 2005; Doherty *et al.*, 2011). Une étude a également montré que l'encapsulation avec des gels de PS permet d'augmenter la survie des bactéries probiotiques lors de la production et du stockage de biscuits (Reid *et al.*, 2007).

3. Les procédés d'encapsulation

Il existe différentes méthodes pour encapsuler les bactéries avec des protéines du lait : l'émulsification, l'extrusion, l'enrobage par lit fluidisé et le séchage par atomisation.

Tableau 4 : Avantages et inconvénients des différents procédés d'encapsulation utilisés pour l'encapsulation de bactéries

Procédé d'encapsulation	Avantages	Inconvénients
Emulsification	<ul style="list-style-type: none"> • Microparticules sphériques • Microparticules de petite taille • Microparticules insolubles dans l'eau • Taux d'encapsulation élevé • Bonne survie des bactéries • Excellente résistance aux conditions gastriques • Extrapolation facile 	<ul style="list-style-type: none"> • Polydispersité • Perte de bactéries lors du drainage de l'huile • Présence d'une couche d'huile résiduelle à la surface des microparticules • Difficile à mettre en œuvre
Extrusion	<ul style="list-style-type: none"> • Microparticules de taille homogène • Facile à mettre en œuvre • Bonne survie des bactéries • Faible coût • Conditions douces assurant la viabilité des bactéries • Pas de dommage cellulaire des bactéries 	<ul style="list-style-type: none"> • Microparticules de grandes tailles • Extrapolation difficile
Séchage par atomisation	<ul style="list-style-type: none"> • Microparticules uniformes et sphériques • Facile à mettre en œuvre • Faible coût • Extrapolation facile • Forte reproductibilité • Rapide • Production de grandes quantités de poudre • Couramment utilisé en industrie • Grande quantité de microparticules produites 	<ul style="list-style-type: none"> • Microparticules de petites tailles • Température de séchage élevée • Cisaillement • Déshydratation des bactéries
Enrobage par lit fluidisé	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisation de faibles températures • Extrapolation aisée 	<ul style="list-style-type: none"> • Taille parfois très grande • Produit à encapsuler sous forme solide et non liquide

Synthèse bibliographique

Le principe de ces méthodes ainsi que leurs avantages et inconvénients pour l'encapsulation de bactéries seront détaillés dans cette partie et sont reportés dans le **Tableau 4**.

3.1. Emulsification

L'émulsification consiste à disperser le liquide contenant le composé à encapsuler dans un autre liquide immiscible. Le plus souvent il s'agit d'une solution aqueuse et d'une solution huileuse. La dispersion du liquide aqueux dans la solution huileuse conduit à la formation de fines gouttelettes. Dans le cas de l'encapsulation de bactéries, des systèmes à faible cisaillement sont préconisés pour limiter l'impact sur la viabilité des cellules.

Différentes bactéries ont déjà été encapsulées par émulsification en utilisant la gélification des protéines du lait (Heidebach *et al.*, 2009a; b; Burgain *et al.*, 2013a). L'encapsulation de LGG par émulsification grâce à la gélification des protéines du lait induite par l'action de chymosine a été réalisée par Burgain *et al.* (2013a). Pour encapsuler les bactéries avec cette technique, des solutions de protéines du lait et de chymosine ont été mélangées à une température inférieure à 10 °C pour permettre à la chymosine de cliver la caséine κ sans induire l'agrégation des micelles. La solution a ensuite été dispersée en fines gouttelettes dans la solution huileuse en maintenant une température initiale inférieure à 10 °C. Pour permettre la gélification des gouttelettes contenant les bactéries probiotiques, une rampe de température allant jusqu'à 40 °C a été effectuée pour permettre le rapprochement des caséines entre elles et la formation de microparticules insolubles (**Figure 13**).

Une autre enzyme peut aussi être utilisée pour produire des microparticules insolubles dans l'eau grâce à la gélification des protéines du lait, c'est la transglutaminase (Heidebach *et al.*, 2009b, 2010). Cette enzyme a été utilisée pour encapsuler *Lactobacillus paracasei* et *Bifidobacterium lactis* dans du caséinate de sodium (Heidebach *et al.*, 2009b, 2010). Pour cela, les bactéries ont été placées dans la solution protéique dans laquelle la transglutaminase est active et la solution a ensuite été dispersée dans de l'huile. L'augmentation de la température a permis la production de microparticules insolubles encapsulant les bactéries.

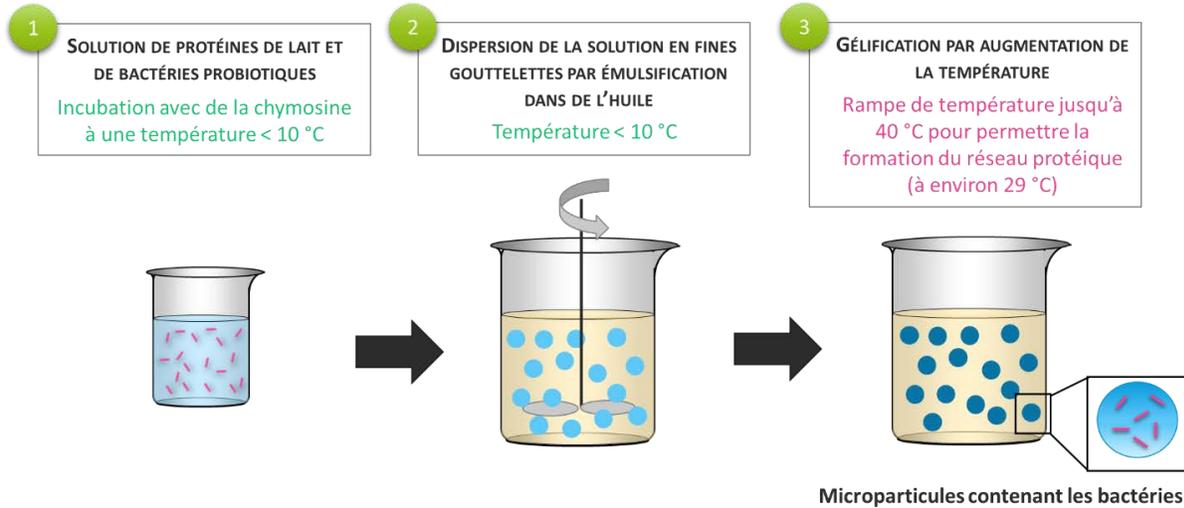


Figure 13 : Encapsulation de bactéries probiotiques par émulsification en utilisant la gélification des protéines de lait par l'action de la chymosine

L'encapsulation de bactéries par émulsification en utilisant la gélification des protéines du lait (avec de la chymosine ou de la transglutaminase) permet de produire des microparticules sphériques et insolubles dans l'eau, avec un taux d'encapsulation élevé et une très bonne résistance aux conditions gastriques. Cependant l'émulsification entraîne la production d'une large distribution de taille des microparticules. La production de grosses microparticules peut être néfaste d'un point de vue sensoriel car elles peuvent être facilement détectées par le consommateur lorsque celles-ci sont incorporées dans un aliment. De plus, la capacité de libération des petites microparticules est plus rapide que celle des grosses particules, ce qui peut être néfaste lorsque la libération est ciblée. Aussi, lors de la récupération des microparticules dans la phase huileuse, le drainage de l'huile peut entraîner la perte des bactéries qui se trouvent en surface de la particule. De plus, un autre inconvénient est la présence d'une fine couche d'huile résiduelle à la surface des microparticules, même après lavages (Burgain *et al.*, 2013a) (**Tableau 4**).

3.2. Extrusion

La méthode d'extrusion est très utilisée pour encapsuler les bactéries en raison de sa facilité, de son faible coût et de ses conditions douces garantissant une conservation optimale de la viabilité des bactéries (Krasaekoopt *et al.*, 2003). La microencapsulation de bactéries par extrusion consiste

Synthèse bibliographique

à projeter la solution contenant les cellules bactériennes et la matrice d'encapsulation à travers une buse à haute pression ou une aiguille. Une fois formées, les gouttelettes tombent directement dans une solution de durcissement contenant des cations, comme le calcium (**Figure 14**). La taille et la forme des gouttelettes dépendent respectivement du diamètre de l'aiguille et de la distance de chute libre (Bugarski *et al.*, 1994; Burgain *et al.*, 2011). Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle est difficilement extrapolable au niveau industriel en raison de la formation lente des microbilles. Aussi, les microparticules produites sont assez grosses (entre 200 à 5000 μm), ce qui peut poser des problèmes sensoriels lorsque les microparticules sont introduites dans un produit alimentaire (**Tableau 4**).

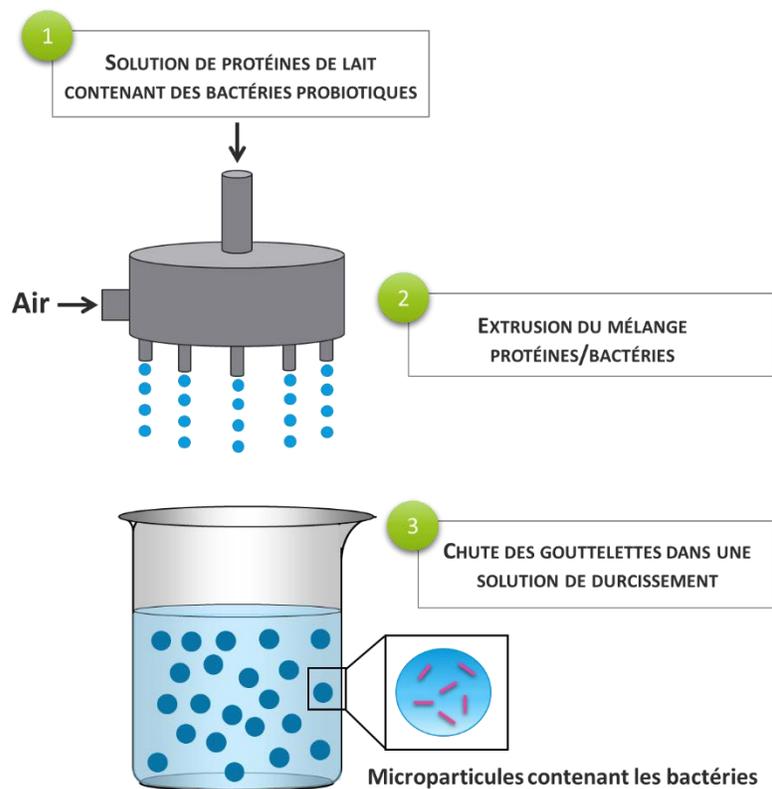


Figure 14 : Encapsulation de bactéries probiotiques par extrusion dans une matrice de protéines lactières

La plupart du temps, le polymère utilisé pour encapsuler les bactéries par extrusion est l'alginate (Sultana *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2002). Seulement quelques études ont utilisé des isolats de PS pour encapsuler des bactéries probiotiques avec cette méthode (Reid *et al.*, 2005; Doherty *et al.*, 2011, 2012). Par exemple, Doherty *et al.* (2011, 2012) ont encapsulé LGG dans des microparticules produites à partir d'une solution d'isolat de PS grâce à la technique d'extrusion. Pour cela, la

solution de protéines et de bactéries a été passée à travers une aiguille de 150 µm de diamètre et les gouttelettes ont été récupérées dans 250 ml de solution de durcissement (tampon acétate). L'extrusion n'a pas eu d'impact négatif sur la viabilité des bactéries et la viabilité a également été maintenue au cours de la digestion gastro-intestinale. En effet, les microparticules sont restées stables au pH acide de l'estomac et ont résisté à l'action de la pepsine, ce qui a permis de maintenir les bactéries viables à l'intérieur des microparticules. Par contre, les microparticules ont été désintégrées dans la solution intestinale, ce qui a permis de contrôler la libération de LGG dans l'intestin (Doherty *et al.*, 2011, 2012). Une autre étude utilise les isolats de PS pour encapsuler LGG. Cette fois-ci la solution de durcissement était du CaCl₂ (Reid *et al.*, 2005). L'extrusion a permis ici de protéger les bactéries contre le milieu acide de l'estomac et la présence des sels biliaires dans l'intestin.

3.3. Enrobage par lit fluidisé

Les méthodes d'encapsulation par enrobage permettent d'appliquer une couche externe de matériaux d'enrobage sur des systèmes particuliers provenant soit de méthodes d'encapsulation comme le séchage par atomisation, l'émulsification ou l'extrusion, soit d'un lyophilisat de bactéries (Burgain *et al.*, 2016). Dans tous les cas, l'échantillon à enrober doit être sous forme de poudre et non liquide. L'enrobage en lit fluidisé consiste à faire passer de l'air à travers un lit de particules à enrober pour les mettre en suspension. En parallèle de cela, le produit d'enrobage est pulvérisé de façon à former une membrane autour des particules en suspension. La plupart du temps, la couche d'enrobage ne se forme pas immédiatement, un grand nombre de passages successifs dans la zone de pulvérisation sont nécessaires. En même temps, la solidification de la couche d'enrobage se fait soit par séchage dans le cas d'une solution d'enrobage aqueuse, soit par refroidissement dans le cas d'un matériau d'enrobage fondu (El Mafadi & Poncelet, 2007). L'enrobage peut se faire différemment en fonction du positionnement de la buse de pulvérisation : pulvérisation par le haut, tangentielle ou par le bas. La pulvérisation par le bas est la plus adaptée pour l'enrobage de particules individuelles. En effet, le mouvement ascendant des particules et la direction de la pulvérisation permet un séchage rapide et une diminution du risque d'agglomération. Cette pulvérisation permet également d'éviter de sécher les gouttes avant leur dépôt sur les

Synthèse bibliographique

particules (Burgain *et al.*, 2016). L'exemple utilisé pour illustrer l'enrobage par lit fluidisé (**Figure 15**) présente la pulvérisation par le haut.

Une étude récente a porté sur la microencapsulation de *L. reuteri* DSM 20016 en lit fluidisé avec du lactosérum doux et de la gomme laque comme agent d'enrobage (Schell & Beermann, 2014). Tout d'abord, la culture bactérienne a été pulvérisée par le haut grâce à une buse bi-fluide dans le lit fluidisé en présence de lactosérum doux et de différents sucres, à une température de séchage de 50 °C. Ensuite, les microparticules formées ont été enrobées par pulvérisation d'une solution de gomme laque par le haut du lit fluidisé. Les microparticules produites permettent d'améliorer la tolérance de *L. reuteri* DSM 20016 à l'acidité et d'augmenter sa survie au cours du transit gastro-intestinal (Schell & Beermann, 2014).

La microencapsulation de bactéries par enrobage en lit fluidisé présente l'avantage d'utiliser de faibles températures, ce qui permet une bonne survie des bactéries lors du procédé. Ce procédé est également facilement extrapolable à l'échelle industrielle (**Tableau 4**).

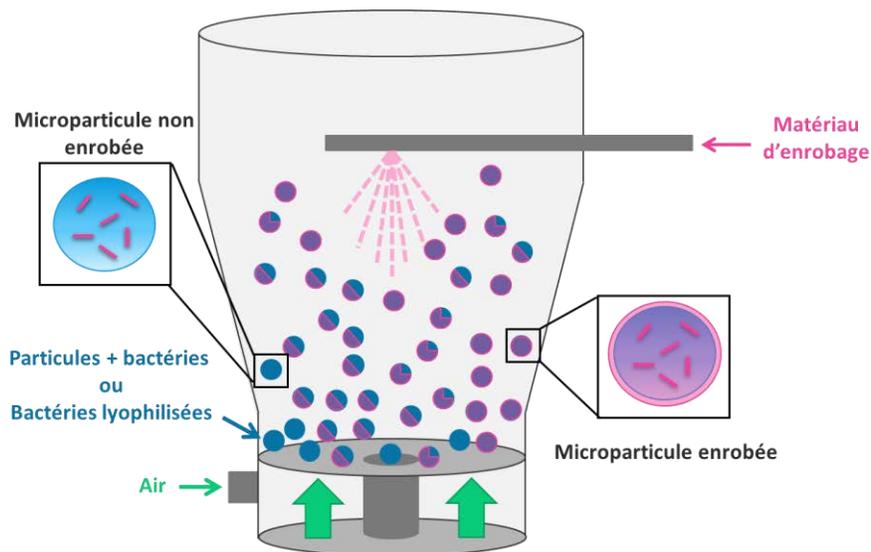


Figure 15 : Encapsulation de bactéries par enrobage en lit fluidisé

3.4. Séchage par atomisation

Le séchage par atomisation est un procédé très utilisé en industrie alimentaire pour la production de poudre. Ce procédé est très répandu pour encapsuler des bactéries. Le séchage par atomisation

peut être divisé en quatre grandes étapes (Broeckx *et al.*, 2016) (**Figure 16**). Tout d'abord, la solution liquide contenant les bactéries et la matrice d'encapsulation est pulvérisée en fines gouttelettes dans la chambre de séchage. Dans un second temps, les fines gouttelettes rentrent en contact avec de l'air chaud et sec. La troisième étape du procédé de séchage par atomisation consiste au séchage des gouttelettes et à la formation des particules. Pour finir, les particules solides sont séparées de l'air refroidi et humide, en utilisant par exemple un cyclone. La poudre est collectée dans un récipient placé à la sortie du cyclone.

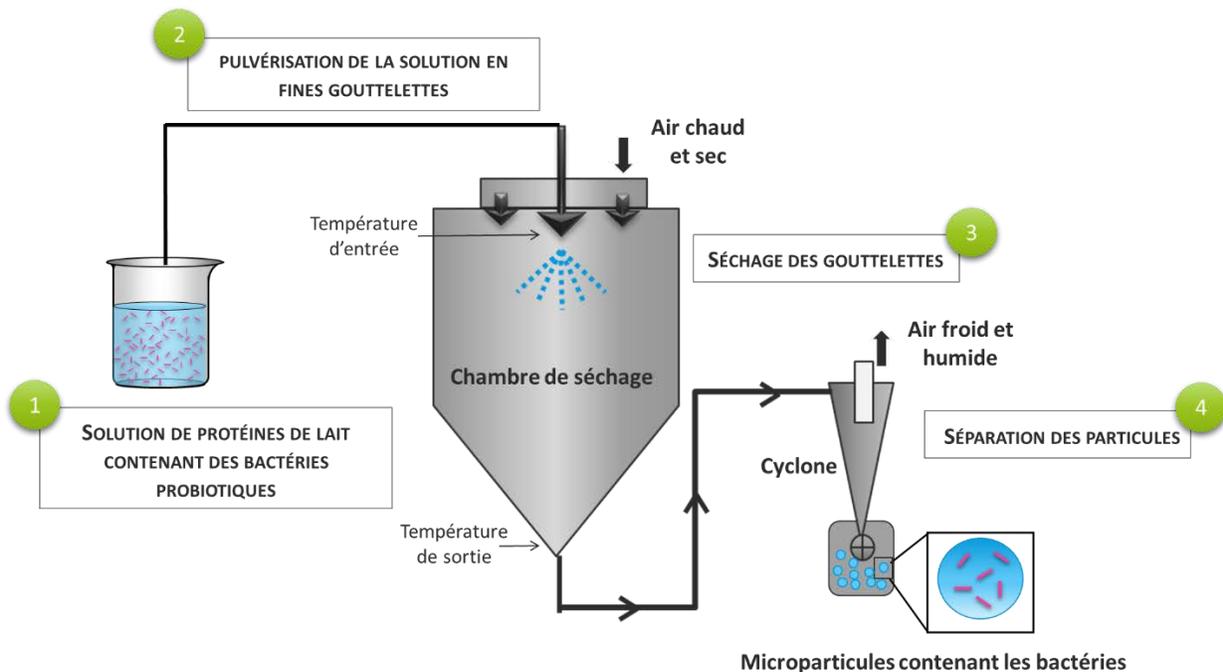


Figure 16 : Encapsulation de bactéries par séchage par atomisation dans une matrice de protéines lactières

Le séchage par atomisation présente de nombreux avantages comme un faible coût, une forte reproductibilité et une bonne rapidité du procédé. C'est aussi un très bon moyen d'incorporer des bactéries dans des produits laitiers. Ce procédé est facilement extrapolable à l'industrie et notamment agroalimentaire. Il permet la production d'importantes quantités de poudre en très peu de temps (**Tableau 4**). Les poudres produites sont sphériques, avec une forme et une distribution de taille uniforme (entre 10 et 400 μm), ce qui est favorable d'un point de vue sensoriel, si elles sont incorporées dans un aliment (Zuidam & Shimoni, 2010). Cependant, la capacité de protection des petites particules peut être inférieure à celle observée pour de grosses particules. Le principal inconvénient du séchage par atomisation dans le cadre de l'encapsulation de bactéries est

Synthèse bibliographique

l'utilisation d'un air très chaud (environ 200 °C) pour l'étape d'évaporation de l'eau qui peut s'avérer néfaste pour la survie des bactéries. Cependant même si cette température de séchage est très élevée, la température de la gouttelette n'excède pas 60 °C dans des conditions standards, car près de la gouttelette c'est la température de l'air humide qui se manifeste.

De nombreuses études ont déjà été faites sur l'encapsulation des bactéries par séchage par atomisation en utilisant une matrice composée de protéines de lait : de faibles taux de survie des bactéries ont été obtenus (Corcoran *et al.*, 2004; Picot & Lacroix, 2004; Jantzen *et al.*, 2013; Maciel *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Khem *et al.*, 2016a; Huang *et al.*, 2017a). Quelques exemples de résultats reportés dans ces études sont listés en exemple dans le **Tableau 5**. La survie des bactéries après séchage dépend de la souche bactérienne, des paramètres de séchage et de la matrice d'encapsulation utilisée.

Cependant, en adaptant les paramètres de séchage et notamment en abaissant la température de l'air de séchage, un compromis peut être trouvé pour assurer une bonne survie des bactéries après séchage.

3.5. Impact du séchage par atomisation sur les bactéries et choix des paramètres

Lors du séchage par atomisation, les bactéries subissent de nombreuses contraintes défavorables qui peuvent affecter leur survie. Parmi ces contraintes, on retrouve le stress à la chaleur, le stress oxydant, le stress osmotique, le stress mécanique ou encore le stress à la déshydratation (Broeckx *et al.*, 2016). Afin de minimiser autant que possible ces contraintes défavorables, les paramètres de séchage doivent être judicieusement choisis et contrôlés. Il est notamment important de contrôler la pulvérisation, la température de séchage, la configuration de la tour, le temps de résidence des poudres dans la tour de séchage et la teneur en eau finale de la poudre produite (Broeckx *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017b) (**Figure 17**).

Les différents facteurs sont détaillés ci-dessous, ainsi que les façons de les contrôler pour assurer un maintien de la viabilité des bactéries lors du séchage par atomisation.

Tableau 5 : Paramètres de séchage utilisés pour l'encapsulation de bactéries et survie des bactéries. UFC : Unité Formant Colonie.

Bactéries	T _{entrée} (°C)	T _{sortie} (°C)	Matrice d'encapsulation	Concentration de bactéries (UFC/g)		Survie (%)	Références
				Avant séchage	Après séchage		
<i>L. rhamnosus</i> GG	170	85 - 90	Lait écrémé reconstitué (20 %, m/v)	$5,8 \times 10^9$ *a	$2,9 \times 10^9$	50	Corcoran <i>et al.</i> , 2004
<i>Bifidobacterium breve</i>	160	80	PS dénaturées (10 %, m/m ; condition de dénaturation : 80 °C, 30 min)	$7,7 \times 10^9$ *	$2,0 \times 10^9$ *	26	Picot & Lacroix, 2004
			Emulsion huile/eau + PS dénaturées	$4,5 \times 10^9$ *	$5,0 \times 10^8$ *	11	
<i>L. reuteri</i>	89 -100	55 - 65	PS (20 %, m/m)	$1,6 \times 10^9$	$2,5 \times 10^7$	2 *	Jantzen <i>et al.</i> , 2013
<i>L. acidophilus</i>	180	85 - 95	Lait écrémé reconstitué (30 %, m/m)	$2,6 \times 10^7$ *	$2,0 \times 10^7$	77	Maciel <i>et al.</i> , 2014
			PS	$7,5 \times 10^7$ *	10^7	75	
<i>L. zeae</i> LB1	170	80	Caséinate de sodium (10 %, m/m)	$1,0 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$ *	16	Liu <i>et al.</i> , 2015
			Caséinate de sodium + huile végétale (1:1, 20 % m/m)	$1,0 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$ *	16	
			Caséinate de sodium + matière grasse à faible point de fusion (1:1, 20 % m/m)	$1,0 \times 10^9$	$6,3 \times 10^8$ *	63	
<i>L. plantarum</i> A17	110	68 - 70	Isolat de PS (pH 7 ; 10 % m/m)	$3 - 4 \times 10^9$	*	69	Khem <i>et al.</i> , 2016a
			Isolat de PS (pH 4 ; 10 % m/m)	$3 - 4 \times 10^9$	*	39	
			Isolat de PS dénaturées (pH 7 ; 78 °C, 10 min ; 10 % m/m)	$3 - 4 \times 10^9$	*	25	
<i>L. casei</i> BL23	140	60	Lactosérum doux (30 %, m/m)	$1,6 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	60	Huang <i>et al.</i> , 2017a
	127	47	Lactosérum doux (30 %, m/m)	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	100	

^aL'unité de la concentration bactérienne est UFC/ml * Les valeurs ont été calculées à partir des figures et des informations des publications

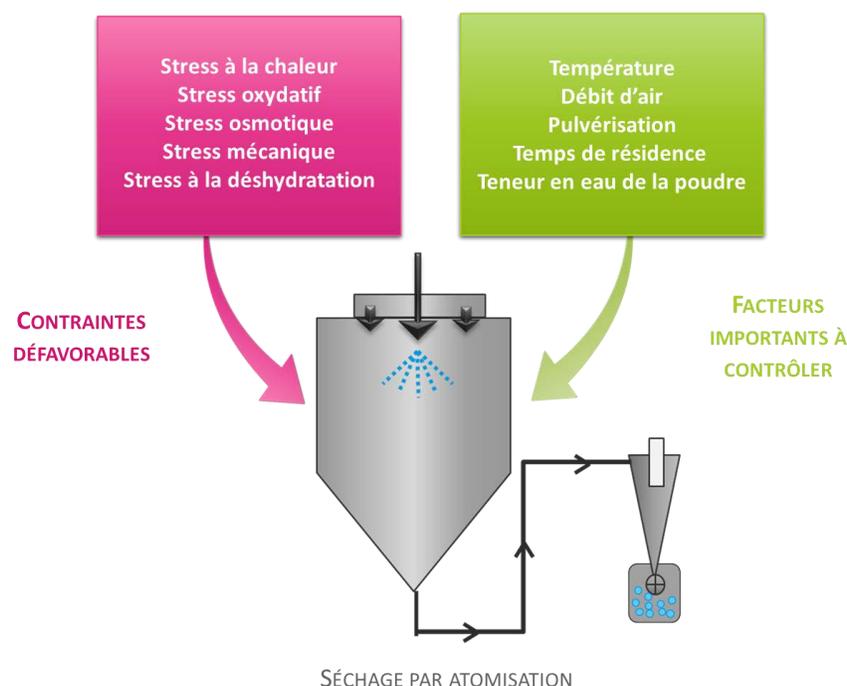


Figure 17 : Contraintes défavorables pour la survie des bactéries et principaux facteurs à contrôler pour assurer leur survie au cours du séchage par atomisation

Pulvérisation. Afin de pulvériser la solution dans la tour de séchage, différents systèmes peuvent être utilisés : la turbine centrifuge, la buse sous pression de liquide ou la buse bi-fluide. L'influence de la pulvérisation sur la survie des bactéries est peu reportée et semble négligeable. Il est cependant conseillé d'utiliser une buse bi-fluide lors du séchage par atomisation de bactéries car cette buse est adaptée aux produits sensibles aux fortes pressions (Schuck *et al.*, 2012b).

Température de l'air de séchage. Du fait de la température élevée de l'air de séchage en entrée de tour, le séchage par atomisation est souvent considéré comme une méthode destructive pour les molécules thermosensibles comme les bactéries. Même si la température d'entrée de l'air de séchage peut atteindre des valeurs supérieures à 200 °C, les bactéries ne sont pas sujettes à des températures aussi élevées. En effet, durant le séchage par atomisation, deux phases de séchage se succèdent pour former les particules sèches : une phase de séchage constante et une phase de séchage ralentie. Lors de la première phase de séchage, la température de la gouttelette est limitée à la température humide, avec une évaporation de l'eau constante (Huang *et al.*, 2017b). A ce moment-là, la température de la particule reste basse (environ 50 °C) et n'atteint pas la température de l'air de séchage (Zuidam & Shimoni, 2010). Lors de la deuxième phase de séchage, une fois

que la teneur en eau des gouttelettes atteint une valeur critique, une croûte sèche se forme à la surface des gouttelettes et la vitesse d'évaporation diminue rapidement. La température à l'intérieur de la particule augmente et atteint la température de l'air de séchage (entre 50 et 80 °C) (Zuidam & Shimoni, 2010). La température atteinte par les particules est généralement proche de la température de l'air de sortie, en fonction du temps de résidence de la poudre dans la tour de séchage (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2017b). C'est dans cette dernière étape que les bactéries peuvent être inactivées par la chaleur (Broeckx *et al.*, 2016). Plus la température de sortie est basse, plus la survie des bactéries est importante.

Teneur en eau de la poudre. La température de séchage influence également la qualité de la poudre obtenue puisqu'elle joue sur leur teneur en eau et sur l'activité de l'eau (a_w). Une a_w et une teneur en eau qui excèdent les recommandations entraînent des problèmes de stabilité de la poudre lors du stockage. Il est recommandé d'avoir une a_w d'environ 0,2 et une teneur en eau de 4 % pour assurer une bonne stabilité des poudres et une bonne survie des bactéries pendant le stockage (Ananta *et al.*, 2005; Abe *et al.*, 2009; Vesterlund *et al.*, 2012). Une température de sortie trop basse peut conduire à la production de poudres avec une a_w trop élevée et une mauvaise stabilité pendant le stockage. Ainsi, il est important de trouver une température d'air de sortie idéale permettant à la fois d'avoir une faible a_w et une faible teneur en eau et ainsi d'éviter la perte de viabilité des bactéries pendant le séchage (Broeckx *et al.*, 2016).

Flux d'air. Différents modèles existent en fonction de la direction que prennent l'air et le liquide lorsqu'ils entrent dans la chambre de séchage : le co-courant, le contre-courant et le flux mixte (Peighambardoust *et al.*, 2011). Suivant les flux utilisés, les poudres n'atteignent pas les mêmes températures. Avec un flux à co-courant, le produit et l'air entrent dans la chambre de séchage dans la même direction. Ainsi les poudres sont exposées à des températures modérées allant de 50 à 80 °C en dessous de la température de l'air de sortie, ce qui limite les dégradations thermiques. Au contraire, avec un flux à contre-courant, le liquide à pulvériser est en direction opposée au flux d'air chaud et les poudres sont exposées à des températures plus élevées (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Anandharamakrishnan, 2017). Comme les bactéries sont des organismes sensibles à la chaleur, il est important de favoriser la configuration co-courant afin de limiter les températures trop élevées dans la poudre.

Synthèse bibliographique

Temps de résidence dans la tour de séchage. Le facteur qui peut influencer le plus la viabilité des bactéries est probablement le temps de résidence de la poudre dans la chambre de séchage. Il est préférable de favoriser un temps de séchage court pour éviter la perte de viabilité des bactéries (Huang *et al.*, 2017b). Au niveau industriel, la tour de séchage peut être équipée d'un lit fluidisé capable de collecter et de refroidir la poudre, ce qui améliore la survie des bactéries. Généralement, le temps de séchage se situe entre 15 et 30 s ce qui limite également l'impact négatif de la température sur les bactéries (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Pour résumer, afin de garantir la meilleure viabilité des bactéries après séchage par atomisation, doivent être privilégiés : l'utilisation d'une buse bi-fluide pour éviter les trop fortes pressions, le choix d'une température de séchage suffisamment basse pour éviter la perte de viabilité des bactéries mais garantissant une faible teneur en eau de la poudre pour assurer une bonne stabilité de poudre durant le stockage, l'utilisation d'un flux d'air à co-courant pour éviter le contact avec les trop hautes températures et le choix d'un temps de résidence dans la tour le plus court possible.

4. Adhésion des bactéries aux matériaux d'encapsulation

La connaissance des phénomènes d'adhésion entre les bactéries et les matériaux utilisés pour l'encapsulation est fondamentale pour comprendre la structuration de la matière. Ainsi, les taux d'encapsulation ou encore de survie des bactéries peuvent être améliorés. C'est également important pour comprendre les phénomènes de libération des bactéries encapsulées. Les interactions entre les bactéries et les matériaux d'encapsulation dépendent principalement de leurs propriétés de surface et ont été peu étudiées (Burgain *et al.*, 2014a). Dans cette partie, les différents types d'interaction impliqués dans l'adhésion des bactéries avec des surfaces seront dans un premier temps décrits puis, les interactions entre LGG et protéines laitières seront présentées plus en détails.

4.1. Mécanismes d'adhésion des bactéries

L'adhésion des bactéries à des surfaces et notamment des surfaces alimentaires dépend de mécanismes qui vont être détaillés dans ce paragraphe. Deux types d'adhésion peuvent être

distingués en fonction de la distance qui sépare les bactéries de la surface avec laquelle elles interagissent : l'adhésion irréversible et l'adhésion réversible (**Figure 18**).

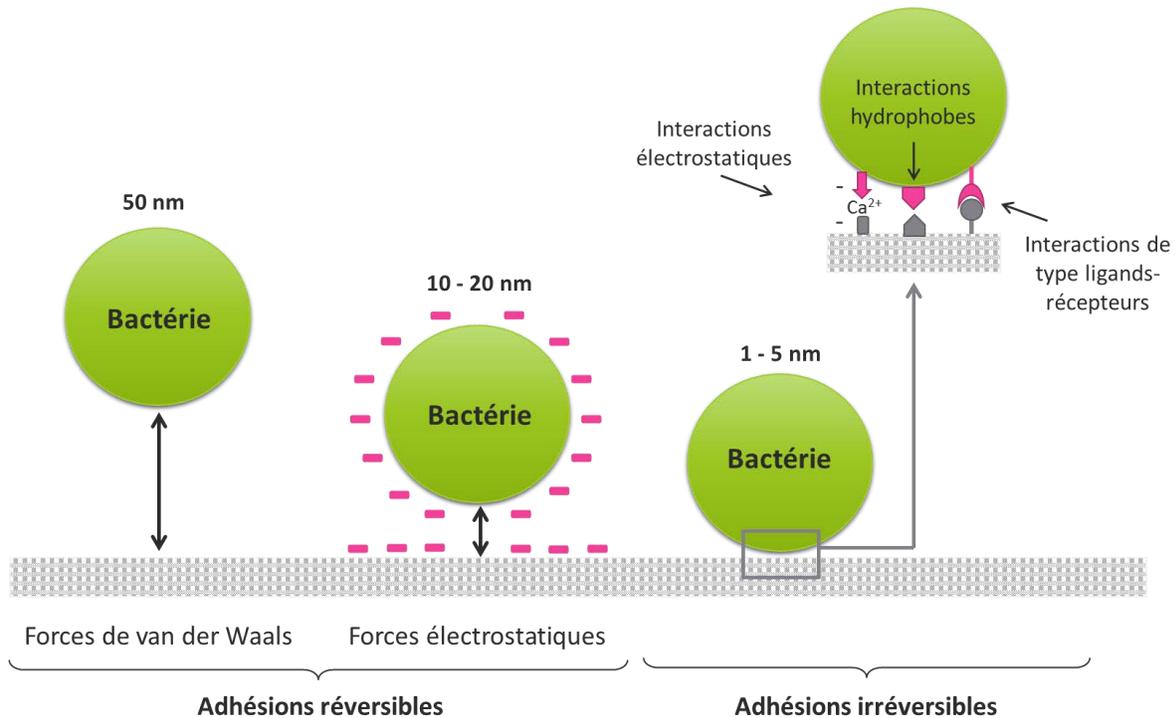


Figure 18 : Différentes interactions impliquées dans l'adhésion bactérienne (adapté de Ofek *et al.*, 2003)

La première phase d'adhésion des bactéries à une surface s'effectue par des interactions de longues distances (entre 3 et 50 nm), réversibles (**Figure 18**). Ces interactions comprennent les forces de van der Waals et les forces électrostatiques. Les bactéries vont d'abord être attirées vers la surface grâce à des forces d'attractions correspondantes aux forces de van der Waals. Ces forces permettent d'unir les molécules et les atomes de deux entités et dépendent des attractions entre les atomes et les molécules à mesure qu'elles se rapprochent. Les forces de van der Waals sont de faible intensité et diminuent rapidement avec la distance entre la bactérie et la surface. Ces forces résultent de l'interaction entre les nuages électroniques de chacun des atomes constituant les molécules. Avant que les nuages électroniques des bactéries et de la surface s'interpénètrent, des forces électrostatiques répulsives prennent le relais. Les forces de répulsions électrostatiques sont dues à la présence de charges de même signe sur la surface de bactéries et sur la surface du matériau lorsque la distance entre les deux entités est inférieure à 20 nm. Lorsque la surface de la bactérie, chargée négativement, vient en contact avec la surface du substrat, également chargée négativement, elle produit des interactions électrostatiques répulsives provenant d'un

Synthèse bibliographique

chevauchement de la couche électronique des deux entités. Cette première phase d'adhésion peut être décrite par une approche physicochimique, appelée la théorie DLVO (pour Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) (Hermansson, 1999; Burgain *et al.*, 2014a). D'après la théorie DLVO, les interactions de van der Waals et les interactions électrostatiques gouvernent l'adhésion initiale des bactéries. Les forces électrostatiques et de van der Waals sont combinées dans la théorie DLVO de la stabilité du colloïde sous forme d'une énergie d'interaction dépendante de la distance de séparation entre la bactérie à la surface. Ces interactions non spécifiques dépendent des propriétés physicochimiques de la surface bactérienne et de la surface du matériau, de la distance entre bactéries et surface, ainsi que de la force ionique du milieu (Hermansson, 1999).

La deuxième phase d'adhésion des bactéries est l'adhésion irréversible. Elle se crée grâce à des interactions de courtes distances (entre 1 et 5 nm) et d'énergie plus élevée (**Figure 18**). Ces interactions concernent les interactions hydrophobes, les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogènes ou encore les interactions de type ligand-récepteur (Ofek *et al.*, 2003). Les liaisons hydrogènes sont des interactions fortes qui se produisent entre un atome d'hydrogène et un atome chargé négativement. Les interactions électrostatiques concernent, dans ce cas, la formation de ponts entre une charge négative située à la surface de la bactérie et une charge négative de la surface du matériau grâce à des cations divalents. Ces forces dépendent fortement de la force ionique du milieu. Les interactions hydrophobes se forment quant à elles entre deux molécules non polaires. Enfin, les interactions de type ligand-récepteur correspondent à une reconnaissance moléculaire entre des récepteurs de la surface de la bactérie et de la surface du matériau. Les systèmes de reconnaissance sont spécifiques et permettent l'adhésion des bactéries entre elles ou avec d'autres entités. Les molécules mises en jeu peuvent être soit des adhésines ou des récepteurs membranaires de types protéiques ou saccharidiques. Ces interactions irréversibles sont considérées comme spécifiques. Une adhésion spécifique peut ainsi être définie comme une interaction sélective entre les constituants de la surface des bactéries et un composé spécifique situé à la surface d'un matériau (An & Friedman, 1998).

4.2. Adhésion des bactéries aux matériaux d'encapsulation

Les propriétés des molécules de surface des bactéries ont été largement étudiées afin de comprendre les interactions entre bactéries et interfaces (formation de biofilms) ou encore lors des interactions

entre les bactéries et cellules intestinales (évaluation de l'effet probiotique) (Lebeer *et al.*, 2007, 2012a; Perea Vélez *et al.*, 2010). Plusieurs macromolécules sont situées à la surface des bactéries, ce qui leur permet d'interagir spécifiquement avec d'autres composés.

Dans le cas de LGG, les différentes molécules de surface ont été décrites dans la partie I du Chapitre 1 sur LGG de ce manuscrit (**Figure 3**). Très peu d'études ont été menées sur l'interaction entre les bactéries et les matériaux d'encapsulation. L'addition de bactéries aux émulsions huile/eau stabilisées par les protéines de lait (caséinate de sodium, concentré de PS ou isolat de protéines de lactosérum) à différents pH (de 3 à 7,5) semble affecter la stabilité des émulsions en fonction des propriétés de surface des souches (Ly *et al.*, 2008). Il est supposé que la charge et l'hydrophobie de surface des bactéries sont impliquées dans l'interaction avec les protéines (Ly *et al.*, 2008). Dans une étude plus récente, l'AFM a permis de mettre en évidence la capacité de LGG à interagir spécifiquement avec les protéines du lait. Plus précisément, ces interactions sont spécifiques à la fois de la souche et du type de protéines considéré (Burgain *et al.*, 2013a). Ainsi, LGG interagit spécifiquement avec les PS mais pas avec les caséines micellaires. Lors de l'interaction avec les PS, des signatures spécifiques de l'étirement de biomolécules ont été observées sur les courbes de retrait. Grâce à ces signatures, les auteurs ont pu affirmer que l'interaction entre LGG et les PS était spécifique. Des forces hydrophobes, électrostatiques ou des interactions de types ligand-récepteur doivent être impliquées dans l'interaction. A l'inverse, lors de l'interaction avec les caséines, aucune signature spécifique de l'étirement de biomolécules n'a été observée. Seules des signatures non spécifiques ont été observées ce qui signifie que les interactions non spécifiques entre les bactéries et les caséines se font par l'intermédiaire de forces de longue distance réversibles comme les forces de van der Waals et les forces électrostatiques. Grâce à l'utilisation de mutants de surface de LGG (mutant *spaCBA* dépourvu de pili, mutant *welE* dépourvu d'EPS), le rôle indispensable des pili SpaCBA dans l'interaction avec les PS a été démontré. Dans une autre étude, les mêmes auteurs ont également étudié l'efficacité de l'encapsulation par émulsification de LGG WT et de ses mutants de surface (Burgain *et al.*, 2014c). La présence de pili permet d'améliorer l'efficacité d'encapsulation par émulsification et favorise la localisation des bactéries à l'intérieur de la microparticule. En effet, sans pilus, les bactéries sont observées à la surface des microparticules (Burgain *et al.*, 2014c).

Synthèse bibliographique

La connaissance des interactions entre les bactéries et les matériaux d'encapsulation est un facteur important à contrôler pour améliorer l'efficacité d'encapsulation des bactéries ainsi que leur localisation dans la matrice et la stabilité des matrices. Les chercheurs sont donc constamment à la recherche de nouveaux matériaux d'encapsulation capables d'interagir avec les bactéries pour contrôler et améliorer ce processus. De nombreuses études se sont intéressées à la localisation des bactéries dans la matrice fromagère par des études de microscopie et démontrent que les bactéries se situent principalement à la surface des globules gras du lait (Tunick *et al.*, 1993; Laloy *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 2006a). Ces résultats laissent supposer qu'une adhésion peut être possible entre les bactéries et la MFGM. Un matériau susceptible d'être un bon candidat pour améliorer l'encapsulation des bactéries pourrait donc être la MFGM et plus précisément les glycoprotéines composant cette membrane. Une étude bibliographique nous permettant d'avancer cette hypothèse sera détaillée dans le prochain paragraphe.

III. LES GLYCOPROTEINES DE LA MEMBRANE DES GLOBULES GRAS DU LAIT : DES INGREDIENTS PROMETTEURS POUR L'ENCAPSULATION DES BACTERIES?

1. Introduction

La MFGM est la membrane qui entoure les globules gras du lait. En raison de sa composition spécifique en protéines et en lipides polaires, tous deux souvent glycosylés, la MFGM est un excellent ingrédient pour le développement de nouvelles applications nécessitant des émulsifiants, des stabilisants ou des ingrédients fonctionnels dans les domaines alimentaires et non alimentaires (Singh, 2006; Dewettinck *et al.*, 2008; Jiménez-Flores & Brisson, 2008). Le babeurre (buttermilk) et le sérum de beurre (butterserum) sont deux produits laitiers particulièrement riches en MFGM. Ces deux produits sont peu coûteux et disponibles en grandes quantités, car, depuis de nombreuses années, ils sont considérés comme des sous-produits non valorisables de l'industrie laitière. Cependant, au cours des deux dernières décennies, une attention particulière a été portée au babeurre et au sérum de beurre en raison de leur forte teneur en MFGM (Vanderghem *et al.*, 2010). Des méthodes permettant d'isoler et de purifier la MFGM à partir de globules gras du lait ont été proposées, ce qui facilite l'étude des propriétés de la MFGM (Corredig & Dalgleish, 1997; Sachdeva & Buchheim, 1997; Ye *et al.*, 2002; Singh, 2006; Dewettinck *et al.*, 2008; Holzmüller & Kulozik, 2016).

En raison de ses effets positifs sur la santé (Singh, 2006; Dewettinck *et al.*, 2008), de sa capacité à se lier aux bactéries (Oberg *et al.*, 1993; Tunick *et al.*, 1993; Laloy *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 2006b; Brisson *et al.*, 2010), et des récentes améliorations apportées aux méthodes de purification utilisées pour l'extraire (Sachdeva & Buchheim, 1997; Corredig *et al.*, 2003; Rombaut *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2009; Holzmüller & Kulozik, 2016), la MFGM pourrait être potentiellement utilisée comme un nouveau matériau pour l'encapsulation des bactéries. Cette synthèse bibliographique met l'accent sur l'intérêt éventuel des glycoprotéines de la MFGM dans l'encapsulation des bactéries.

2. La membrane des globules gras du lait

2.1. Structure

Le globule gras du lait possède un cœur riche en triacylglycérides entourés et stabilisés dans la phase aqueuse du lait par une membrane appelée MFGM. La MFGM est composée de trois couches différentes de phospholipides ayant une épaisseur allant de 10 à 50 nm. La membrane interne est une monocouche qui contient des protéines et des lipides polaires dérivés du réticulum endoplasmique. La membrane externe est une double couche contenant également des protéines et des lipides polaires provenant tous deux de la membrane plasmique apicale des cellules épithéliales mammaires qui entoure les globules gras au cours de leur sécrétion (Heid & Keenan, 2005). La structure de la MFGM est représentée schématiquement sur la **Figure 19**.

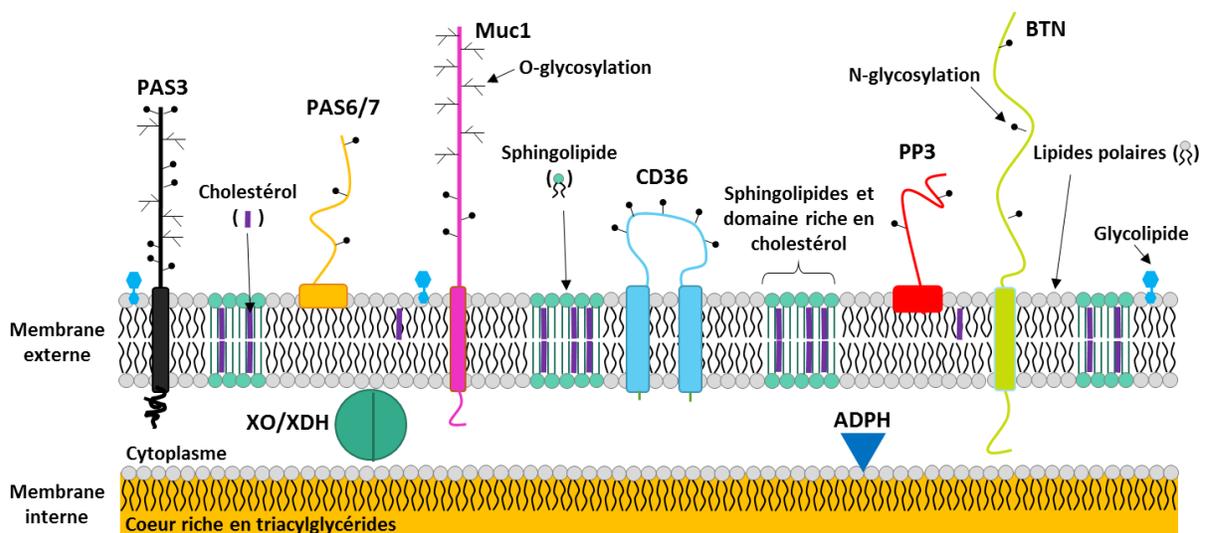


Figure 19 : Composition de la membrane des globules gras du lait

Récemment, la microscopie confocale à balayage laser (CLSM ou Confocal Laser Scanning Microscopy) a été utilisée pour améliorer la connaissance de la structure et de l'organisation de la MFGM (Evers *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2010). Evers *et al.* (2008) ont utilisé des sondes lipophiles et des lectines pour identifier la composition de la MFGM et caractériser ses hétérogénéités structurelles. Lopez *et al.* (2010) ont également utilisé des sondes spécifiques pour les triacylglycérols, les glycolipides et les glycoprotéines afin d'identifier certaines caractéristiques structurelles de la MFGM telles que la présence d'un domaine rigide composé de sphingomyéline

et de cholestérol et l'existence d'une zone hétérogène constituée de glycolipides et de glycoprotéines.

2.2. Les glycoprotéines de la MFGM

La MFGM est constituée de phospholipides, de sphingolipides et de protéines spécifiques de la membrane, principalement des glycoprotéines. De nombreux articles ont déjà été publiés sur la composition de la MFGM (Mather, 2000; Singh, 2006; Dewettinck *et al.*, 2008; El-Loly, 2011; Smoczyński *et al.*, 2012; Elías-Argote *et al.*, 2013). La composition de la MFGM dépend de l'âge de la vache, de la qualité microbiologique du lait, du stade de lactation et/ou de la saison, mais aussi du choix de la méthode d'extraction et de purification de la MFGM (Evers, 2004). Cette partie bibliographique s'intéressera uniquement aux glycoprotéines car elles semblent avoir des propriétés particulièrement intéressantes pour l'encapsulation de bactéries.

Les protéines de la MFGM bovine ne représentent que 1 à 2 % des protéines totales du lait bovin mais 25 à 70 % de la composition de la MFGM (Riccio, 2004; Elías-Argote *et al.*, 2013). Leurs concentrations dépendent de la méthode de purification utilisée pour obtenir la MFGM (Holzmüller *et al.*, 2016a; b). La MFGM est composée d'environ 40 protéines allant de 15 à 240 kDa (Mather, 2000; Dewettinck *et al.*, 2008; Le *et al.*, 2009). Les principales protéines de la MFGM bovine sont la mucine MUC1, l'enzyme redox xanthine déshydrogénase/oxydase (XDH/XO), la butyrophiline (BTN), le cluster de différenciation (CD36), l'acide périodique Schiff 6/7 (PAS 6/7), l'acide périodique Schiff III (PAS III, également appelé MUC15), l'adipophiline (ADPH) et les protéines de liaison aux acides gras (FABP). Toutes les protéines sont glycosylées, à l'exception des deux dernières qui sont également plus petites (**Tableau 6**) (Mather, 2000; Dewettinck *et al.*, 2008; Le *et al.*, 2009).

En plus de ces protéines majoritaires, d'autres protéines sont présentes en plus petites quantités dans la MFGM. Ces protéines comprennent des enzymes, des immunoglobulines, des protéines dérivées du cytoplasme de cellules sécrétrices de l'épithélium, des constituants du lait écrémé et des protéines provenant des leucocytes du lait (Mather, 2000; Fong *et al.*, 2007) qui sont énumérées de manière exhaustive par Mather, (2000).

Tableau 6 : Composition de la fraction protéique de la MFGM, adapté de Singh, 2006; Dewettinck *et al.*, 2008; Jiménez-Flores & Brisson, 2008

Protéines	Masse moléculaire (kDa)
BRCA1 et BRCA2	210
Mucine 1	160 – 200
Xanthine oxydase	146 – 155
Acide périodique Schiff 3	94 – 100
Le cluster de différenciation	76 – 78
Butyrophiline	66 – 67
Adipophiline	52
Acide périodique Schiff 6/7	47 – 59
Protéose peptone	18 – 34
Protéines de liaison aux acides gras	13 – 15

2.3. Extraction et purification de la MFGM

Le MFGM peut être isolée à partir du lait cru (Le *et al.*, 2009), du babeurre, du sérum de beurre ou encore du lactosérum (Sachdeva & Buchheim, 1997; Corredig *et al.*, 2003; Rombaut *et al.*, 2007; Holzmüller & Kulozik, 2016). L'obtention de la MFGM en laboratoire et en industrie se fait de manière différente. En laboratoire, le procédé comprend quatre étapes : la séparation des globules gras, le lavage de la crème, la libération de la MFGM à partir des globules gras et enfin la récupération de la MFGM (Singh, 2006; Dewettinck *et al.*, 2008) (**Figure 20**).

La séparation des globules gras à partir du lait peut être effectuée en utilisant une centrifugeuse ou une écrémeuse (**Figure 20**, encadré 2) (Dewettinck *et al.*, 2008). Une fois isolée, la crème est lavée plusieurs fois avec du tampon: deux fois (Le *et al.*, 2009), trois fois (Fong *et al.*, 2007) ou plus (Sánchez-Juanes *et al.*, 2009) selon les auteurs (**Figure 20**, encadré 3). Dewettinck *et al.* (2008) proposent une liste exhaustive de solutions de lavage utilisées pour laver la crème. L'eau distillée ou déionisée, une solution salée de saccharose avec ou sans tampon, une solution tampon de phosphate isotonique, un tampon phosphate salin ou un ultrafiltrat de lait sont autant d'exemples de tampons disponibles pour laver la crème. La MFGM est ensuite libérée du cœur lipidique en utilisant divers procédés comme le barattage, l'agitation, différents cycles de congélation et de décongélation, un traitement avec des détergents, une mise en suspension dans des solvants polaires et aprotiques ou encore avec des sels biliaires (**Figure 20**, encadré 4) (Singh, 2006; Elías-Argote *et al.*, 2013). L'étape finale consiste à isoler la MFGM. La membrane peut être isolée par

ultracentrifugation, typiquement à une vitesse allant de 90 000 à 100 000 g pendant 60 min (Singh, 2006), par précipitation des protéines à faible pH, par induction de l'agrégation membranaire avec du sulfate d'ammonium suivie d'une ultracentrifugation ou par microfiltration (**Figure 20**, encadré 5) (Dewettinck *et al.*, 2008; Elías-Argote *et al.*, 2013).

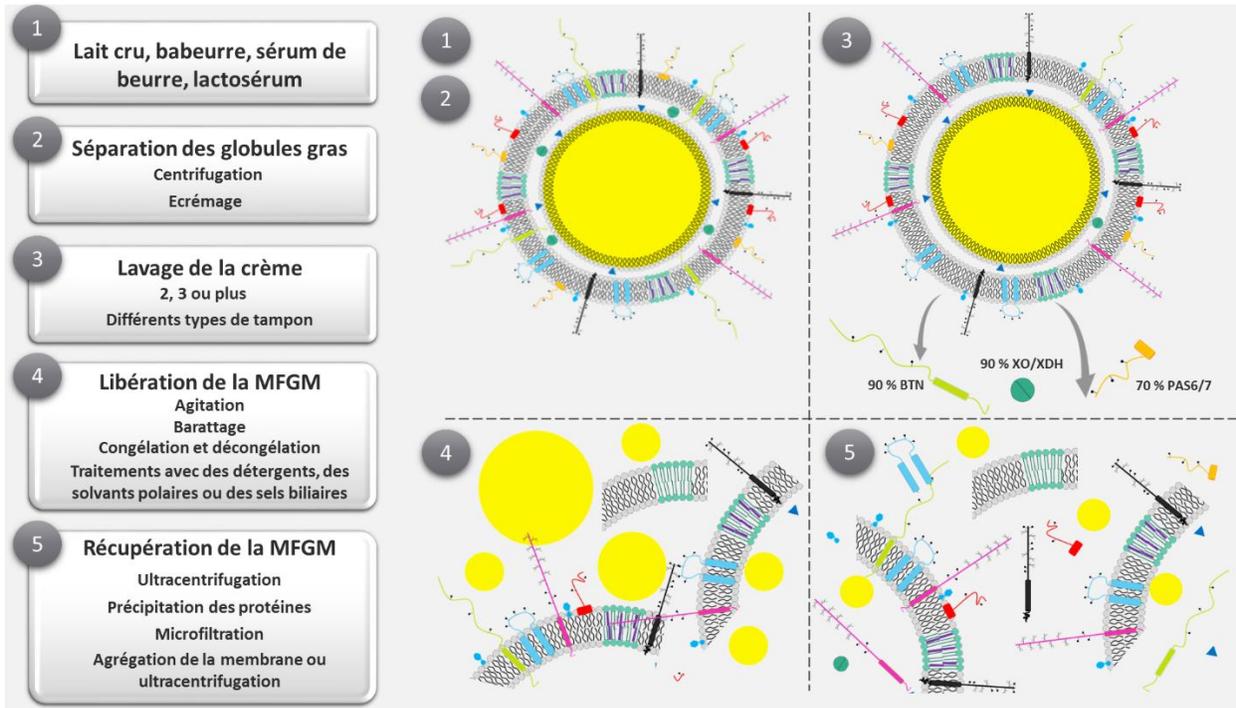


Figure 20 : Différentes étapes d'extraction de la MFGM à l'échelle laboratoire

A l'échelle industrielle, le babeurre et le sérum de beurre sont principalement exploités comme source de MFGM (**Figure 21**). De nombreuses études ont été réalisées sur l'extraction de la MFGM à partir de babeurre au niveau industriel. Des méthodes de filtration ont été développées pour isoler la MFGM avec une teneur élevée en protéines. Les PS et le lactose peuvent être facilement éliminés du babeurre par microfiltration en raison de leur petite taille (Holzmüller & Kulozik, 2016), mais les difficultés concernent l'élimination des micelles de caséines. En effet, la similarité de taille entre les fragments de la MFGM et les micelles de caséines présente un obstacle lors de la purification de la MFGM avec des techniques de microfiltration (Sachdeva & Buchheim, 1997). Les micelles de caséine doivent donc être éliminées du babeurre avant filtration. Sachdeva & Buchheim (1997) ont utilisé la coagulation enzymatique ou la coagulation acide suivi d'une microfiltration avec une membrane de 0,2 µm pour les éliminer du babeurre. Une autre approche consiste à dissocier les micelles de caséines en utilisant du citrate de sodium puis en effectuant une

Synthèse bibliographique

centrifugation à grande vitesse (Corredig & Dalgleish, 1997). La microfiltration avec une membrane ayant une taille de pores de 0,1 μm au lieu d'une centrifugation à grande vitesse peut également améliorer l'élimination des caséines avec une contamination de la MFGM en micelles de caséines de seulement 6 % (Corredig *et al.*, 2003). Récemment, Holzmüller & Kulozik (2016) ont suivi une approche en deux étapes pour isoler la MFGM des protéines du lait. Les micelles de caséines ont été éliminées du babeurre par coagulation induite par la présure et ensuite les PS résiduelles ont été éliminées par diafiltration afin d'obtenir une fraction de MFGM la plus pure possible. Avec cette technique, 70 % des protéines membranaires périphériques de la MFGM ont été récupérées.

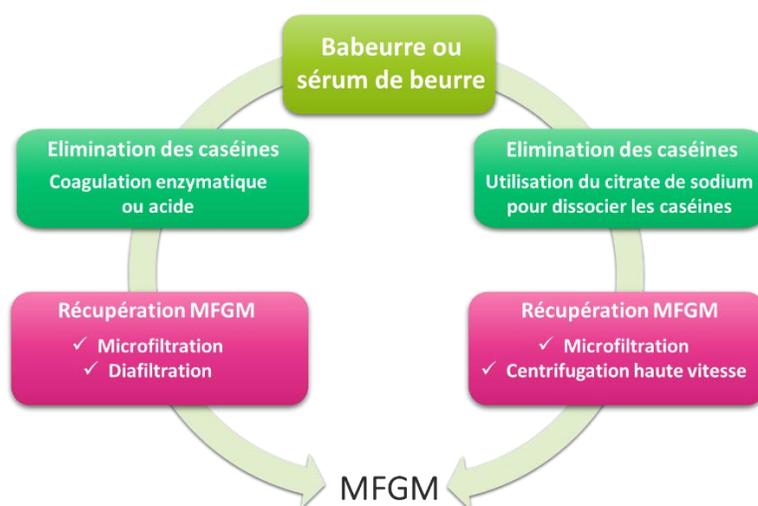


Figure 21 : Différentes étapes d'extraction de la MFGM à l'échelle industrielle

Que ce soit à l'échelle laboratoire ou à l'échelle industrielle, les techniques d'extraction de la MFGM sont toujours responsables de pertes protéiques et lipidiques. Par exemple, à l'échelle laboratoire, le lavage de la crème affecte les protéines de la MFGM. Après trois étapes de lavage, on ne trouve que 30 % de PAS 6/7 et 10 % de BTN ou XO/XDH dans la crème lavée comparativement à la crème non lavée (Holzmüller *et al.*, 2016b) (**Figure 20**). A l'échelle industrielle, le rendement de la MFGM en protéines est influencé par le pH et la température appliqués lors de la coagulation présure des micelles de caséines avant microfiltration. Un pH élevé et une température basse améliorent la récupération des protéines de la MFGM dans le lactosérum (Holzmüller *et al.*, 2016a). Sachdeva & Buchheim, (1997) ont montré que le traitement

(coagulation et microfiltration) affecte la récupération des phospholipides: seuls 70 à 77 % des phospholipides de la MFGM sont ainsi récupérés.

3. Effets de la MFGM sur la santé

Depuis quelques années, une attention considérable est portée à la MFGM par la communauté scientifique mais aussi par les industriels en raison des bénéfices santé que peut apporter la MFGM. De nombreuses études mettent en évidence le rôle important de certains composés de la MFGM tels que les glycoprotéines. D'autres études présentent l'effet de la supplémentation en MFGM dans l'alimentation sur les bienfaits pour la santé. En raison de ces bénéfices pour la santé, la MFGM devrait être de plus en plus utilisée dans les aliments fonctionnels.

3.1. Effets des protéines de la MFGM sur la santé

Certaines protéines de la MFGM possèdent des effets anticancéreux (**Tableau 7**). Même à faible concentration, les protéines FABP sont par exemple capables d'inhiber la croissance des cellules dans le cancer du sein (Spitsberg & Gorewit, 2002). L'action inhibitrice de FABP a été démontrée par leur interaction avec le cluster de différenciation CD36 (Gorewit & Spitsberg, 1998).

Les protéines de la MFGM possèdent également des effets antimicrobiens, antiviraux et antiadhésifs (**Tableau 7**). La XDH participe à la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) incluant la superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'oxyde nitrique et le peroxyde nitrite impliqués dans les réponses inflammatoires et les activités antimicrobiennes (Martin *et al.*, 2004; Harrison, 2006). Les deux protéines MUC1 et PAS6/7 présentent un effet protecteur contre l'infection au rotavirus (Newburg *et al.*, 1998; Kvistgaard *et al.*, 2004). De plus, MUC1 empêche les bactéries pathogènes comme *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* et *B. subtilis* de se lier aux cellules Caco-2 grâce à ses propriétés antiadhésives (Parker *et al.*, 2009).

La BTN et la PAS6/7 ont un impact positif sur le comportement et sur les troubles du système nerveux central (**Tableau 7**). La BTN est capable de moduler positivement l'encéphalomyélite auto-immune, voire même de supprimer cette maladie (Stefflerl *et al.*, 2000; Berer *et al.*, 2005). De plus, la BTN semble influencer positivement l'autisme (Vojdani *et al.*, 2002). La PAS6/7 est

Synthèse bibliographique

impliquée dans l'épithélialisation, la polarisation cellulaire, le mouvement et le réarrangement cellulaire, l'excroissance des neurites et l'activité synaptique dans le système nerveux central (Riccio, 2004).

Tableau 7 : Effets des protéines majeures de la MFGM sur la santé

Protéines	Effets sur la santé	Références
Mucine 1	Effet antiadhésif	Parker <i>et al.</i> , 2009
	Protection contre l'infection au rotavirus	Kvistgaard <i>et al.</i> , 2004
Xanthine déshydrogénase/oxydase	Agent antimicrobien	Martin <i>et al.</i> , 2004
	Source d'EROs et propriétés antiinflammatoires	Harrison, 2006
Butyrophiline	Atténuation de la sclérose en plaque	Berer <i>et al.</i> , 2005
	Modulation positive de l'encéphalomyélite auto-immune	Steffler <i>et al.</i> , 2000
	Amélioration des comportements chez l'autiste	Vojdani <i>et al.</i> , 2002
	Régulation de l'immunité	Rhodes <i>et al.</i> , 2016
Acide périodique Schiff 6/7 ou lactadhérine	Protection des infections virales de l'intestin	Kvistgaard <i>et al.</i> , 2004
	Epithélialisation, polarisation cellulaire, mouvement cellulaire et réarrangement, excroissance des neurites, activité synaptique dans le système nerveux central	Riccio, 2004
Protéines liant les acides gras	Inhibition des cellules de croissance du cancer du sein	Spitsberg & Gorewit, 2002
Cluster de différenciation	Propriétés anticancéreuses lorsqu'il interagit avec le FABP	Gorewit & Spitsberg, 1998

3.2. Effets d'une supplémentation en MFGM sur la santé

En plus des effets santé identifiés pour les composants purifiés de la MFGM, celle-ci a été utilisée dans son intégralité lors de supplémentations alimentaires. Les études *in cellulo* faites sur des cellules humaines ou *in vivo* faites sur des animaux sont différenciées des études cliniques, qui sont des études *in vivo* faites chez l'Homme.

Une récente étude a mis en évidence que la MFGM bovine délipidée, donc une fraction riche en protéines et en glycoprotéines, empêche l'adhésion d'*E. coli enterohaemorrhagic* sur des cellules humaines HT-29 (Ross *et al.*, 2016). Une nouvelle formulation de lait pour nourrissons (Nuturis®) a été développée pour imiter la structure naturelle retrouvée dans les globules gras du lait humain,

c'est-à-dire de gros globules gras entourés par des phospholipides, des protéines et du cholestérol (Gallier *et al.*, 2015). En effet, la structure du globule gras de lait humain et celle retrouvée dans le lait infantile sont totalement différentes. Le lait humain contient des globules gras dispersés, enveloppés par une membrane de phospholipides tandis que les formulations habituelles de lait infantile contiennent des petits globules gras principalement recouverts de protéines. Ces différences sont liées aux procédés de fabrication des formulations infantiles, notamment l'homogénéisation qui va totalement bouleverser la structure des globules gras. La nouvelle formule de lait pour nourrissons proposée par Gallier *et al.* (2015) est supposée présenter des avantages pour la santé des nouveau-nés en imitant le plus étroitement possible la structure du globule gras du lait humain. Une étude récente menée sur des souris a prouvé que les souris nourries avec cette formule présentaient une diminution de l'accumulation de graisse corporelle à l'âge adulte (Baars *et al.*, 2016).

De nombreuses études cliniques ont également exploré les effets de la supplémentation en MFGM sur les régimes alimentaires chez les nourrissons et chez les enfants (Hernell *et al.*, 2016) (**Tableau 8**). Zavaleta *et al.* (2011) ont complété l'alimentation infantile avec une fraction de protéines enrichies en MFGM (Lacprodan MFGM-10, Arla Foods Ingredients, Viby, Danemark). Les enfants (de 6 à 11 mois), pour lesquels l'alimentation a été complétée avec de la MFGM, présentaient une plus faible prévalence à la diarrhée et une plus faible incidence de la diarrhée sanglante en comparaison aux enfants non supplémentés. Une autre équipe a testé la supplémentation alimentaire de nourrissons (2 à 6 mois) avec une fraction de protéines enrichies en MFGM (Lacprodan MFGM-10, Arla Foods Ingredients, Viby, Danemark). Les enfants ont présenté des scores cognitifs plus élevés (Timby *et al.*, 2014b), une réduction du risque d'otite aiguë (Timby *et al.*, 2015), des effets immunomodulateurs sur la réponse humorale au vaccin contre le pneumocoque (Timby *et al.*, 2015) et un taux de cholestérol sérique total plus élevé (Timby *et al.*, 2014a). Des essais cliniques randomisés en double aveugle ont permis de tester la supplémentation alimentaire avec de la MFGM sur des adultes (**Tableau 8**). Cette supplémentation associée à un exercice physique améliore la performance physique des adultes japonais d'âge moyen (Ota *et al.*, 2015). Cette supplémentation améliore également leur capacité d'endurance et leur fonction musculaire, probablement en raison de la stimulation du développement neuromusculaire (Haramizu *et al.*, 2014). Demmer *et al.* (2016) ont comparé l'influence de repas riches en matières grasses composés d'huile de palme et d'huile de palme additionnée de MFGM chez les adultes

Synthèse bibliographique

obèses. L'ajout de la MFGM a permis de réduire les effets négatifs induits par les acides gras saturés et de diminuer le cholestérol postprandial, les marqueurs inflammatoires et la réponse insulínique.

Tableau 8 : Etudes cliniques présentant les effets d'une supplémentation alimentaire en MFGM sur la santé

Supplémentation	Type d'étude	Effets sur la santé	Références
Fraction enrichie en protéines de la MFGM (Lacprodan MFGM-10; Arla Foods Ingredients, Viby, Denmark)	Enfants de 6 à 11 mois	Diminution de la durée de l'épisode de diarrhée. Diminution de l'incidence de la diarrhée sanglante.	Zavaleta <i>et al.</i> , 2011
	Enfants de 2 à 6 mois	Diminution des risques d'otite aiguë. Immunomodulation de la réponse humorale lors de la vaccination contre le pneumocoque. Augmentation du taux de cholestérol sérique total.	Timby <i>et al.</i> , 2014a; b, 2015
MFGM + exercice physique	Adultes d'âge moyen	Amélioration de la capacité physique. Amélioration de la fonction musculaire.	Ota <i>et al.</i> , 2015
MFGM + huile de palme	Adultes obèses	Diminution des effets négatifs induits par les acides gras saturés Diminution du cholestérol postprandial, des marqueurs inflammatoires et de la réponse insulínique.	Demmer <i>et al.</i> , 2016

4. Adhésion entre les bactéries et les glycoprotéines de la MFGM

4.1. Adhésion entre les bactéries et la MFGM

Dans le lait cru, les caséines, les PS, le lactose et les globules gras structurent la matrice. Les bactéries lactiques sont également présentes et l'étude de leur localisation peut révéler leurs affinités pour les différents composants du lait.

La structuration des aliments ainsi que la répartition spatiale des bactéries sont souvent étudiés et ceci particulièrement lors du procédé de fabrication du fromage et son affinage. La localisation des

bactéries dans la matrice joue un rôle essentiel pendant l'affinage et plus particulièrement lors du développement des arômes dans les fromages (Hickey *et al.*, 2015b). Dans la littérature, différentes méthodes de microscopie ont été exploitées pour détecter, dénombrer et visualiser rapidement des bactéries dans des matrices fromagères (Hickey *et al.*, 2015b; a). Par exemple, Laloy *et al.* (1996) ont visualisé la localisation de bactéries dans du fromage de type cheddar en utilisant la microscopie électronique à transmission (TEM ou transmission electronic microscopy). Ils ont constaté que la microstructure et la teneur en matières grasses influençaient la localisation et la rétention des bactéries dans le fromage grâce à une comparaison entre un cheddar au lait entier et écrémé. Ainsi, les bactéries se localisent préférentiellement au contact de la MFGM ou à l'interface caséines/globules gras. En outre, après 1 - 2 mois de maturation, les bactéries se trouvent intégrées dans la MFGM ou se localisent directement à l'intérieur des globules gras. L'organisation des globules gras, des protéines et des bactéries a été observée à l'aide de CLSM dans des fromages de type emmental pendant l'affinage. De nouveau, les bactéries sont observées proches de l'interface protéines du lactosérum/globules gras (Lopez *et al.*, 2006b). D'autres auteurs ont utilisé la microscopie électronique à balayage (SEM pour Scanning Electron Microscopy) pour étudier la microstructure de la mozzarella. Les bactéries se trouvent soit à l'interface PS/globules gras soit à la surface des globules gras (Tunick *et al.*, 1993). Une formulation infantile composée de MFGM et contenant des bactéries lactiques a été explorée par microscopie électronique et l'interaction de ces deux composés a été observée (Benyacoub *et al.*, 2011).

Toutes ces études microscopiques ont révélé l'emplacement préférentiel des bactéries à l'interface protéines-globules gras du lait ou en contact direct avec la MFGM. D'autres techniques ont également été développées pour étudier l'adhésion bactéries/constituants du lait. Brisson *et al.* (2010) ont utilisé le gradient de densité de saccharose, la quantification d'ADN bactérien, le taux de liaison, les mesures de force avec des pinces optiques ou la CLSM pour visualiser et caractériser l'adhésion entre *Lactobacillus reuteri* et la MFGM. L'hydrophobicité de la surface bactérienne semble parfois contrôler l'adhésion de la bactérie à la MFGM. Des mesures d'affinité quantitative entre bactéries lactiques et différents lipides ont été effectuées en utilisant des techniques d'immunotransfert (Bacherio *et al.*, 2007). Aucune adhésion entre les bactéries lactiques et les triacylglycérides n'a été observée, par contre des adhésions avec les phospholipides ont été révélées. Pour résumer les informations trouvées dans la littérature concernant la localisation des

Synthèse bibliographique

bactéries dans les matrices laitières, une schématisation d'une matrice fromagère montrant la localisation préférentielle des bactéries est proposée en **Figure 22**.

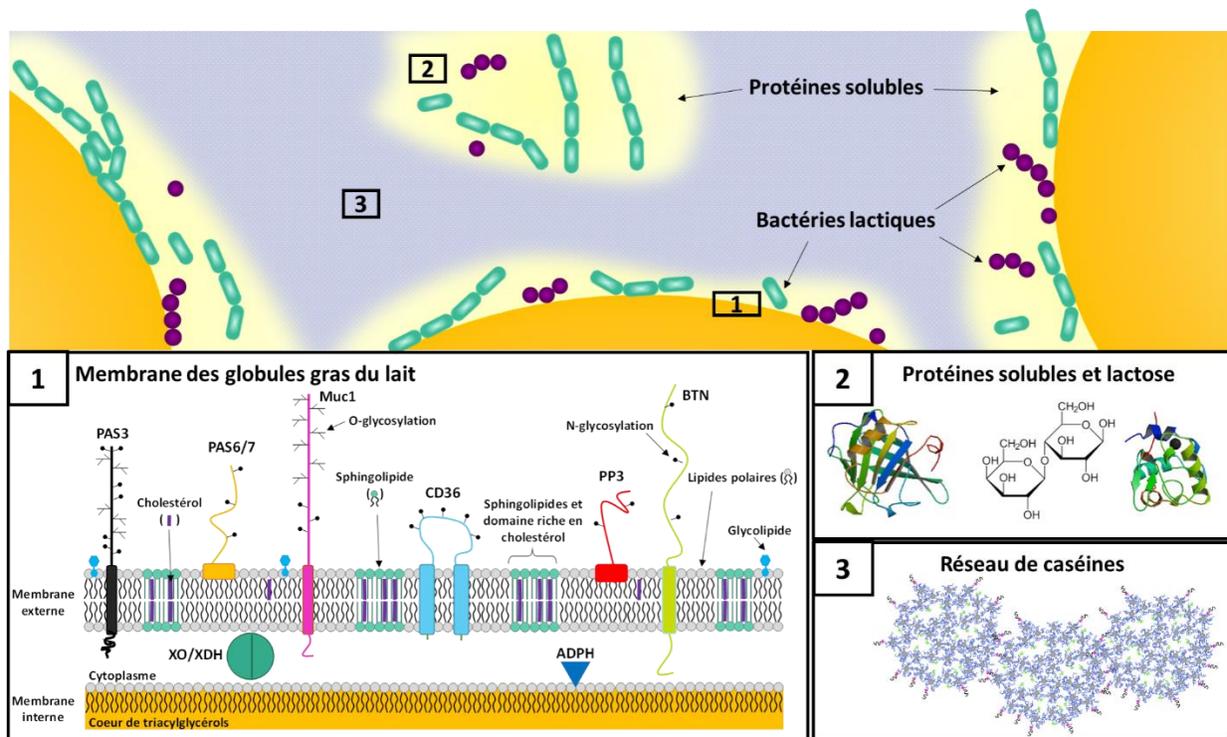


Figure 22 : Composition et localisation des bactéries dans des matrices fromagères

4.2. MUC1 : une glycoprotéine de la MFGM impliquée dans l'adhésion avec les bactéries

Les propriétés d'adhésion des bactéries lactiques et en particulier des souches de lactobacilles sur la mucine intestinale ont déjà été décrites (Nishiyama *et al.*, 2016). De nombreuses protéines ancrées dans la paroi des lactobacilles agissent comme des facteurs d'adhésion à la mucine. Ces différents facteurs sont listés dans le **Tableau 1**. Les nombreux facteurs d'adhésion retrouvés chez les lactobacilles traduisent l'affinité élevée de ces bactéries à la mucine intestinale.

Il existe de nombreuses similitudes entre les glycoprotéines MUC retrouvées dans la MFGM et la mucine humaine tapissant les cellules intestinales. La mucine intestinale humaine et la mucine issue de la MFGM sont toutes deux des protéines de haut poids moléculaire, fortement glycosylées et principalement O-glycosylées. Elles sont toutes les deux composées de N-acétylgalactosamine,

de N-acétylglucosamine, de fucose, de galactose, d'acide sialique, de mannose dans différentes proportions (Patton *et al.*, 1995; Bansil & Turner, 2006). Les similitudes trouvées entre ces deux protéines glycosylées conduisent à penser que la glycoprotéine MUC1 qui se trouve dans la MFGM bovine peut également interagir avec les bactéries lactiques et donc régir leur localisation dans la matrice alimentaire.

À notre connaissance, la capacité de liaison de MUC1 aux bactéries lactiques n'a jamais été étudiée mais l'adhésion de MUC1 avec des bactéries pathogènes a déjà été démontrée. Parker *et al.* (2009) ont démontré que la protéine MUC1 bovine est capable de lier les bactéries pathogènes entériques *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* ou *B. subtilis*. La protéine MUC1 bovine peut également interagir avec *E. coli* et inhiber sa liaison aux cellules épithéliales mammaires bovines cultivées *in vitro* (Sando *et al.*, 2009). Ainsi, la protéine MUC1 bovine est capable d'empêcher l'adhésion des bactéries aux surfaces épithéliales (Parker *et al.*, 2009; Sando *et al.*, 2009) et possède par conséquent des caractéristiques anti-invasives. Cet effet est plus prononcé pour les bactéries Gram négatives que pour les bactéries Gram positives.

5. Propriétés techno-fonctionnelles de la MFGM

5.1. Propriétés émulsifiantes

La MFGM est un émulsifiant naturel du lait. Les composés de cette membrane et en particulier les phospholipides contribuent largement aux propriétés émulsifiantes de la MFGM en raison de leurs propriétés amphiphiles. Les propriétés émulsifiantes de la MFGM stabilisent les globules gras dans le lait. Shimizu *et al.* (1980) ont démontré le rôle important des protéines de la MFGM et des glycoprotéines sur la stabilisation de la matière grasse en interrompant l'agglomération des globules gras. Ils ont également souligné l'importance des phospholipides de la MFGM sur la stabilité des globules gras puisque les phospholipides empêchent la coalescence des globules gras grâce aux forces répulsives. Kanno *et al.* (1991) ont étudié la stabilité d'une émulsion de matière grasse laitière additionnée de différentes quantités de fraction de MFGM (20 - 80 mg de MFGM/g de matière grasse). Les fractions de la MFGM augmentent la stabilité de l'émulsion des globules gras. Pour les émulsions contenant la plus forte concentration de MFGM, la stabilité des globules

Synthèse bibliographique

gras était similaire à celle des globules gras naturels. Corredig & Dalgleish (1998) ont caractérisé l'interface des émulsions préparées avec une fraction de MFGM isolée à partir de lait cru frais. Les constituants de la MFGM ont été adsorbés à la surface de l'émulsion huile dans eau ; ceci confirme la bonne capacité émulsifiante de la MFGM. Roesch *et al.* (2004) ont séparé les fractions de la MFGM en utilisant la microfiltration en présence de citrate. La MFGM dans l'émulsion huile dans eau réduit la taille des gouttelettes d'huile et améliore la stabilité au crémage.

5.2. Utilisation de phospholipides dérivés de la MFGM pour encapsuler des composés bioactifs

Un liposome est une vésicule sphérique formée par l'auto-assemblage de molécules amphiphiles comme les phospholipides avec un diamètre allant de 20 nm à plusieurs microns. Les liposomes sont constitués d'une bicouche de phospholipides, d'un noyau aqueux et d'une couche périphérique hydrophobe en surface. Les liposomes sont fréquemment utilisés en industries cosmétiques et pharmaceutiques pour la protection et la libération de nutraceutiques et de molécules actives (Singh, 2006; Maherani *et al.*, 2011). Dans l'industrie alimentaire, les liposomes peuvent être utilisés pour encapsuler des composés bioactifs (Kim & Baianu, 1991; Reineccius, 1995). La lécithine de soja ou de jaune d'œuf, qui est généralement utilisée pour former les liposomes, est très coûteuse (Thompson *et al.*, 2006; Mozafari *et al.*, 2008). La MFGM a récemment été proposée comme alternative aux lécithines traditionnellement utilisées pour former les liposomes du fait de sa riche teneur en phospholipides et de son faible coût (Thompson *et al.*, 2006). Thompson & Singh, (2006) ont préparé pour la première fois des liposomes en utilisant des phospholipides de la MFGM. Ces liposomes présentaient une température de transition de phase plus élevée que les liposomes formés avec les lécithines traditionnelles et une membrane plus épaisse ayant une plus faible perméabilité. De plus, les dispersions obtenues à partir de ces liposomes étaient plus stables aux différents pH étudiés pendant les traitements thermiques et le stockage (4 - 35 °C) par rapport aux liposomes obtenus avec de la lécithine de soja (Thompson *et al.*, 2006). Il a été suggéré que les liposomes formés à partir des phospholipides dérivés de la MFGM étaient plus résistants aux contraintes environnementales grâce à leurs membranes plus épaisses et à l'organisation des phospholipides à l'intérieur de la membrane (Thompson & Singh, 2006).

Les liposomes préparés avec des phospholipides dérivés de la MFGM ont également été étudiés pour l'encapsulation de composés bioactifs. Les liposomes fabriqués par les phospholipides dérivés de la MFGM étaient plus efficaces pour la rétention de composés hydrophobes (β -carotène par exemple), hydrophiles (chlorure de potassium par exemple) (Thompson *et al.*, 2009) et de polyphénols de thé (Gülseren *et al.*, 2012). Jin *et al.* (2016) ont encapsulé de la curcumine (une molécule antitumorale, antioxydante et anti-inflammatoire) dans divers liposomes. Les liposomes issus des phospholipides de la MFGM présentaient une efficacité d'encapsulation plus élevée, un potentiel zêta plus élevé, une taille de particule plus petite et une libération *in vitro* plus lente par rapport aux liposomes issus de la lécithine de soja. La dispersion et la stabilité des liposomes issus des phospholipides de la MFGM étaient également meilleures que pour les liposomes issus de la lécithine. La lactoferrine a également été encapsulée dans des liposomes de phospholipides dérivés de la MFGM (Liu *et al.*, 2013). Au cours de la digestion gastrique *in vitro*, le temps de digestion et les différentes concentrations en pepsine n'ont pas modifié l'efficacité d'encapsulation de la lactoferrine. Pendant la digestion intestinale *in vitro*, les phospholipides de la MFGM ont été hydrolysés par la lipase pancréatique. En résumé, les liposomes issus des phospholipides dérivés de la MFGM sont stables et capables de protéger les protéines au cours de la phase gastrique et de les libérer dans l'intestin. Les nanoliposomes préparés avec des phospholipides dérivés de la MFGM ont également été utilisés pour stabiliser l'acide ascorbique en tant que supplément vitaminique ou molécule antioxydante (Farhang *et al.*, 2012). Pendant le stockage à 4 °C et après 7 semaines, 70 % des vitamines restent dans les liposomes. En considérant toutes ces études, les liposomes issus de phospholipides dérivés de la MFGM semblent être des outils très prometteurs pour l'encapsulation de molécules hydrophobes et hydrophiles.

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

I. MATÉRIELS

1. Souches bactériennes

La souche bactérienne utilisée dans cette étude, *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103), a été fournie par Sarah Lebeer de l'Université d'Anvers en Belgique. La souche sauvage et trois mutants de surface sont utilisés dans cette étude. Les trois mutants de LGG utilisés ont été développés par le CMPG situé à Leuven en Belgique et sont :

- ✓ le mutant *spaCBA* sans pili (CMPG 5357) (Lebeer et al., 2012a),
 - ✓ le mutant *welE* (CMPG 5351) sans longs EPS (Lebeer et al., 2009, 2011),
 - ✓ le mutant *welEspaCBA* sans pili et sans EPS (CMPG 5365) (Lebeer et al., 2012a)
- (Figure 23).

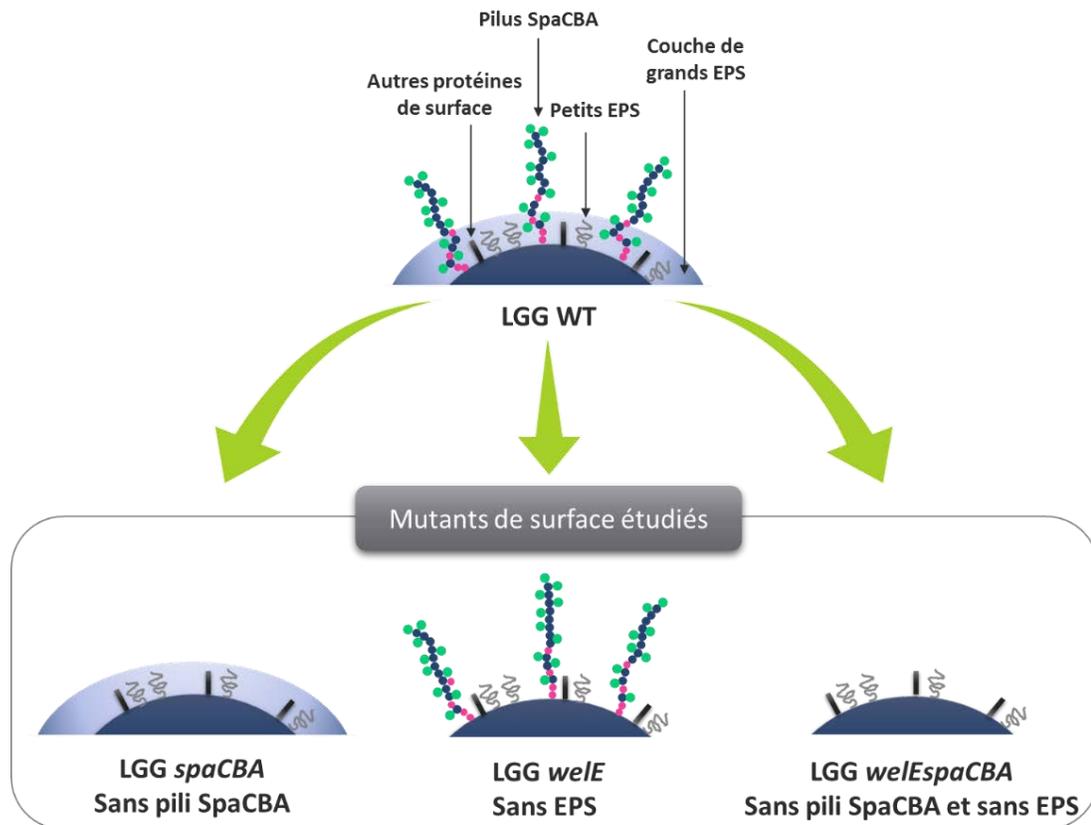


Figure 23 : Mutants de LGG utilisés dans ce travail

2. Protéines laitières

Les poudres de caséines micellaires (Promilk 872 B) et de PS (Promilk 752 FB) ont été fournies par Ingredia IDI (Arras, France). Les PS sont composées principalement de β -LG, α -LA et de BSA. Les caséines micellaires et les PS sont toutes deux issues de techniques de filtration membranaires.

3. Purification de la MFGM

La MFGM est isolée d'après le protocole utilisé par Le *et al.* (2009) avec quelques modifications (Figure 24).

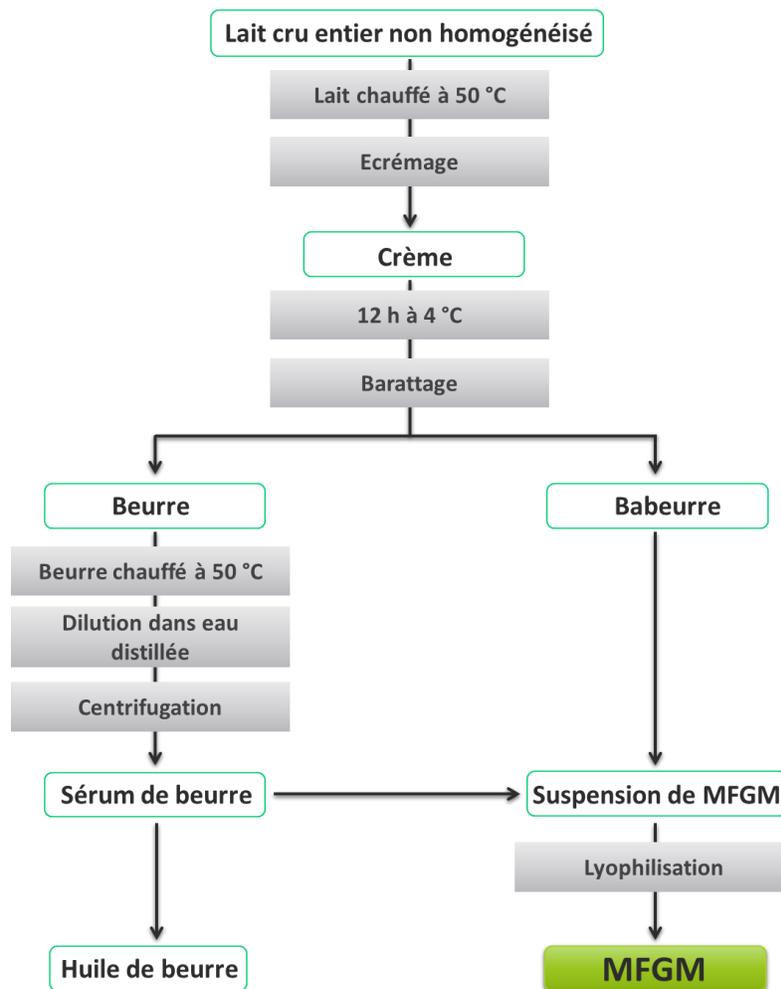


Figure 24 : Purification de la MFGM à partir de lait cru

La MFGM est isolée à partir de lait cru de vache collecté dans un tank réfrigéré d'une ferme locale partenaire (ferme La Bouzule, Laneuvelotte) après la traite du matin. Pour la purification, 40 L de lait sont utilisés. Le lait est d'abord chauffé pour atteindre une température de 50 °C afin de faciliter l'écémage. L'écémage du lait se fait à l'aide d'une écémuse Elecrem 1 (Elecrem1, Elecrem, Fresnes, France). La crème ainsi obtenue est stockée une nuit à 4 °C puis transformée le lendemain en beurre par barattage. Le barattage permet la formation du beurre et d'un liquide appelé babeurre. A cette étape, le babeurre contenant de la MFGM est récupéré. Le beurre est, quant à lui, chauffé à 50 °C après avoir été mélangé avec de l'eau distillée (1:1, m/m). Le mélange est centrifugé à 3 300 g pendant 10 min. Le surnageant, contenant l'huile de beurre est éliminé et le sérum de beurre, contenant la MFGM, est rincé avec de l'eau distillée et centrifugé à nouveau à 3 300 g pendant 10 min. La suspension de sérum de beurre contenant la MFGM est finalement collectée, congelée et lyophilisée pour obtenir de la poudre de MFGM.

II. CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DE LA MFGM

1. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode de Kjeldahl selon la norme AFNOR (1994). La prise d'essai est minéralisée par l'acide sulfurique concentré en présence d'un catalyseur. L'ammonium formé est distillé pour produire de l'ammoniac, lui-même recueilli dans une solution d'acide borique et titré par une solution d'acide sulfurique.

Plus précisément, pour déterminer le pourcentage d'azote total, 0,10 g de MFGM sous forme lyophilisée, 2 ml d'acide sulfurique concentré et une pincée de catalyseur ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{CuSO}_4$) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) sont introduits dans un matras. Pour déterminer le pourcentage d'azote non protéique, 0,5 g de poudre et 20 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 24 % sont introduits dans une fiole de 50 ml, et la solution est complétée au trait de jauge avec du TCA 12 %. La solution est filtrée puis 2 ml sont introduits dans un matras en présence de 2 ml d'acide sulfurique concentré et une pincée de catalyseur. Les matras sont ensuite minéralisés. Ces derniers sont maintenus durant 2 h à 400 °C grâce à une rampe électrique (étape de minéralisation). Au sein de l'appareil à distiller semi-automatique Gerhardt (Vapodest 4S, France), le contenu du matras est ensuite additionné d'une solution d'hydroxyde de sodium à 10 mol.l⁻¹. L'ammoniac dégagé se combine à la vapeur d'eau pour former de l'hydroxyde d'ammonium. Celui-ci, entraîné par la vapeur, se condense dans le réfrigérant avant d'être recueilli dans une solution d'acide borique contenant un indicateur coloré (vert de bromocrésol et rouge de méthyle - 3 %) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Le borate d'ammonium ainsi formé est déplacé par un acide fort (H_2SO_4 à une concentration de 0,005 mol.l⁻¹) par un dosage semi-automatique. Un essai à blanc (sans échantillon) est effectué dans les mêmes conditions. Trois répétitions sont effectuées.

Le pourcentage d'azote total (N_t) dans la matière sèche est déduit de l'**Équation 1** :

$$\text{Teneur en azote } (N_t) \text{ (g pour 100 g)} = \frac{(V_1 - V_0) \times 0,14 \times 100}{m \times 1000}$$

Équation 1 : Détermination de la teneur en azote total

Avec V_1 : le volume d' H_2SO_4 (0,005 mol.l⁻¹) versé pour l'échantillon (ml)
 V_0 : le volume d' H_2SO_4 (0,005 mol.l⁻¹) versé pour le blanc (ml)
 m : la masse de la prise d'essai (g)

Le pourcentage d'azote non protéique (ANP) dans la matière sèche se détermine par l'**Équation 2**:

$$\text{Teneur en azote non protéique (ANP) (g pour 100 g)} = \frac{(V_1 - V_0) \times 0,14 \times 50 \times 100}{m \times 2 \times 1000}$$

Équation 2 : Détermination de la teneur en azote non protéique

Pour déterminer le pourcentage de protéines totales dans l'échantillon, l'**Équation 3** est utilisée :

$$\text{Teneur en protéines totales} = (N_t - \text{ANP}) \times 6,38$$

Équation 3 : Détermination de la teneur en protéines totales

2. Caractérisation des protéines par SDS-PAGE

La SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) est une technique décrite pour la première fois en 1970 par Laemmli (Laemmli, 1970). Elle est couramment utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire.

La solution de MFGM est préparée dans de l'eau distillée à une concentration de 0,1% (p/p). La réhydratation est effectuée en agitant la solution pendant 1 h à température ambiante. Avant dépôt, la solution de MFGM est mélangée avec du tampon de solubilisation réducteur (12 % de SDS (m/v), 50 % de glycérol (m/v), 7,5 % de β -mercaptoéthanol (v/v), une pointe de spatule de bleu de bromophénol et 250 mM de Tris HCl) (1 :1, v/v). La solution est ensuite traitée thermiquement durant 10 min à 90 °C puis 15 μ l de solution sont déposés sur le gel SDS-PAGE. Le gel SDS-PAGE est préparé selon la méthode de Laemmli (1970). Le gel de concentration et de séparation sont composés respectivement de 4 et 8 % d'acrylamide. La séparation des protéines sur le gel

Matériels et méthodes

s'effectue pendant 1 h à 20 V puis 40 min à 180 V et la révélation des protéines se fait par coloration au bleu de Coomassie.

3. Dosage des lipides

La teneur en lipides est déterminée selon la méthode de Folch *et al.* (1957). Il s'agit d'une méthode d'extraction à froid standardisée, basée sur l'utilisation du chloroforme et du méthanol. Trois répétitions sont effectuées. Expérimentalement, 50 g d'échantillon (m_1) sont placés dans un ballon préalablement pesé (m_0). Le ballon contenant l'échantillon est additionné de 200 ml d'un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1) puis mis sous agitation sous azote pendant 20 min. La solution ainsi obtenue est alors filtrée sous vide. Après lavage du filtre avec 200 ml du mélange chloroforme/méthanol, le solvant est éliminé à l'aide d'un évaporateur sous vide à 50 °C. Le ballon est de nouveau pesé (m_2) et la teneur en lipides est calculée selon l'**Équation 4**:

$$\text{Teneur en lipides (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1} \times 100$$

Équation 4 : Détermination de la teneur en lipides

Avec

m_0 : la masse du ballon vide (g)

m_1 : la masse de la prise d'essai (g)

m_2 : la masse du ballon contenant les lipides (g)

III. -ÉTUDE DE L'ADHESION

1. Adhésion bactéries-protéines laitières par microscopie à force atomique

1.1. Principe et fonctionnement

La microscopie à force atomique (AFM ou Atomic Force Microscopy) a été développée en 1986 et dérive du principe du microscope à effet tunnel STM (Scanning Tunnel Microscope). Cette technique peut être utilisée pour caractériser les propriétés physicochimiques et mécaniques de surface d'un matériau à l'échelle atomique mais aussi les forces d'interaction. L'AFM repose sur l'interaction entre une pointe, fixée sur un levier de constante de raideur fixe, et la surface d'un échantillon. Un scanner piézoélectrique permet de contrôler le positionnement de la pointe de manière très résolutive dans les trois dimensions de l'espace (x, y et z). Le levier sur lequel est fixée la pointe est très flexible et permet de quantifier la force qui s'exerce entre la pointe et l'échantillon. Les mesures de force d'interaction sont réalisées par l'intermédiaire d'un laser focalisé sur l'extrémité du levier. La réflexion du laser est ensuite collectée sur un photodétecteur à quadrant constitué de quatre photodiodes. Le déplacement du laser sur le photodétecteur permet de quantifier les mouvements de la pointe (déflexion) (**Figure 25**).

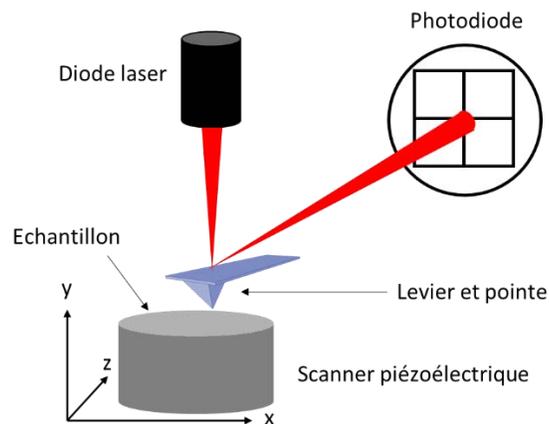


Figure 25 : Principe de la microscopie à force atomique

Matériels et méthodes

Depuis de nombreuses années, l'AFM a été utilisée pour étudier de nombreuses propriétés de surfaces des bactéries. On distingue généralement deux modes d'acquisition pour analyser la surface des bactéries: le mode topographie (ou mode imagerie) et le mode spectroscopie de force (**Figure 26A**).

Le mode topographie permet à la pointe de suivre le contour des bactéries en solution pour enregistrer des images 3D très résolutive (résolution moléculaire) de l'organisation de leur surface. L'AFM en mode imagerie a déjà permis à de nombreux chercheurs d'observer les composés de surface des bactéries, comme les EPS (**Figure 26B**, image gauche) (Francius *et al.*, 2009), les pili (**Figure 26B**, image droite) (Tripathi *et al.*, 2012a), le PG (Andre *et al.*, 2010) ou encore les acides téichoïques (Andre *et al.*, 2011).

Le mode spectroscopie peut être utilisé pour mesurer les forces entre la pointe et la surface de l'échantillon. Les courbes de force permettent d'obtenir un grand nombre d'informations suivant la position du levier par rapport à la surface de l'échantillon. La **Figure 26C** présente un exemple de courbes enregistrées en mode spectroscopie : une courbe d'approche (qui correspond à la descente de la pointe vers l'échantillon) et une courbe de retrait (qui correspond à l'éloignement de la pointe de l'échantillon). Initialement, la pointe est loin de la surface de l'échantillon et la force résultante est nulle, c'est la phase d'approche (**Figure 26C**, étape 1). Lorsque la pointe est suffisamment proche de la surface de l'échantillon, des interactions négatives (attraction entre la pointe et la surface de l'échantillon) ou positives (répulsion entre la pointe et la surface de l'échantillon) peuvent intervenir et faire fléchir le levier (**Figure 26C**, étape 2). Lorsque la pointe entre en contact avec la surface de l'échantillon, des contraintes mécaniques du levier et/ou de la pointe peuvent être observées (**Figure 26C**, étape 3). Dans le cas d'une surface non déformable, le phénomène observé est dû à la déformation du levier. Dans le cas d'une surface déformable, des phénomènes de compression et/ou d'indentation peuvent être rencontrés et permettent de définir les propriétés mécaniques de la surface de l'échantillon. Lors du retrait de la pointe, les propriétés viscoélastiques de l'échantillon peuvent être analysées (**Figure 26C**, étape 4). Au cours de ce retrait, des forces de rupture importantes peuvent apparaître montrant les propriétés d'adhésion de la surface de l'échantillon avec la pointe (**Figure 26C**, étape 5).

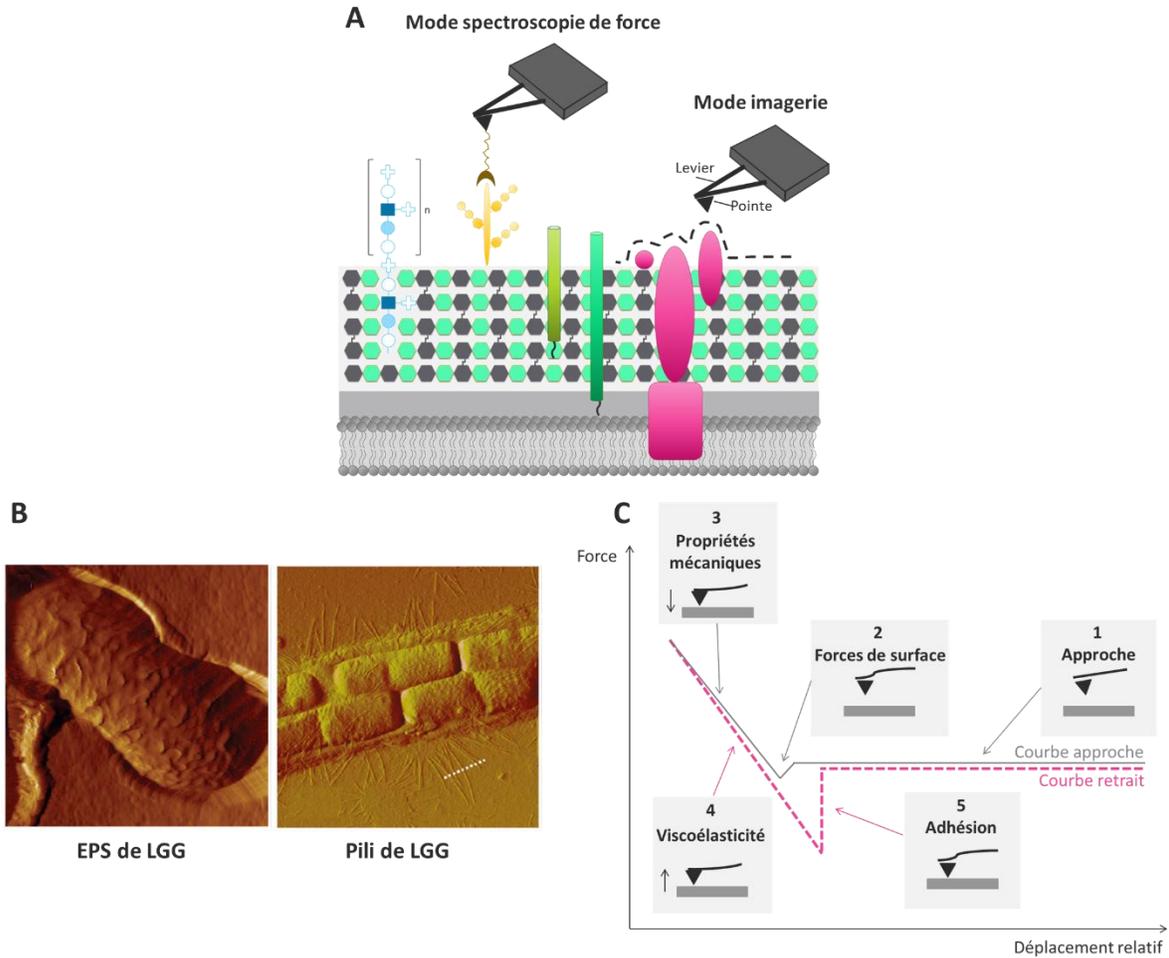


Figure 26 : Différents modes d’acquisition de la microscopie à force atomique pour l’analyse de la surface de bactéries (A). Mode imagerie permettant l’acquisition d’images 3D de la surface des bactéries. A gauche, organisation des EPS ((Francius *et al.*, 2009) et à droite, organisation des pili (Tripathi *et al.*, 2012a) à la surface de LGG (B). Mode spectroscopie de force permettant d’obtenir différentes propriétés de surface des bactéries (C)

1.2. Pointes et surface utilisées pour les mesures AFM

Pour les mesures de topographie, des leviers MLCT avec une constante de raideur de 0,02 N/m sont utilisées (Bruker). Pour les mesures de force, des leviers AFM avec des particules de verre borosilicatées (2 μm), revêtues d’une couche d’or et modifiées par du PEG possédant des groupements NH_3 terminaux ont été achetées chez Novascan (Ames, Iowa, USA). La constante de raideur théorique de ces pointes était de 0,01 N/m. Du mica recouvert par une couche d’or et

Matériels et méthodes

fonctionnalisé avec du PEG composé de groupements NH₃ terminaux a été acheté chez Novascan (Ames, Iowa, USA).

1.2.1. Préparation des pointes avec les protéines

Les solutions de protéines (β -LG, α -LA, BSA, caséines, mucine de porc gastrique (M1778, Sigma-Aldrich, France) ou MFGM) sont préparées dans de l'eau distillée à une concentration de 1 % (m/m). La réhydratation est effectuée en agitant la solution pendant 2 h à température ambiante et pendant une nuit à 4 °C. Les protéines sont adsorbées sur la pointe par immersion pendant 15 h à 4 °C dans la solution de protéines concentrées (Burgain *et al.*, 2013b, 2014c). Les sondes sont ensuite rincées avec de l'eau milli-Q et séchées sous un flux d'azote avant leur utilisation.

1.2.2. Préparation des surfaces avec les bactéries

Une préculture de LGG est préparée en inoculant 9 mL de bouillon MRS (Milieu de Man, Rogosa, Sharpe) avec 100 μ L de bouillon bactérien qui avait été stocké à -80 °C dans du bouillon MRS avec du glycérol à 20 % (v/v). La préculture est placée à 37 °C pendant une nuit sans agitation avant d'être utilisée pour inoculer 9 ml de bouillon MRS frais. La culture est placée à 37 °C jusqu'à atteindre une densité optique de 1,2 à 660 nm. La culture est ensuite centrifugée à 3 000 g pendant 10 min à température ambiante. Le culot est remis en suspension dans 1 ml de tampon phosphate (PBS ; pH 6,8).

La suspension bactérienne solubilisée dans du PBS est déposée sur le mica et laissée en contact pendant 15 h à 4 °C. Le mica est ensuite rincé avec du PBS avant de réaliser les mesures de forces par AFM (Burgain *et al.*, 2013b, 2014c).

1.3. Conditions d'acquisition

L'AFM est utilisée en mode topographie et en mode force. L'équipement est un microscope à force atomique Asylum MFP-3D (Santa Barbara, CA, USA) contrôlé par le logiciel d'exploitation IGOR

Pro 6.04 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). Les mesures AFM sont effectuées à température ambiante, en liquide, dans du PBS à pH 6,8.

Les images sont acquises en mode contact à une fréquence de balayage de 1 Hz avec une force appliquée inférieure à 250 pN. Pour les mesures de force, la constante de raideur à l'extrémité de la pointe est déterminée en utilisant la méthode d'étalonnage thermique de Lévy & Maaloum, (2002) fournissant une valeur de 0,01 N/m. Pour chaque mesure, la carte de force est obtenue sur une surface de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ correspondant à 32×32 points. Les courbes de force AFM sont obtenues en utilisant une vitesse de balayage de $400 \mu\text{m/s}$ (Burgain *et al.*, 2013b).

1.4. Détermination du pourcentage d'évènements adhésifs

Pour chaque mesure de force par AFM, une carte de force est enregistrée. Chaque carte de force est divisée en 1024 courbes de force (**Figure 27A**). Pour étudier les interactions entre les bactéries (fixées sur le mica) et les protéines (fixées sur la pointe), seules les courbes de retrait sont analysées puisque ce sont elles qui permettent d'obtenir des informations sur les forces d'adhésion. Pour chaque analyse, une zone comprenant 100 courbes de force est sélectionnée et les 100 courbes de retrait correspondantes sont interprétées dans le but de différencier :

- les courbes de retrait ne présentant pas d'évènements d'adhésion
- les courbes de retrait présentant des évènements d'adhésion avec des signatures spécifiques de l'étirement de biomolécules
- les courbes de retrait présentant des évènements d'adhésion avec des signatures non spécifiques.

Cette analyse est répétée trois fois. Le pourcentage d'évènements d'adhésion correspond aux pourcentages de courbe présentant des évènements d'adhésion avec des signatures spécifiques de l'étirement de biomolécules (**Figure 27B**). Les différentes signatures (spécifiques et non spécifiques) souvent retrouvées dans cette étude lors du retrait de la pointe sont répertoriées dans la **Figure 27C**.

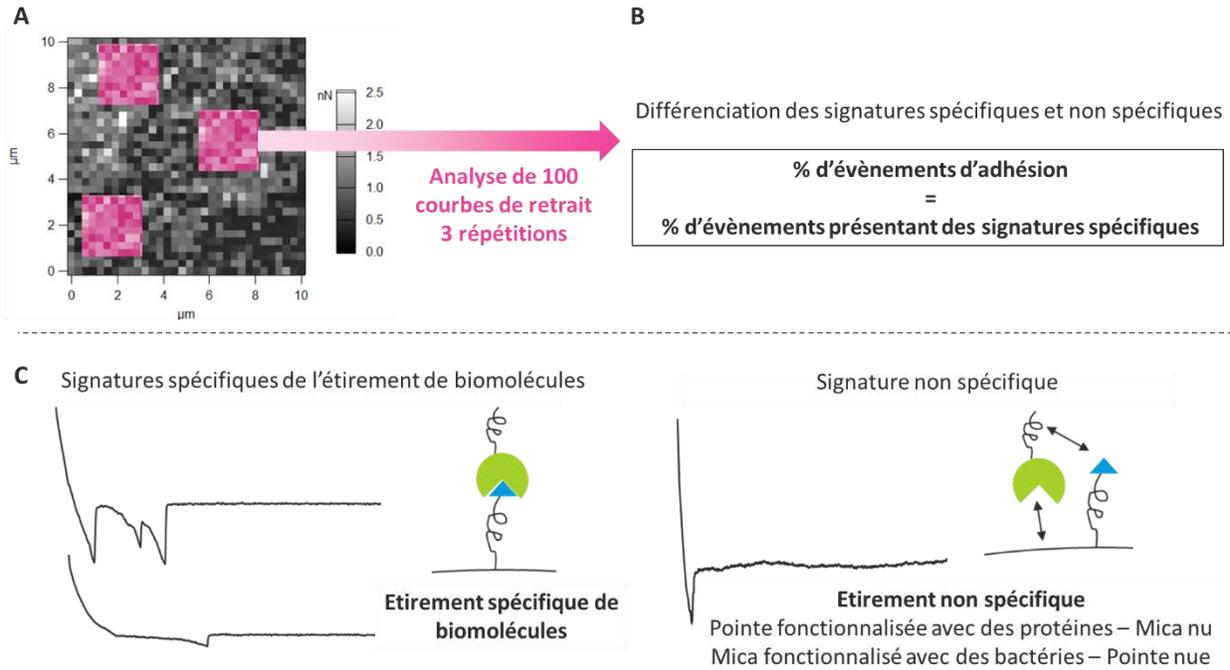


Figure 27 : Obtention de cartographies de force par AFM et analyse des courbes de retrait. Carte de force obtenue lors de l'analyse AFM (A). Calcul du pourcentage d'évènements d'adhésion (B). Différenciation des signatures spécifiques et non spécifiques (C)

1.5. Ajustement des courbes de retrait par des modèles prédictifs

Les pics observés sur les courbes de retrait peuvent être modélisés par des approches statistiques. Des modèles prédictifs, tels que FJC (*Freely Jointed Chain*) et WLC (*Worm-Like Chain*), sont utilisés pour décrire l'étirement des biomolécules au cours du retrait de la pointe. Le modèle FJC permet de décrire l'étirement d'une chaîne polysaccharidique (Marszalek et al., 1998). En effet, dans le modèle FJC, un polymère est considéré comme une série de segments rigides, de longueur l_k (longueur de Kuhn), reliés entre eux par des jonctions flexibles (Zhang & Zhang, 2003). La longueur de Kuhn est directement reliée à la longueur de contour (la longueur de la molécule linéairement étendue sans étirer le squelette moléculaire) (L_c) par l'Équation 5 :

$$L_c = N \times l_k$$

Équation 5 : Détermination de la longueur de contour
avec N, le nombre de monomères.

Dans ce modèle, la force est reliée à l'extension z , la distance séparant la molécule greffée sur la pointe et l'échantillon, par l'Équation 6 :

$$z(F) = L_c \left[\coth\left(\frac{Fl_k}{k_b T}\right) - \frac{k_b T}{Fl_k} \right]$$

Équation 6 : Modèle FJC

avec k_b , la constante de Boltzmann et T la température absolue.

Le modèle WLC décrit l'étirement de protéines (Lee et al., 1994). En effet, avec ce modèle, un polymère est considéré comme un filament incurvé irrégulier, linéaire à l'échelle de la longueur de persistance (l_p), un paramètre qui représente la raideur de la molécule. L'extension de la molécule est limitée par sa longueur de contour (L_c) (Marszalek et al., 1998). La force F est donnée par l'Équation 7:

$$F_{WLC}(z) = \frac{k_b T}{l_p} \left[\frac{z}{L_c} - \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L_c}\right)^2} - \frac{1}{4} \right]$$

Équation 7 : Modèle WLC

Pour évaluer la performance des deux modèles, le coefficient de détermination (R^2) est calculé selon l'Équation 8:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i (y_i - f_i)^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}$$

Équation 8 : Détermination du coefficient de détermination

où y_i représentent les valeurs expérimentales, \bar{y} la moyenne des y_i et f_i la valeur prédite par le modèle. Une valeur proche de 1 indique que le modèle est pertinent.

Matériels et méthodes

L'ajustement des courbes par les modèles prédictifs FJC et WLC permettent d'obtenir différentes informations sur la courbe de retrait : le nombre de ruptures, la force de rupture maximale nécessaire pour décrocher la biomolécule, la distance de rupture de la biomolécule, la longueur de contour et les longueurs de Kuhn et de persistance de la biomolécule. Certaines de ces valeurs peuvent facilement être représentées sur une courbe de retrait (**Figure 28**). L'analyse des courbes de retrait permet également de déterminer une force d'adhésion maximale correspondant à la force nécessaire pour rompre le contact établi entre les deux partenaires, sans forcément décrocher la biomolécule.

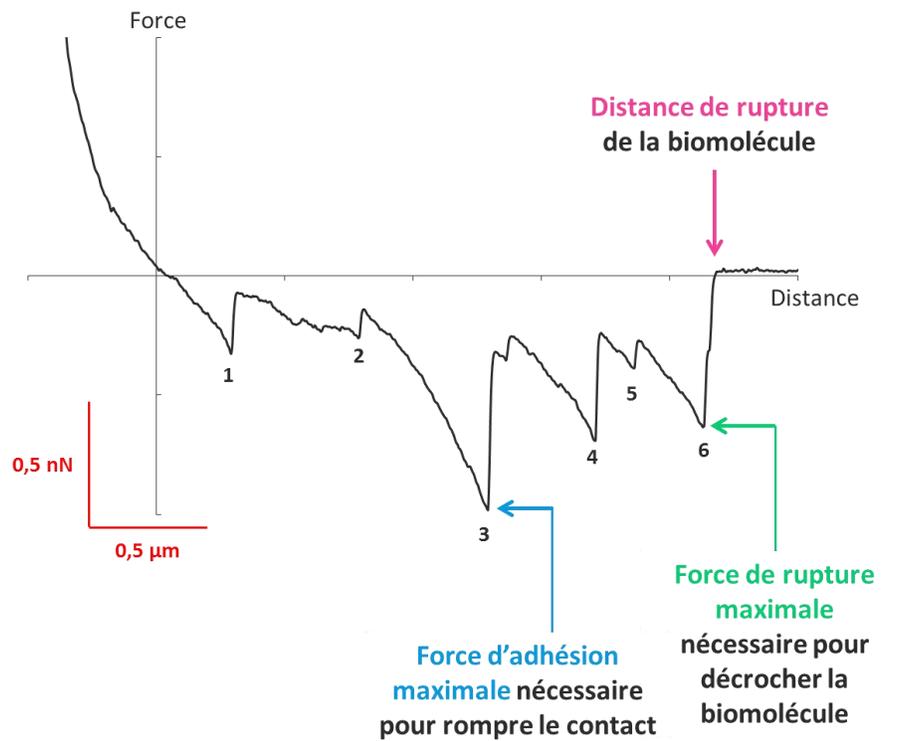


Figure 28 : Illustration des données fournies par l'ajustement des courbes de retrait avec les modèles FJC et WLC

2. Adhésion bactéries-cellules intestinales humaines

2.1. Cellules épithéliales et conditions de culture

Les cellules épithéliales utilisées dans cette étude sont des cellules Caco-2 TC7, issues initialement d'un adénocarcinome colorectal humain par Jorgen Fogh en 1977. Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) modifié avec 4,5 g/l de glucose (DMEM Glutamax, Fisher Scientific). Ce milieu est complété par 20 % (v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, Gibco®), 1 % (v/v) d'antibiotiques (5000 U/ml de pénicilline et 5000 mg/ml de streptomycine, Gibco®) et 1 % d'acides aminés non essentiels (100 ×, Gibco®). Les cellules sont conservées dans du milieu DMEM additionné de sérum de veau fœtal et 10 % de glycérol à -80 °C.

Pour commencer la culture, les cellules sont tout d'abord décongelées etensemencées dans des flacons de culture cellulaire en plastique (75 cm², Dutscher). Après 4 jours de culture, les cellules sont trypsinées avec 0,05 % de trypsine-EDTA (1×, Gibco®). Pour cela, le milieu de culture contenu dans les flacons de culture cellulaire est éliminé et du PBS est ajouté sur les cellules pour les rincer dans le but d'éliminer le SVF restant car il inhibe l'action de la trypsine. Ensuite, 4 ml de trypsine-EDTA (0,05 %) est ensuite ajoutée. Après 5 min de contact, du milieu DMEM contenant du SVF est ajouté pour inhiber l'action de la trypsine et les cellules sont récupérées après centrifugation à 470 g pendant 5 min à 37 °C. Le surnageant est éliminé et les cellules Caco-2 TC7 sont retrouvées dans le culot. Les cellules sont remises en suspension dans du milieu DMEM (20 % SVF, 1 % antibiotique et 1 % acides aminés non essentiels) puisensemencées dans des plaques de culture cellulaire à six puits. Dans chaque puit la densité initiale de cellules est de 6×10^4 cellules par cm² (le nombre de cellules dans le milieu de culture après trypsination est déterminé par comptage des cellules sur des cellules de Malassez). Les cellules sont maintenues à 37 °C, dans une atmosphère humide avec 10 % de CO₂ et le milieu nutritif DMEM est changé tous les jours. Des monocouches de cellules différenciées sont obtenues après 22 jours de culture à partir du jour de l'ensemencement dans les puits. Deux jours avant les expériences d'adhésion, le milieu nutritif DMEM est dépourvu d'antibiotique.

2.2. Conditions de culture de LGG

Une préculture de LGG (souche WT ou ses mutants de surface) est préparée en inoculant 50 ml de bouillon MRS avec 1 ml de bouillon bactérien qui avait été stocké à -80 °C dans du bouillon MRS avec du glycérol à 20 % (v/v). La préculture est placée à 37 °C pendant 8 h sans agitation avant d'être utilisée pour inoculer 200 ml de bouillon MRS frais. La culture est placée à 37 °C pendant 12 h avant d'être centrifugée à 3 000 g pendant 10 min à température ambiante. Le culot est ensuite lavé avec de l'HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) pour éliminer l'excès de milieu puis centrifugé à nouveau à 3000 g pendant 10 min.

Pour l'étude du rôle du pilus dans l'adhésion de LGG aux cellules intestinales, le culot bactérien est directement mis en suspension dans du milieu de culture cellulaire DMEM contenant seulement 1 % d'acides aminés non essentiels (sans SVF et sans antibiotique) à une concentration d'environ 10^9 UFC/ml.

Pour l'étude de l'effet de l'ajout de MFGM sur l'adhésion de LGG, le culot bactérien est repris dans une solution de MFGM (5 mg/ml, réhydratée dans du DMEM contenant seulement 1 % d'acides aminés non essentiels (sans SVF et sans antibiotique)) à 37 °C. Les bactéries sont mises en contact avec la MFGM pendant 1 h à 37 °C sans agitation. Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation à 500 g pendant 10 min puis remises en suspension dans du DMEM contenant seulement 1 % d'acides aminés (sans SVF et sans antibiotique) à une concentration d'environ 10^9 UFC/ml.

2.3. Tests d'adhésion

Avant l'adhésion, le milieu de culture contenu dans les puits est éliminé. La monocouche de cellules Caco-2 TC7 différenciées est ensuite rincée avec 3 ml d'HBSS préalablement chauffé à 37 °C, délicatement déposé le long de la paroi du puit et non pas directement sur les cellules. Après les rinçages, 3 ml de solution bactérienne (bactéries seules ou ayant été en contact avec la MFGM) sont déposés sur les cellules puis incubées pendant 2 h à 37 °C. Après incubation, le surnageant de chaque puits (3 ml) est récupéré et les monocouches de cellules sont lavées quatre fois avec de l'HBSS, qui sera déposé délicatement le long du puit et non pas directement sur le tapis cellulaire,

pour récupérer les bactéries non adhérentes. Ensuite, les monocouches de cellules sont raclées trois fois avec 1 ml de Triton® (100×, Sigma) à 0,1 % (v/v) puis la solution contenant les cellules et les bactéries adhérentes est passée trois fois dans une aiguille pour séparer les cellules des bactéries puis incubée pendant 30 min à température ambiante. Le nombre de bactéries adhérentes à partir du culot cellulaire et le nombre de bactéries non adhérentes du surnageant et des solutions de lavage est déterminé par dénombrement.

Les dénombrements permettent d'estimer le nombre d'UFC par ml. Pour cela, 1 ml de solution avant adhésion, 1 ml de culot cellulaire ou 1 ml de surnageant sont introduits dans 9 ml de solution de tryptone sel (TS) et la solution est mélangée pendant 1 min en utilisant un vortex. Des dilutions en cascade sont effectuées dans du TS et 100 µl de chaque dilution est étalé sur une gélose de MRS. Après 48 h d'incubation à 37 °C, le nombre de colonies bactériennes est déterminé et exprimé en UFC/ml.

Le nombre de bactéries adhérentes par cellule est déterminé grâce à l'**Équation 9**:

$$\text{Nombre de bactéries adhérentes par cellule} = \frac{3 \times (\text{UFC/ml dans le culot})}{5 \times 10^6}$$

Équation 9 : Détermination du nombre de bactéries adhérentes par cellule

Deux expériences indépendantes ont été réalisées. Pour chaque expérience indépendante, les analyses ont été répétées trois fois.

2.4. Test de toxicité MTT de la MFGM

La toxicité de la MFGM ou des concentrations croissantes de MFGM sur la viabilité des cellules Caco-2 est déterminé par une méthode colorimétrique qui est le test au MTT (3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium). Le principe repose sur la réduction d'un sel de tétrazolium (MTT), un composé jaune est soluble dans l'eau, en formazan par certaines enzymes intracellulaires des cellules vivantes. Le formazan forme un précipité bleu qui peut être solubilisé dans un solvant organique tel que le DMSO (diméthylsulfoxyde). Le dosage du formazan est réalisé

Matériels et méthodes

par spectrophotométrie à 570 nm. La quantité de formazan est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules.

Le test au MTT est réalisé sur une monocouche de cellules Caco-2 différenciées obtenues après 22 jours de culture comme décrit par Bu *et al.* (2016). Le milieu cellulaire contenu sur le tapis de cellules est tout d'abord éliminé et les cellules sont traitées pendant 2 h à 37 °C avec 4 ml de différentes solutions à tester : une solution de DMEM (1% d'acides aminés, sans SVF et sans antibiotiques), qui servira de contrôle, une solution de MFGM à 0,5 mg/ml et une solution de MFGM à 5 mg/ml. Après avoir éliminé les solutions à tester, le tapis cellulaire est rincé doucement avec 1 ml de HBSS. Les cellules sont ensuite incubées avec 3 ml de DMEM (20 % de SVF, 1 % d'acide aminé et 1 % d'antibiotique) et 300 µl de solution de MTT (5 mg/ml dans PBS) pendant 3,5 h à 37 °C. L'élimination du milieu est suivie de l'ajout de 2 ml de DMSO par puits pour permettre la dissolution du formazan. Les solutions contenant des cellules sont diluées dix fois et transférées dans une plaque de 96 puits. La plaque est mise à l'abri de la lumière et agitée à 150 tr/min pendant 10 min. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques à une longueur d'onde de 570 nm.

IV. TECHNIQUES UTILISEES POUR L'ENCAPSULATION DE LGG

1. Encapsulation de LGG par émulsification

Le procédé d'encapsulation est le même que celui décrit par Burgain *et al.* (2013a). Les caséines micellaires et les PS sont préparées séparément en réhydratant les poudres dans de l'eau distillée à une concentration de 12,5 % (m/m) d'extrait sec. La réhydratation est effectuée pendant 2 h à température ambiante (20 °C), puis la solution est maintenue pendant une nuit à 4 °C. Les caséines micellaires et les PS sont ensuite mélangées à différents ratio (m/m): 100/0, 80/20 et 60/40, respectivement. Ensuite, 0,5 g de bactéries lyophilisées sont ajoutés à 200 ml du mélange protéique, soit une concentration finale de 10^8 à 10^9 UFC/g.

La solution de chymosine à 2 IMCU/ml (IMCU - International Milk Clotting Unit) est préparée en diluant cent fois la solution mère (200 IMCU/ml) dans de l'eau distillée. Ensuite, 18 ml de la solution de chymosine fraîchement préparée sont ajoutés aux 200 ml du mélange protéique contenant LGG. La microencapsulation est réalisée par un procédé d'émulsification décrit dans un brevet récent (**Figure 29**) (Burgain *et al.*, 2014b). Le mélange de protéines contenant LGG est mis en contact avec la solution de chymosine (2 IMCU/ml) pendant 30 min sous agitation dans une enceinte fermée thermostatée et réfrigérée à 5 °C grâce à un fluide caloporteur circulant dans la double paroi. La solution est ensuite ajoutée à 800 ml d'huile de tournesol contenant 8 g de Tween 80 à un débit de 8,2 l/h. La solution, elle aussi contenue dans une enceinte fermée thermostatée, est tout d'abord maintenue à 5 °C pendant 10 min. Ensuite, un gradient de température de 5 à 40 °C est appliqué à une vitesse de 1 °C/min. L'excès d'huile est éliminé par filtration et les microparticules sont lavées avec de l'eau distillée et lyophilisées.

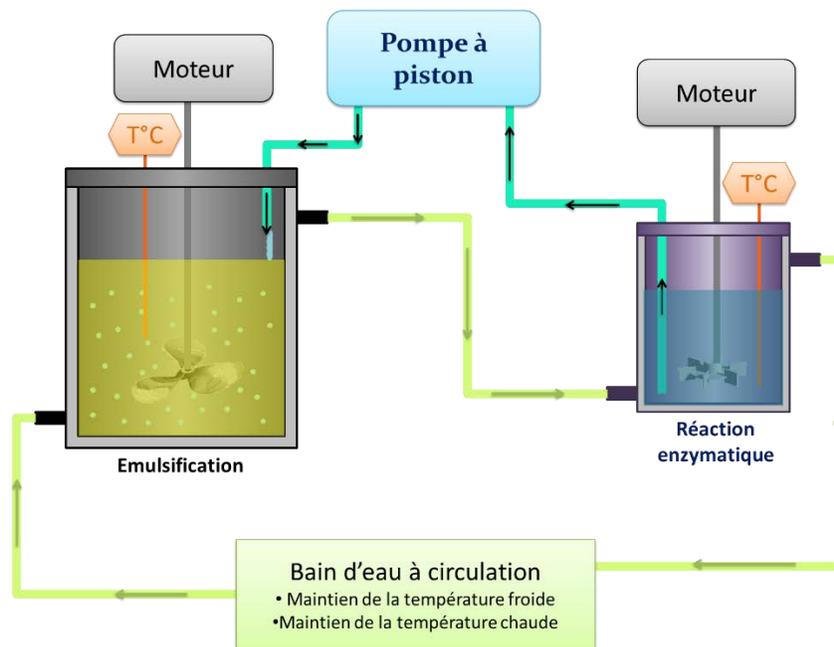


Figure 29 : Procédé d'encapsulation par émulsification (repris de Burgain *et al.*, 2014b)

2. Encapsulation de LGG par séchage par atomisation

2.1. Préparation des solutions protéiques

Une solution de caséine micellaire et une solution de PS sont préparées séparément en réhydratant les poudres dans de l'eau distillée à 12,5 % (m/m) d'extrait sec. La réhydratation est réalisée à l'aide d'un agitateur équipé d'une tige d'agitation (IKA, Staufen, Allemagne) et d'un mobile de type turbine de Rushton. La réhydratation a lieu à une vitesse de 1 000 tr/min pendant 2 h à température ambiante (20 °C), puis pendant une nuit à 4 °C. Après réhydratation, les PS sont dénaturées par chauffage de la solution à 78 °C pendant 10 min (Petit *et al.*, 2011) puis la solution est refroidie à 4 °C. La solution de chymosine est préparée en diluant cent fois la solution initiale (200 IMCU/ml) dans de l'eau distillée.

2.2. Préparation de la suspension bactérienne

Pour le séchage par atomisation de grandes quantités de bactéries sont nécessaires. La croissance de LGG est donc réalisée dans un réacteur à échelle de laboratoire. Les stocks bactériens utilisés pour l'inoculation sont stockés à -80 °C dans du bouillon MRS contenant du glycérol à 20 % (v/v). Une préculture est préparée en inoculant LGG dans 200 ml de bouillon MRS à 37 °C pendant 15 h. Le bioréacteur contenant 1 L de milieu MRS frais est inoculé avec toute la préculture. La croissance de LGG est effectuée à 37 °C sous agitation à 300 tr/min et le pH est ajusté automatiquement à 6,8 avec l'addition de NaOH 6 M. La concentration des cellules est déterminée en suivant l'absorbance à 660 nm. La culture est arrêtée au début de la phase stationnaire et les cellules bactériennes sont récoltées par centrifugation douce (3 000 g, 10 min). Le culot est tout d'abord rincé avec de l'eau physiologique pour éliminer les dernières traces de milieu et de nouveau centrifugé. Le culot est ensuite lyophilisé pendant 72 h et conservé à 4 °C avant utilisation.

2.3. Séchage par atomisation

Le concentré est préparé en mélangeant la solution de caséines micellaires et la solution de PS dénaturées dans un rapport de 90/10 (v/v), respectivement. Le concentré peut être incubé ou non avec une solution de chymosine avant la pulvérisation de la solution dans la tour de séchage. Lorsque le concentré est incubé avec de la chymosine avant la pulvérisation, la solution de chymosine est ajoutée au concentré à une concentration finale en chymosine de 12 IMCU/g de protéines. Le concentré protéique en présence de chymosine est agité pendant 30 min à une température de 8 °C pour permettre le clivage du caséinomacropéptide par l'action de la chymosine tout en évitant la coagulation de la caséine (Burgain *et al.*, 2013a, 2014b). Après l'étape de clivage enzymatique et avant pulvérisation, les bactéries lyophilisées sont ajoutées dans le concentré à une concentration d'environ 10⁸ CFU/g. Dans le cas où le concentré protéique n'est pas incubé avec la solution de chymosine, les bactéries sont directement ajoutées dans le concentré avant la pulvérisation. Après incubation, la solution contenant LGG est séchée par atomisation en utilisant une tour de séchage à l'échelle pilote MicraSpray 150 (Anhydro, Soeborg, Danemark). Une pompe péristaltique est utilisée pour faire circuler le concentré à travers la buse bi fluide avec un débit de 87 ml/min et une pression d'air de pulvérisation de 1 bar. Différentes températures théoriques d'air

Matériels et méthodes

de sortie sont mises en œuvre: 85, 70 et 55 °C. Les températures réelles (mesurées) d'entrée et de sortie sont recueillies dans le **Tableau 9**. Les microparticules séchées par pulvérisation sont stockées dans des pots en plastique à 4 °C avant utilisation. Deux productions indépendantes sont réalisées. Un thermohygromètre (testo 635, Testo®, Forbach, France) a été placé à la sortie du cyclone pour mesurer l'humidité relative et la température de l'air humide (**Tableau 9**).

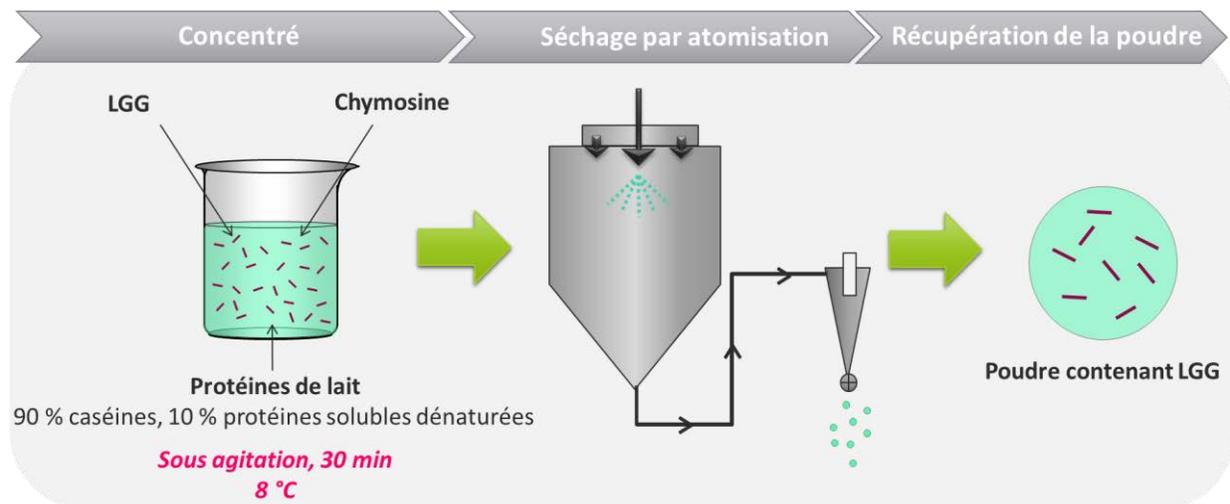


Figure 30 : Encapsulation de LGG par séchage par atomisation

Tableau 9 : Paramètres mesurés lors du séchage par atomisation (température d'air de sortie, température d'air d'entrée et humidité relative en sortie de cyclone)

Matrice	Température d'air de sortie (°C)		Température air entrée (°C)		Humidité relative de l'air de sortie (%)		
	Théorique	Mesurée		Mesurée		Mesurée	
		Lot 1	Lot 2	Lot 1	Lot 2	Lot 1	Lot 2
Sans chymosine	85	83,6 ± 0,8	84,9 ± 0,4	192,1 ± 0,1	204,7 ± 0,4	10,5 ± 0,3	7,3 ± 0,3
	70	67,7 ± 0,1	69,9 ± 0,3	159,6 ± 0,7	170,6 ± 0,4	20,7 ± 0,4	12,6 ± 0,3
	55	53,2 ± 0,2	55,5 ± 0,1	135,6 ± 0,7	145,5 ± 0,3	39,8 ± 0,1	31,4 ± 0,2
Avec chymosine	85	85,7 ± 0,2	85,8 ± 0,4	187,0 ± 0,3	197,7 ± 0,7	8,0 ± 0,2	8,4 ± 0,3
	70	68,4 ± 0,4	70,0 ± 0,4	160,6 ± 0,7	173,7 ± 0,2	16,1 ± 0,3	13,3 ± 0,2
	55	55,9 ± 0,2	55,3 ± 0,4	132,2 ± 1,3	147,1 ± 0,9	27,6 ± 0,9	31,1 ± 0,2

V. DIGESTION DES MICROPARTICULES

Plusieurs méthodes *in vitro* ont été développées pour simuler les conditions physiologiques de la digestion gastro-intestinale humaine. Bien que les études *in vivo* chez l'Homme soient toujours considérées comme la meilleure méthode pour étudier les phénomènes de digestion, les méthodes *in vitro* sont très utilisées dans la littérature car elles ont l'avantage d'être plus rapides, moins coûteuses, moins exigeantes en main-d'œuvre, très reproductibles grâce aux conditions contrôlées et n'ont pas de contraintes éthiques (Minekus *et al.*, 2014; Alegria *et al.*, 2015). Ces méthodes statiques tentent d'imiter les conditions physiologiques retrouvées *in vivo*, en tenant compte de la présence d'enzymes digestives et de leurs concentrations, du pH, du temps de digestion et des concentrations en sel. Par contre, certains inconvénients apparaissent comme l'impossibilité de mimer l'environnement dynamique du tube digestif ou encore le manque de prise en compte de certains facteurs comme l'âge ou l'état physiologique (Alegria *et al.*, 2015). Pour pallier cela, il existe actuellement des modèles de digestion dynamique *in vitro* (Thuenemann, 2015) qui permettent de mimer les vitesses de transfert des aliments d'un compartiment du tube gastro-intestinal à un autre en fonction de leur structure, de leur teneur calorique, de leur osmolarité et de leurs propriétés rhéologiques. Ils peuvent également prendre en compte les modifications physico-chimiques du milieu gastrique et intestinal avec le temps (pH, force ionique, concentrations en enzymes digestives). Parmi ces modèles on retrouve le modèle TIM, le modèle SHIME®, le modèle DIDGI® et le modèle SIMGI® (Dupont & Mackie, 2015). Seulement, ces modèles dynamiques ne sont pas disponibles facilement du fait des propriétés intellectuelles et sont compliqués à mettre en œuvre, c'est pourquoi actuellement le modèle statique reste le plus utilisé dans la littérature. Le modèle sélectionné pour notre étude est issu d'un consensus international récent (Minekus *et al.*, 2014). Ce consensus donne un protocole détaillé pour effectuer la digestion statique dans des conditions mimant au mieux ce qui se passe chez l'Homme. Ce consensus a pour but d'harmoniser les méthodes employées pour mimer la digestion de façon statique afin de rendre comparable les résultats de la littérature.

1. Préparation des solutions

Les compositions de la solution saline gastrique (SSG) et celle de la solution saline intestinale (SSI) sont présentées dans le **Tableau 10**. La SSG est ajustée à pH 3,0 en utilisant de l'HCl 6M et la SSI est ajustée à pH 7,0 en utilisant du NaOH 1M.

Tableau 10: Composition des solutions salines gastriques et intestinales

	Concentration dans la SSG (mmol/l)	Concentration dans la SSI (mmol/l)
KCl	6,90	6,80
KH ₂ PO ₄	0,90	0,80
NaHCO ₃	25,00	85,00
NaCl	47,20	38,40
MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,10	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,50	-

Différentes enzymes sont utilisées pour étudier la digestion : la pepsine et la pancréatine respectivement pour la digestion gastrique et intestinale. Du fait de sa forte homologie (84 %) avec la pepsine humaine et de son faible coût, la pepsine porcine (P6887, Sigma) est un produit de choix pour les études *in vitro*. L'activité donnée par le fournisseur est d'ailleurs vérifiée en mesurant la libération de tyrosine en présence d'hémoglobine (données non présentées). La pancréatine porcine (P7545, Sigma), sous forme de poudre, a été utilisée. L'activité trypsique (principale activité enzymatique pancréatique) de cette dernière est mesurée à l'aide de la méthode au *p*-toluène-sulfonyl-L-arginine méthyl ester (TAME) (données non présentées).

De l'extrait de bile a été utilisé lors de la digestion intestinale. L'extrait de bile nécessite auparavant l'analyse de son contenu en acides biliaires. Cette analyse est réalisée à l'aide d'un kit spécifique (kit acides biliaires, DiagnosticSystems GmbH, Allemagne) (données non présentées).

2. Digestion gastrique et intestinale

Lors de la digestion gastrique, les microparticules contenant LGG réhydratées dans de l'eau distillée sont mélangées avec la SSG (1:1, v/v) contenant 0,075 mM de CaCl₂. La pepsine, sous

forme de poudre, est fraîchement ajoutée à la solution de digestion. L'activité recommandée est de 2 000 U/ml de solution finale de digestion. Le pH est ajusté pour atteindre une valeur finale de 3,0 au début de la phase gastrique. La digestion gastrique se déroule pendant 2 h à 37 °C sous agitation (**Figure 31**).

Après les deux heures de digestion gastrique, le chyme gastrique est mélangé avec la SSI (1:1, v/v) contenant 0,3 mM de CaCl₂. Le mélange est neutralisé à pH 7,0 au début de la digestion intestinale. L'équivalent de 100 U/ml de pancréatine est ajouté au contenu de la phase intestinale. Enfin, l'ajout d'une quantité de bile de 20 mmol/l, correspondant à une concentration finale de 10 mmol/l est réalisé (**Figure 31**).

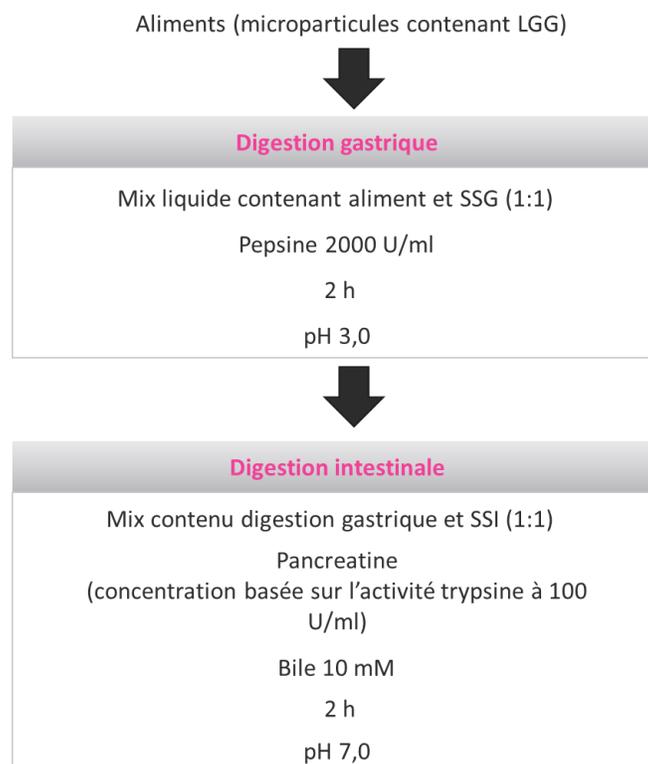


Figure 31 : Etapes de digestion gastro-intestinale simulée *in vitro* (adapté de Minekus *et al.*, 2014). SSG : solution saline gastrique ; SSI : solution saline intestinale

Les microparticules sont prélevées en cours de digestion et du tampon phosphate (PBS, pH 7,4) est ajouté pour stopper les réactions enzymatiques. Elles sont analysées par des techniques d'imagerie à différents stades de la digestion : en début de phase gastrique (quelques secondes après le début de la phase gastrique), en fin de phase gastrique (après 2 h en phase gastrique) et en fin de phase intestinale (après 2 h dans la phase intestinale).

VI. CARACTERISATION DES POUDRES PRODUITES PAR ATOMISATION

1. Taux de survie des bactéries

1.1. Dénombrement de LGG avant et après séchage

Pour évaluer la survie de LGG pendant l'encapsulation, les bactéries ont été dénombrées avant et après séchage par pulvérisation. Les dénombrements sont réalisés en déterminant le nombre d'UFC dans 1 ml de concentré avant séchage par pulvérisation et dans 1 g de poudre obtenue après séchage. Pour cela, 1 ml de concentré ou 1 g de poudre est introduit dans 9 ml de bouillon de TS et la solution est mixée pendant 1 min en utilisant un vortex. Des dilutions en série sont effectuées dans du TS et chaque dilution est étalée sur une gélose de MRS. Après 48 h d'incubation à 37 °C, les numérations bactériennes sont déterminées et exprimées en \log_{10} UFC/g. La masse volumique du concentré est mesurée pour pouvoir traduire le volume de 1 ml de concentré en grammes. Pour cela, un volume connu de concentré est pesé. L'expérience est réalisée en triple pour chaque formulation.

1.2. Effet du cisaillement induit par la buse bi-fluide sur la viabilité et l'organisation cellulaire de LGG

Pendant le séchage par pulvérisation, les cellules bactériennes sont exposées à des contraintes de cisaillement élevées lors du passage à travers la buse bi-fluide. Le cisaillement crée un stress chez la bactérie qui peut affecter son organisation cellulaire et sa viabilité. Pour vérifier cela, le concentré de protéines est incubé préalablement avec de la chymosine ou non et mis en contact avec les cellules bactériennes avant d'être pulvérisé à travers la buse à une pression d'air de 1 bar, un débit de 87 ml/min pour imiter les conditions de pulvérisation lors du séchage par atomisation. La solution est recueillie à une distance d'environ 50 cm de la sortie de la buse, évitant ainsi d'altérer la formation de gouttelettes dans la pulvérisation tout en maximisant la récupération du concentré

atomisé. Les comptages des bactéries sont réalisés avant et après la pulvérisation, comme décrit dans la section 1.1, ci-dessus. Un facteur de cisaillement a été déterminé d'après l'Équation 10 :

$$\text{Facteur de cisaillement} = \frac{10^{[\log_{10} \text{CFU/ml}]_{\text{after drying}}}}{10^{[\log_{10} \text{CFU/ml}]_{\text{before drying}}}}$$

Équation 10 : Détermination du facteur de cisaillement

L'organisation cellulaire avant et après la pulvérisation est observée par une coloration Gram. Pour cela, une goutte du concentré contenant LGG avant et après pulvérisation est fixée sur une lame en verre. Une fois fixé, le concentré est doucement recouvert par une solution cristal violet pendant 1 min. La lame est rincée avec de l'eau et la même procédure est répétée avec une solution de lugol. Après décoloration du concentré avec de l'éthanol à 90 %, une nouvelle coloration avec une solution de fuchsine pendant 1 min est effectuée. Une fois rincé avec de l'eau, le concentré est observé en utilisant un microscope optique sous une immersion d'huile (objectif × 100).

2. Caractérisation physicochimique des poudres

2.1. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau est déterminée par pesée et étuvage à 103 °C suivant la norme ISO/IDF (2004). Pour cela, 2 g de poudre sont étuvés pendant 3 h, puis refroidis au dessiccateur avant d'être pesés. La teneur en eau, exprimée en pourcentage massique en base humide, est calculée par l'Équation 11:

$$\text{Teneur en eau (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Équation 11 : Détermination de la teneur en eau

Avec m_0 : la masse de la capsule vide et du couvercle séchés (g)

m_1 : la masse de la capsule et de la prise d'essai avant séchage (g)

m_2 : la masse de la capsule et de la prise d'essai après séchage (g)

2.2. Détermination de la taille des particules

La distribution de taille des particules est déterminée par diffusion statique de la lumière grâce à un granulomètre Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Limited, Works, UK). La diffraction laser mesure les distributions granulométriques des particules en mesurant la variation angulaire de l'intensité de lumière diffusée lorsqu'un faisceau laser traverse un échantillon de particules dispersées. Les grosses particules diffusent la lumière à de petits angles par rapport au faisceau laser et les petites particules diffusent la lumière à des angles supérieurs. Grâce à la théorie de Mie, les données relatives à l'intensité diffusée en fonction de l'angle sont analysées pour calculer la taille des particules qui ont créé l'image de diffraction.

Afin de mesurer la taille des poudres produites par atomisation, un module de dispersion spécifique aux poudres par effet Venturi, Aero S, a été utilisé. Pour obtenir une obscuration correcte, tous les échantillons sont dispersés à une pression d'air de 1 bar, une vitesse d'alimentation de 30 % et une hauteur de trémie de 3 mm. Cinq mesures sont effectuées pour chaque échantillon. Les distributions en volume seront considérées dans ce travail. La taille des particules est exprimée en utilisant le $d(50)$, qui signifie que 50 % des particules ont un diamètre inférieur à cette valeur.

2.3. Détermination de la capacité de réhydratation des poudres

2.3.3. Mouillabilité, dispersibilité et solubilité

Toutes les expériences sont effectuées dans de l'eau à 20 °C. La mouillabilité d'une poudre est le temps nécessaire pour que la quantité totale de poudre soit mouillée par l'eau. La dispersibilité est la proportion de matière sèche en poudre qui peut être dispersée dans l'eau (Niro Atomizer, 1978). Ces deux propriétés sont déterminées comme décrit par les normes ISO/IDF (1979) avec quelques modifications en raison de la faible quantité de poudre disponible. Seulement 2,5 g de poudre sont déposées dans 25 g d'eau distillée. La solubilité est la capacité d'une poudre à être dissoute dans l'eau (Niro Atomizer, 1978). Elle est exprimée en pourcentage et est déterminée en utilisant la norme ISO/IDF (2005).

Pour les résultats concernant la solubilité de la poudre en fonction de la température de l'eau, le protocole pour mesurer la solubilité est modifié pour mettre en évidence les différences de

solubilité en fonction de la température de l'eau : le temps de réhydratation avant la mesure de la solubilité est bien plus long (30 min au lieu de 30 s). En effet, la poudre est réhydratée pendant 30 min dans de l'eau à 8, 15, 20, 30 et 40 °C avant de mesurer sa solubilité.

2.3.4. Turbidité

La réhydratation des poudres produites par séchage par atomisation (0,1 %, m/m) est effectuée dans de l'eau à 8 ou 40 °C pendant 120 min et la suspension est placée dans une cellule en verre. La stabilité de l'échantillon après réhydratation est suivie en utilisant un Turbiscan Classique (Formulation, France). Cet appareil utilise le principe de la diffusion multiple de la lumière qui consiste à éclairer un échantillon liquide avec une source lumineuse proche de l'infrarouge ($\lambda=800$ nm). Après diffusion multiple, les photons émergent de l'échantillon et sont détectés par deux détecteurs : un détecteur de transmission qui reçoit la lumière transmise à travers l'échantillon (dans la même direction que la source lumineuse) et un détecteur de rétrodiffusion qui reçoit la lumière réfléchiée par l'échantillon (à 135° par rapport à la source lumineuse) (**Figure 32**). Les lumières transmises et rétrodiffusées donnent respectivement des informations sur la transparence et l'opacité de l'échantillon. Toute la hauteur de la cellule est balayée par la tête de détection, en acquérant des données de transmission et de rétrodiffusion tous les 40 μm . L'échantillon est analysé toutes les minutes pendant 30 min.

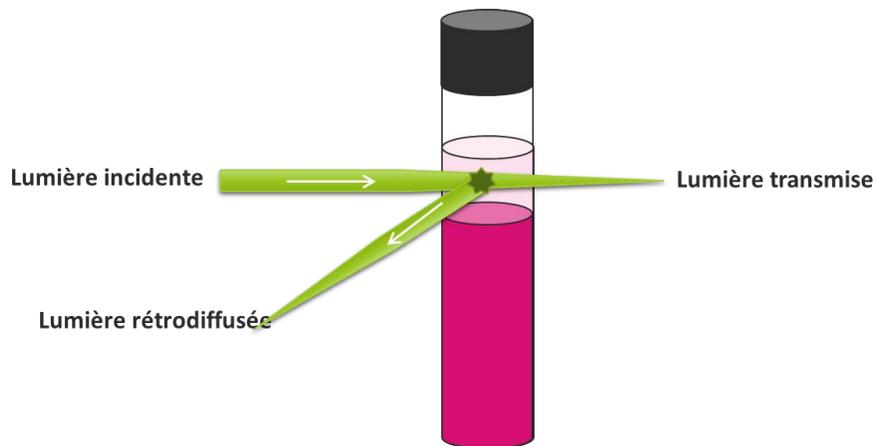


Figure 32 : Principe de la mesure de turbidité avec le Turbiscan

VII. TECHNIQUES DE MICROSCOPIE

Les analyses microscopiques sont tout d'abord réalisées sur les microparticules produites par émulsification puis lyophilisées. Un microscope électronique à balayage (MEB) est utilisé pour observer la surface et l'intérieur des microparticules avant et en cours de digestion. Cela permet de visualiser la structure des particules avant et au cours de la digestion et d'observer la localisation des bactéries dans les particules. Un microscope confocal est utilisé pour différencier dans les microparticules fraîches et en cours de digestion, les bactéries « vivantes », ayant une membrane plasmique intacte, et les bactéries « mortes », avec une membrane endommagée. Toutes ces analyses ont été faites à l'Université de Queensland (Brisbane, Australie).

Des analyses microscopiques sont également effectuées sur les poudres produites par atomisation. Le MEB est utilisé pour observer la structure des poudres et leur comportement lors de la réhydratation à différentes températures.

1. Microscopie électronique à balayage

En MEB, l'image est formée par balayage d'un faisceau d'électrons accéléré par une tension relativement faible (< 1 à 30 kV). Les électrons rétrodiffusés et/ou secondaires sont alors recueillis en synchronisant la détection du balayage du faisceau incident. Une image de surface est ainsi obtenue. Un microscope électronique à balayage à haute résolution de type EOL JSM-7100F équipé d'un canon Schottky à électrons chauds (JEOL Ltd., Tokyo, Japon) et ayant une résolution d'environ 1 nm à 30 kV est utilisé pour étudier les microparticules à sec et en cours de réhydratation. L'équipement fonctionne, pour nos échantillons, à 5 kV uniquement.

Pour observer les microparticules en cours de réhydratation, les échantillons sont montés sur le support du MEB en les pulvérisant sur un ruban adhésif double face en carbone. L'enrobage est réalisé avec de l'iridium (Q150T Turbo-Pumped Sputter Coater, ProSciTech Pty Ltd, Queensland, Australie) pendant 2 min sur les trois côtés (environ 10 nm d'épaisseur par côté).

Pour les particules hydratées au cours de la réhydratation, l'observation est réalisée selon un protocole développé par Mimouni *et al.* (2010), avec quelques modifications. La suspension de particules hydratées est déposée sur une puce de silicium (ProSciTech, Kirwan, Australie) préalablement recouverte de poly-L-Lys (Sigma, Castle Hill, Australie). Les particules peuvent ainsi adhérer au support via des interactions électrostatiques. La suspension est maintenue en contact avec le support pendant 5 min, puis l'ensemble est rincé doucement avec du tampon phosphate 100 mM (pH = 7). La fixation chimique des particules hydratées est effectuée en immergeant le support dans une solution composée de 2,5 % de glutaraldéhyde dans du tampon phosphate 100 mM pendant 15 min. Ensuite, les échantillons sont doucement lavés dans du tampon phosphate 100 mM et déshydratés en utilisant successivement des bains à concentration croissantes en éthanol : 50, 60, 70, 80, 90 % (une fois) et 100 % (trois fois). Le temps passé dans chaque solution est de 3 min (Dalglish *et al.*, 2004). Les échantillons sont ensuite séchés en utilisant du CO₂ dans un sécheur à point critique Autosamdri-815B (Tousimis, Rockville, MD, ETATS-UNIS). Enfin, les échantillons sont recouverts par une fine couche d'iridium pendant 2 min (jusqu'à atteindre environ 10 nm d'épaisseur).

2. Microscopie confocale à balayage laser

La viabilité de LGG et plus précisément l'intégrité de sa paroi, était impossible à vérifier par MEB. Par conséquent, un marquage sélectif avec des sondes fluorescences est utilisé afin de différencier les cellules aux parois intactes ou endommagées par CLSM. Les bactéries ayant une paroi intacte sont considérées comme vivantes et les bactéries ayant une membrane endommagée comme mortes.

Le principe du microscope confocal consiste à focaliser, par l'intermédiaire d'un objectif, un faisceau laser pour illuminer un point de l'échantillon, puis à récupérer, sur un photomultiplicateur, le signal lumineux émis en ce point. Un diaphragme (pinhole) est placé devant le photomultiplicateur et permet de filtrer tout signal ne provenant pas du plan focal. Le signal reçu est ensuite amplifié grâce au photomultiplicateur, traité afin d'améliorer le rapport signal sur bruit et enfin numérisé. L'image est construite point par point grâce à un balayage sur la surface (x ; y).

Matériels et méthodes

L'échantillon peut également être déplacé suivant l'axe z permettant ainsi de réaliser différents plans optiques dans l'épaisseur de l'objet.

Pour la CLSM, les microparticules sont colorées en utilisant un kit de viabilité bactérienne LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular sondas, Thermofisher) (Auty *et al.*, 2001). Les bactéries possédant une paroi intacte ou endommagée sont distinguées grâce à deux colorants fluorescents : le SYTO 9 et l'iodure de propidium. Ces deux colorants diffèrent à la fois par leurs caractéristiques spectrales et par leur capacité à pénétrer dans des cellules bactériennes saines. Le SYTO 9 possède des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 485 et 530 nm, respectivement. Le SYTO 9 émet donc une fluorescence verte dans le spectre du visible. Lorsqu'il est utilisé seul, le SYTO 9 marque toutes les bactéries en vert (celles qui ont des membranes intactes et celles qui ont des membranes endommagées). L'iodure de propidium possède des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectivement de 485 et 630 nm. Il émet donc une fluorescence rouge dans le spectre du visible. L'iodure de propidium ne pénètre que dans les bactéries ayant des membranes endommagées ce qui entraîne une réduction de la fluorescence du SYTO 9 lorsque les deux colorants sont présents. Ainsi, un mélange de SYTO 9 et d'iodure de propidium marque les bactéries avec des membranes cellulaires intactes en vert et les bactéries avec des membranes endommagées en rouge.

Les colorants du kit BacLight LIVE/DEAD sont mélangés de la manière suivante : le SYTO 9 et l'iodure de propidium sont chacun dissous séparément dans 1 ml d'eau distillée pour donner des concentrations finales respectivement de 60 et 300 mM. Un mélange de la solution de SYTO 9 (75 µl), d'iodure de propidium (25 µl) et d'eau (400 µl) est effectué et placé sous agitation grâce à un vortex pendant 1 min. Ce rapport a déjà été utilisé pour colorer des bactéries présentes dans différents produits laitiers et s'est avéré ici optimal pour la production d'un signal vert de fluorescence adéquat (Auty *et al.*, 2001).

En cours de digestion, les microparticules sont prélevées et placées dans du tampon phosphate (pour neutraliser le pH), centrifugées doucement (1500 g, 5 min) pour éliminer le tampon et ajoutées au mélange de coloration entre 10 et 30 min selon la taille des particules pour permettre aux composants de coloration d'accéder à l'intérieur des microparticules. Les observations ont été réalisées grâce à un microscope confocal à balayage laser LSM700 (Carl Zeiss Ltd., New South Wales 2113, Australie), équipé d'un objectif 63 × (immersion huile). Le rapport

excitation/émission utilisé pour la coloration avec le SYTO 9 était de 488/500 nm (signal de fluorescence vert) et de 488/635 nm pour l'iodure de propidium (signal de fluorescence rouge). Les images présentées sont représentatives d'au moins 5 images de chaque échantillon pour chaque condition expérimentale.

VIII. RHEOLOGIE

La rhéologie étudie l'écoulement ou la déformation des corps sous l'effet de contraintes qui leur sont appliquées, en fonction de la vitesse d'application de ces contraintes ou plus généralement de leur variation au cours du temps. La rhéologie a été utilisée pour étudier le comportement viscoélastique d'une matrice protéique au cours de sa gélification et pour étudier la déformation d'un gel grâce à un test de compression.

1. Mesure de viscoélasticité

Le test viscoélastique consiste à imposer à l'échantillon un cisaillement oscillatoire durant lequel la contrainte et la vitesse de cisaillement évoluent sinusoïdalement avec la même pulsation mais en présentant un certain déphasage l'une par rapport à l'autre. L'analyse des mesures fournies par ces signaux sinusoïdaux permet de définir un certain nombre de grandeurs viscoélastiques caractéristiques de l'échantillon : le déphasage δ , le module de conservation G' et le module de perte G'' . Le déphasage δ correspond au déphasage entre la contrainte et la déformation de cisaillement. Le module de conservation G' décrit les propriétés élastiques de l'échantillon et le module de perte G'' décrit ces propriétés visqueuses. Ces deux grandeurs sont exprimées en Pascal. Le déphasage δ est relié à ces deux modules par la relation : $\tan \delta = G''/G'$. Dans le cas d'un solide élastique parfait, $\tan \delta = 0^\circ$ ($G'' = 0$) et dans le cas d'un liquide visqueux parfait $\tan \delta = 90^\circ$ ($G' = 0$). La valeur de δ (aussi appelé angle de perte) indique ainsi le partage entre les propriétés élastiques et visqueuses de l'échantillon : pour $0^\circ < \delta < 45^\circ$, l'échantillon a un comportement plus élastique que visqueux (comportement de solide) alors que c'est l'inverse (comportement de liquide) pour $45^\circ < \delta < 90^\circ$ (Grossiord & Quemada, 2012).

Un rhéomètre Kinexus Pro (Malvern Instruments, KNX 2100, UK) a été utilisé pour caractériser la formation et la structure du gel protéique laitier. L'appareil est équipé d'une géométrie coaxiale et d'une base conique. Les solutions protéiques laitières sont préparées et incubées avec de la chymosine préalablement diluée au 1/100^{ème} (2 IMCU/ml) pendant 30 min à 4 °C avant d'être introduites dans la base conique. Les modules élastiques (G') et visqueux (G'') de la solution de

protéines sont étudiés en mode oscillatoire à une fréquence de 1 Hz et une contrainte de 6 % dans la gamme de viscoélasticité linéaire. Une rampe de température allant de 5 à 40 °C est appliquée, avec une augmentation de température de 1 °C/min (rampe de température identique à celle appliquée lors du processus d'encapsulation). L'avantage de l'appareil est que la montée et la descente en température par effet Peltier sont rapides et précises ($\pm 0,01$ °C). G' et G'' sont mesurés en fonction de la température (**Figure 33**).

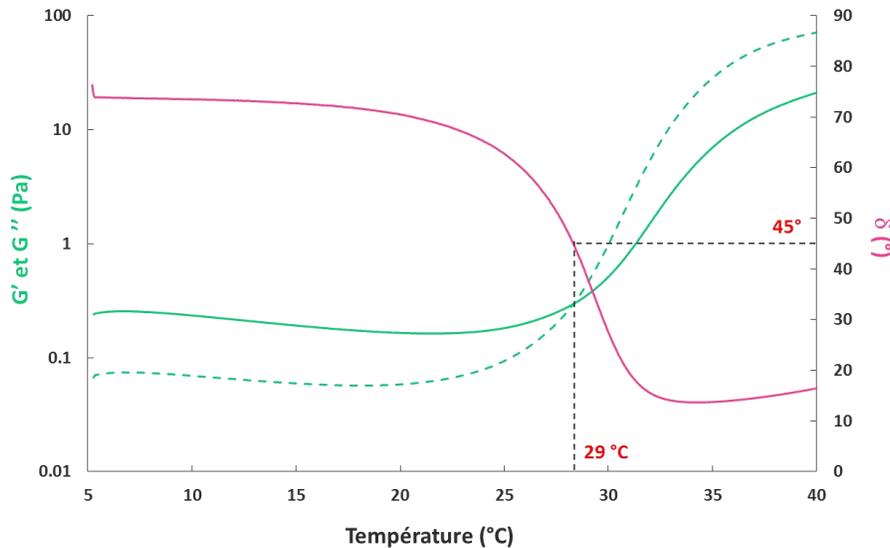


Figure 33 : Suivi des modules d'élasticité (G' , courbe en pointillé) et de viscosité (G'' , courbe pleine) et du déphasage lors de la coagulation enzymatique de protéines lactières

Aux faibles températures (< 25 °C), il n'y a pas ou peu de variation des modules G' et G'' . G'' est supérieur à G' dans cette zone donc le comportement est majoritairement visqueux. Par contre lorsque la température augmente à une valeur proche de 29 °C, les courbes G' et G'' se rapprochent pour finalement se croiser. L'intersection de ces courbes permet de déterminer la température de gélification. A des températures supérieures à la température de gélification, G' devient supérieur à G'' donc le comportement est majoritairement élastique. Aussi, l'augmentation de température modifie l'angle de perte δ . Le passage d'une température de 5 à 40 °C fait diminuer la valeur de δ de 76° à 15°. Une autre façon de déterminer la température de gélification est d'observer la température pour laquelle la valeur de δ atteint 45°. Cette valeur correspond au croisement des courbes G' et G'' .

2. Etude de la déformation des gels

Pour étudier la déformation d'un gel, un test de compression a été utilisé. Ce test consiste à mesurer la résistance que présente un gel en réponse à une compression qui lui est appliquée. Ces analyses sont réalisées pour étudier la déformation des gels formés à partir de différentes formulations de matrice. Les gels protéiques sont formés sur le rhéomètre liquide comme décrit dans le paragraphe ci-dessus et leur stabilité mécanique est étudiée à l'aide d'un test de compression. Les mesures sont faites sur des gels fraîchement formés et sur des gels placés 2 h dans une solution mimant la digestion gastrique. La compression des gels s'effectue entre deux plaques parallèles, comme décrit par Ben Messaoud *et al.* (2016), avec quelques modifications. Pour réaliser ces mesures, un rhéomètre Kinexus Pro équipé de deux plaques parallèles de 40 mm de diamètre a été utilisé. La hauteur des gels analysés était de 5 mm et la compression a eu lieu sur une hauteur allant de 5 mm à 0,1 mm avec une vitesse de compression linéaire de 10 $\mu\text{m/s}$. La force que subit le gel est mesurée en fonction du déplacement de la plaque supérieure (**Figure 34**). Le déplacement est directement relié à l'épaisseur de l'échantillon. Le déplacement initial pour une force nulle sera de 0 mm et l'épaisseur de l'échantillon de 5 mm. En augmentant la force, le déplacement sera augmenté et l'épaisseur de l'échantillon réduit.

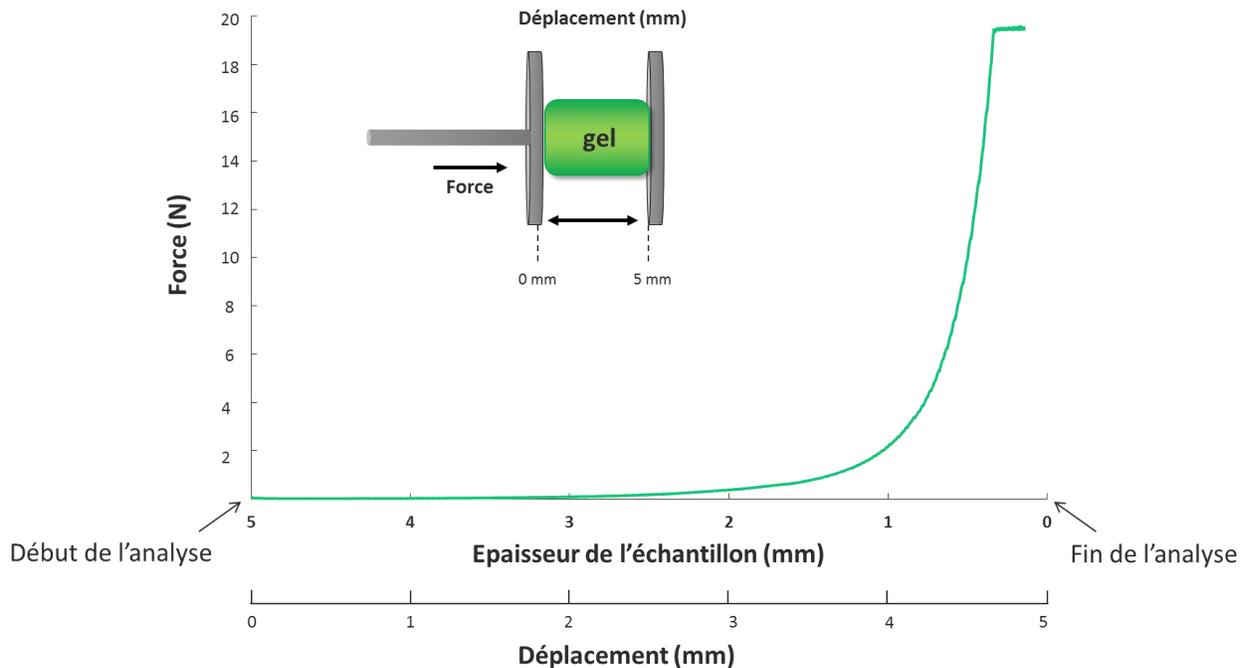


Figure 34 : Suivi de la force lors de la compression du gel protéique

IX. PLAN DE MELANGE

Le plan de mélanges est un type de plan d'expériences où les facteurs représentent les constituants des mélanges, dans lesquels les proportions des constituants varient (Buruk Sahin *et al.*, 2016). Dans les plans d'expériences classiques, le niveau d'un facteur peut être choisi indépendamment des niveaux déjà attribués aux autres facteurs. Dans les plans de mélanges, la proportion de chaque constituant est liée à celles des autres constituants. La somme des proportions des constituants du mélange est égale à 100 %, le pourcentage du dernier constituant est imposé par la somme des premiers composés (Goupy & Creighton, 2013). Si x_i est la teneur du constituant i , la somme des teneurs de tous les constituants du mélange suit la relation suivante :

$$0 \leq x_i \leq 1 \quad i = 1, 2, \dots, q \quad \sum_{i=1}^q x_i = 1$$

Équation 12 : Détermination de la somme des constituants du mélange

Dans ce manuscrit, un plan de mélanges est utilisé pour caractériser des gels présures. Quatre constituants ont été sélectionnés dans ces études : caséines, PS natives, PS dénaturées et MFGM. Les contraintes supérieures et inférieures choisies pour chacun des constituants des mélanges sont présentées dans le **Tableau 11**. Les réponses exploitées pour étudier l'influence des différents constituants des mélanges sur la qualité du gel formé sont : la teneur en eau du gel, le module élastique G' et le module visqueux G'' du gel formé et la température de gélification. Les réponses expérimentales sont présentées dans le **Tableau 12**.

Tableau 11 : Limites inférieures et supérieures choisies pour la proportion des constituants des mélanges

	Facteur	Limite inférieure (%)	Limite supérieure (%)
Caséines	1	80	100
PS natives	2	0	20
PS dénaturées	3	0	20
MFGM	4	0	20

Une matrice classique centrée de Scheffé d'ordre 3 a été utilisée et son détail est présenté dans le **Tableau 12**. Les résultats peuvent être divisés en trois groupes : les expériences de 1 à 10

Matériels et méthodes

permettent de construire le modèle, les expériences de 11 à 14 représentent les répétitions au centre et les points de 16 à 18 sont les points tests ajoutés.

Le modèle suivi pour calculer les réponses de l'ensemble du domaine suit l'équation suivante :

$$y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{1-2}(x_1x_2) + b_{1-3}(x_1x_3) + b_{2-3}(x_2x_3) + b_{1-4}(x_1x_4) + b_{2-4}(x_2x_4) + b_{3-4}(x_3x_4) + b_{1-2-3}(x_1x_2x_3) + b_{1-2-4}(x_1x_2x_4) + b_{1-3-4}(x_1x_3x_4) + b_{2-3-4}(x_2x_3x_4)$$

Équation 13 : Modèle utilisé pour calculer les réponses sur l'ensemble du domaine

Avec y représentant la réponse, x , les facteurs étudiés et b les coefficients.

Tableau 12 : Matrice du plan de mélanges et réponses expérimentales. La colonne « Rang » représente l'ordre du déroulement des expériences

N° exp	Rang	Proportions des mélanges (%)				Réponses			
		Caséines	PS natives	PS dénaturées	MFGM	Teneur eau (%)	G' (Pa)	G'' (Pa)	T _{gel} (°C)
1	9	100	0	0	0	79.8	84.6	31.1	30.6
2	17	80	20	0	0	81.4	62.5	21.4	28.3
3	12	80	0	20	0	85.3	39.7	10.5	27.5
4	4	80	0	0	20	83.6	135.5	47.2	28.0
5	5	90	10	0	0	80.8	57.6	20.8	30.4
6	8	90	0	10	0	82.1	14.9	4.3	29.9
7	18	90	0	0	10	82.1	224.1	77.5	27.7
8	15	80	10	10	0	82.2	72.5	21.6	28.2
9	14	80	10	0	10	80.9	148.0	50.8	26.5
10	7	80	0	10	10	83.1	82.9	24.9	28.1
11	10	86,67	6,67	6,67	0,00	82.9	130.6	43.5	28.1
12	6	86,67	6,67	0,00	6,67	79.2	47.9	17.2	31.4
13	2	86,67	0,00	6,67	6,67	80.7	30.8	10.1	31.1
14	3	80,00	6,67	6,67	6,67	80.1	14.9	4.7	32.1
15	1	92,5	2,5	2,5	2,5	79.2	59.4	20.7	30.9
16	11	82,5	12,5	2,5	2,5	81.5	116.6	39.2	27.6
17	16	82,5	2,5	12,5	5,5	83.3	57.6	16.9	28.2
18	13	82,5	2,5	2,5	12,5	83.8	140.3	47.3	28.2

Pour estimer la qualité du modèle et le valider, l'analyse de la variance est réalisée et les valeurs résiduelles (différence entre la valeur prédite par le modèle et la valeur expérimentale) sont examinées. Les résultats sont présentés dans la **Figure 35**. Pour toutes les réponses, les valeurs calculées sont proches de celles obtenues expérimentalement ce qui valide notre modèle.

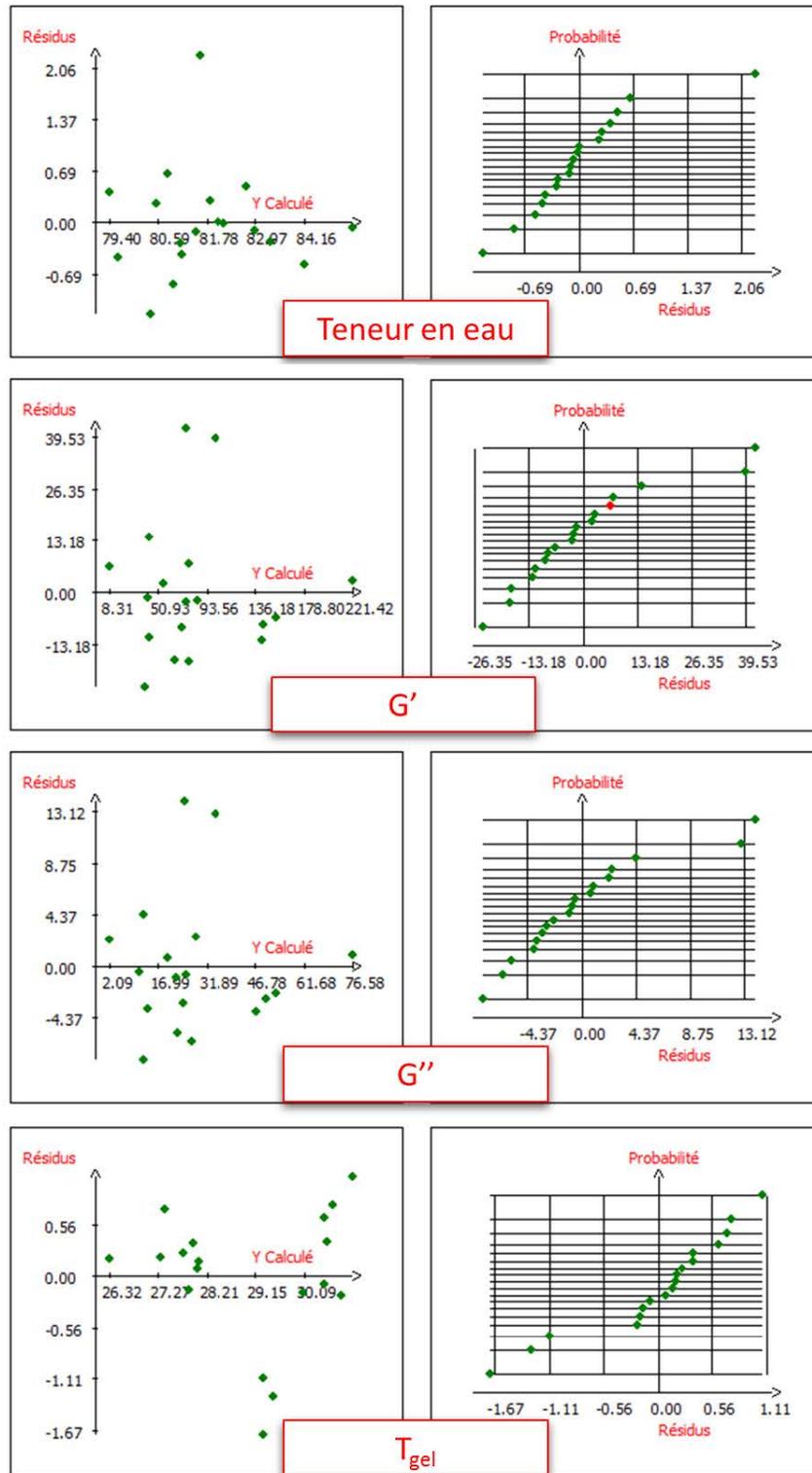


Figure 35 : Vue d'ensemble des résidus: probabilité normale et tracé des valeurs résiduelles

X. STATISTIQUES

Le traitement statistique des données est réalisé à l'aide du logiciel Kyplot version 2.0. Pour les comparaisons par paire, une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur est réalisée suivi par un test de Tukey. Les résultats sont considérés comme significativement différents à $p < 0,05$.

CHAPITRE 3 :

RESULTATS ET DISCUSSION

I. ETUDE DE L'ADHESION ENTRE LGG ET LES PROTEINES LAITIÈRES

De par ses biomolécules de surface, LGG est impliquée dans de nombreux phénomènes d'adhésion et notamment dans l'adhésion avec des protéines laitières. Récemment il a été montré que LGG est capable d'interagir spécifiquement avec les PS (Burgain *et al.*, 2013b) et que ces interactions sont possibles grâce à la présence de pili SpaCBA à la surface des cellules bactériennes (Burgain *et al.*, 2014c). Cependant dans ces études, les interactions ont été étudiées avec un mélange de PS, composé essentiellement de β -LG, d' α -LA et de BSA. Il apparaît donc intéressant d'étudier les PS de façon individuelle dans le but de déterminer la ou les protéines impliquées dans l'interaction avec LGG. Le premier objectif de notre étude est donc d'identifier la ou les protéines laitières impliquées dans l'interaction avec LGG par AFM grâce à l'utilisation de solutions pures de β -LG, d' α -LA et de BSA. Dans un même temps, l'objectif est de comprendre le rôle des biomolécules de surface de LGG dans ces interactions. Des mutants de surface de LGG ont donc été employés : LGG WT, LGG *spaCBA* dépourvu de pili SpaCBA, LGG *welE* dépourvu de longs EPS et LGG *welEspaCBA* dépourvu à la fois de pili SpaCBA et de longs EPS (Lebeer *et al.*, 2009, 2011, 2012a).

Récemment, la MFGM est devenue un ingrédient très intéressant du fait de ses multiples effets bénéfiques sur la santé de l'Homme. Des études par microscopie ont montré que les bactéries lactiques ont tendance à se localiser à la surface des globules gras du lait lorsqu'ils sont présents dans une matrice fromagère (Tunick *et al.*, 1993; Laloy *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 2006b). Cela suppose une adhésion entre la MFGM et les bactéries. Afin de vérifier cela à l'échelle moléculaire, le deuxième objectif de cette partie est d'utiliser l'AFM pour étudier l'adhésion entre LGG et la MFGM et déterminer les biomolécules de surface de LGG impliquées dans cette adhésion.

1. Adhésion entre LGG et les PS

Avant de commencer l'étude de l'adhésion entre LGG et les PS, des images topographiques sont réalisées par AFM sur du mica fonctionnalisé avec les bactéries afin de s'assurer que les cellules restent attachées au support lorsqu'elles sont immergées dans le tampon et balayées par la pointe (**Figure 36**). Des bactéries en forme de bâtonnets et organisées en chaînettes sont observées sur le mica. Chaque bactérie présente une longueur d'environ 3 μm et toute la surface du mica est recouverte d'un tapis bactérien, ce qui confirme de précédentes observations sur LGG (Tripathi *et al.*, 2012a; Burgain *et al.*, 2013b). Les images présentées sur la **Figure 36** sont celles obtenues pour LGG WT mais les mêmes observations sont faites avec les souches mutantes (LGG *spaCBA*, LGG *welE* et LGG *welEspaCBA*).

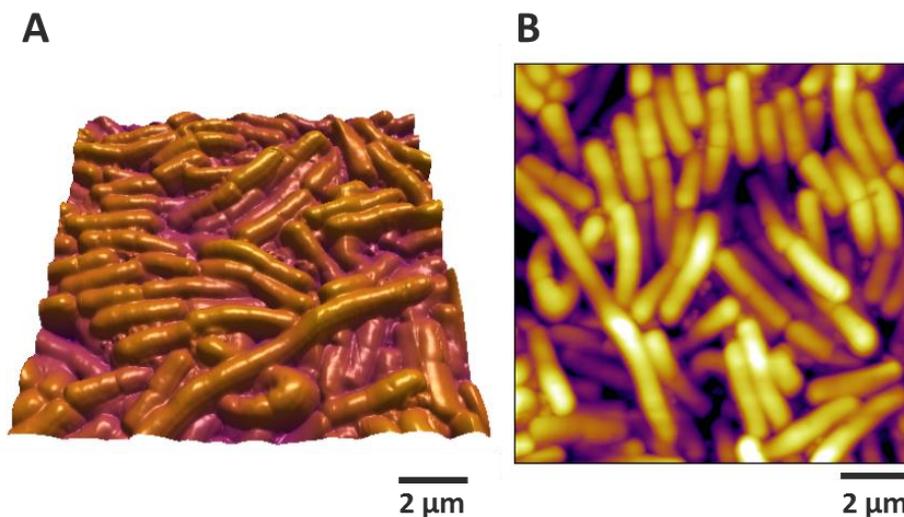


Figure 36 : Image 3D (A) et image de hauteur (B) obtenues en milieu liquide dans du tampon phosphate à pH 6,8 par AFM (mode contact) pour LGG WT

1.1. Adhésion de LGG WT

Les pourcentages d'évènements d'adhésion entre la souche sauvage de LGG et les différentes protéines laitières (caséines, β -LG, α -LA et BSA) sont présentés dans la **Figure 37**. Le pourcentage d'évènements adhésifs représente le pourcentage de courbes de retrait avec des signatures spécifiques de l'étirement de biomolécules.

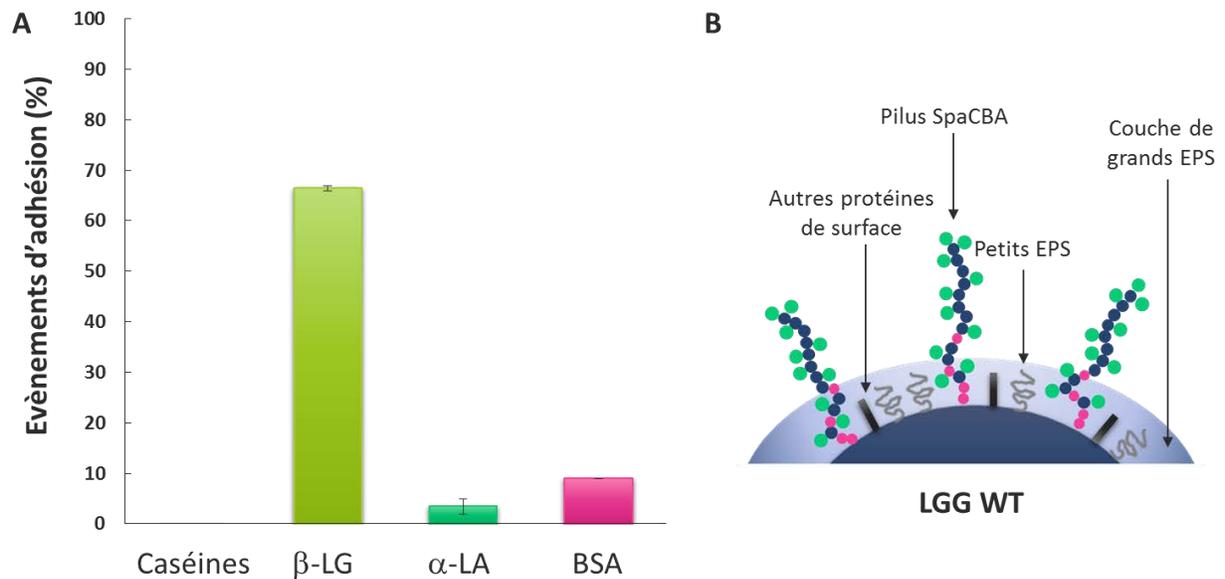


Figure 37 : Evènements d'adhésion mesurés par AFM entre LGG WT et les différentes protéines laitières : caséines, β-LG, α-LA et BSA (A). Composition de surface simplifiée de LGG WT (B)

Aucun évènement d'adhésion possédant des signatures spécifiques de l'étirement de biomolécules n'est observé entre les caséines et LGG WT. Ces résultats sont en cohérence avec ceux de la littérature (Burgain *et al.*, 2013b). Les pourcentages d'adhésion observés entre LGG WT et les différentes PS sont respectivement de $66,5 \pm 0,5$, $3,5 \pm 1,5$ et $9,0 \pm 0,0$ % pour la β-LG, l'α-LA et la BSA (Figure 37A). Lorsque la pointe, revêtue de protéines, est retirée du tapis bactérien, des courbes de retrait sont enregistrées. Ces courbes de retrait montrent tout d'abord de nombreux évènements d'adhésion caractéristiques de l'étirement de biomolécules entre LGG WT et la β-LG. Pour la β-LG, plusieurs évènements de ruptures sont observés sur les courbes de retrait. Le nombre de ruptures observées varie entre 0 et 5, avec une moyenne de $3,2 \pm 0,1$. Plus précisément, les courbes de retrait entre la β-LG et LGG WT sont caractéristiques de l'étirement de pili (Tripathi *et al.*, 2013). En effet, l'analyse des courbes de retrait montre la présence de grands pics de force présentant des alternances de pentes et de plateaux caractéristiques de l'étirement du pilus SpaCBA (Figure 38A). Ces signatures sont comparables à celles retrouvées par Tripathi *et al.* (2013) lors de l'étude du mécanisme d'adhésion du pilus SpaCBA de LGG.

Pour aller plus loin dans l'analyse de cette signature, plusieurs courbes de retrait ont été superposées, montrant la grande reproductibilité du phénomène (Figure 38B). Comme cela avait été décrit par Tripathi *et al.* (2013), lors de l'étude de l'étirement du pilus SpaCBA de LGG avec

Résultats et discussion

une pointe fonctionnalisée avec des sous-unités SpaC, cette répétition de signatures spécifiques permet de déterminer les propriétés mécaniques intrinsèques aux pili. En augmentant la force appliquée, deux plateaux de force constante (flèches vertes) séparés par des segments linéaires de pentes croissantes (ligne rouge) sont observés (**Figure 38B**). Ces enchaînements peuvent s'expliquer avec l'étirement de plusieurs parties du pilus, de plus en plus résistantes, lorsque la pointe recouverte de β -LG se retire de la surface de LGG. Ces différentes parties étirées se décrochent les unes après les autres, de la moins résistante à la plus résistante, expliquant les enchaînements de segments de pentes croissantes et les plateaux.

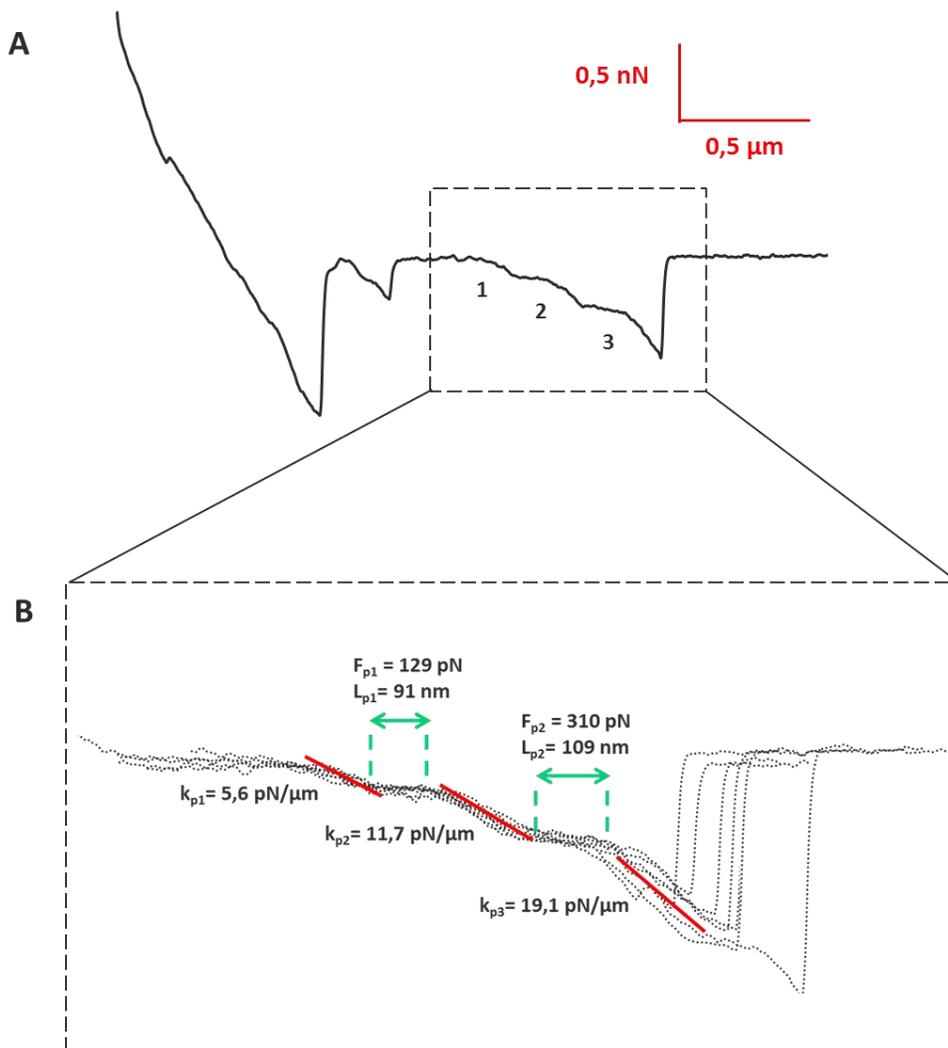


Figure 38 : Exemple de signature spécifique observée lors de l'adhésion entre LGG WT et la β -LG (A). Superposition de courbes de retrait montrant la reproductibilité des signatures obtenues lors de l'adhésion entre LGG WT et la β -LG (B). Les valeurs de k_p sur les pentes représentent les constantes de raideur du pilus SpaCBA, alors que les valeurs de F_p et L_p correspondent aux forces et à la longueur des plateaux

L'analyse des courbes superposées a permis de calculer la constante de raideur du pilus au cours des différents régimes et la force et la longueur des plateaux intermédiaires. L'estimation de la constante de raideur du pilus est calculée de la façon suivante : $k_p = (k_c \times s)/(1 - s)$, avec k_c la constante de raideur de la pointe (N/m) et s la pente des segments linéaires (N/m) (ligne rouge, **Figure 38B**). Les valeurs obtenues pour les différentes constantes de raideur du pilus sont $k_{p1} = 5,6 \pm 1,0$, $k_{p2} = 11,7 \pm 0,8$ et $k_{p3} = 19,1 \pm 1,1$ pN/ μ m. Les caractéristiques des plateaux intermédiaires sont également très reproductibles avec des valeurs de force de $F_{p1} = 129 \pm 8$ et $F_{p2} = 310 \pm 8$ pN et des valeurs de longueur de $L_{p1} = 91 \pm 6$ et $L_{p2} = 109 \pm 10$ nm. Ces valeurs ne sont pas identiques à celles obtenues par Tripathi *et al.* (2013) mais suivent les mêmes tendances. La différence peut être due à la vitesse de retrait de la pointe utilisée lors de l'analyse : entre 0,1 et 5 μ m/s pour Tripathi *et al.* (2013) et 400 μ m/s dans notre cas. Ces caractéristiques sont très reproductibles et confirment les changements structuraux du pilus induis par l'interaction avec la β -LG conduisant à une conformation plus rigide du pilus. Cette signature spécifique de l'étirement de pilus n'est pas retrouvée avec les autres PS (**Figure 39**). Les signatures observées lors de l'adhésion entre LGG WT et l' α -LA ou la BSA sont spécifiques de l'étirement de biomolécules, mais une étude impliquant des mutants de surface de LGG est nécessaire pour déterminer la ou les molécules impliquées dans ces interactions.

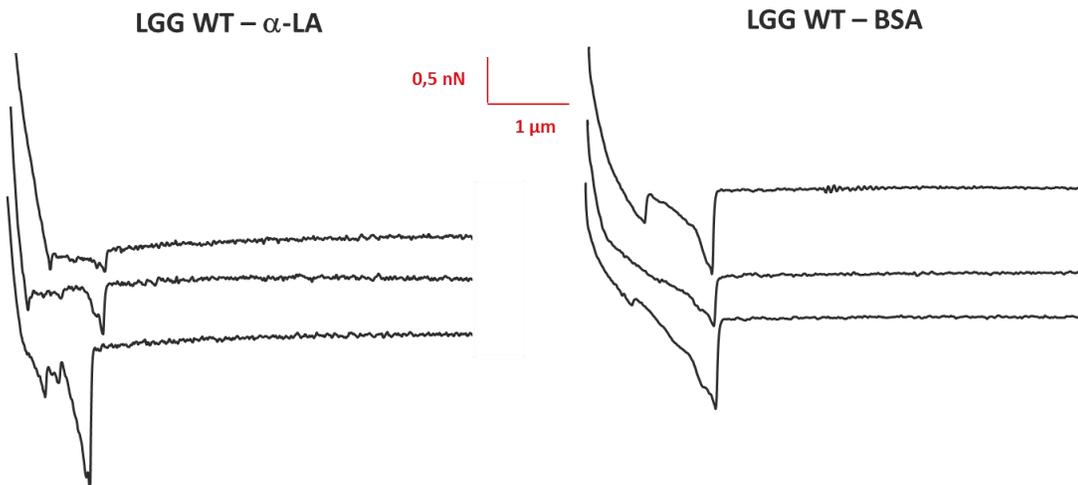


Figure 39 : Exemple de signatures spécifiques observées lors de l'adhésion entre LGG WT et l' α -LA (gauche) et la BSA (droite)

Résultats et discussion

La structure des caséines et des PS est différente. Les caséines sont organisées en micelles et n'ont pas de structure secondaire. Au contraire, les PS ont une structure secondaire bien définie avec la présence de feuillets β , d'hélices α et de ponts disulfures (Fox, 2008). La structure secondaire des différentes PS diffère selon les protéines. Contrairement à l' α -LA et la BSA, la β -LG possèdent une poche hydrophobe, appelée calice (Monaco *et al.*, 1987). Cette poche hydrophobe a une fonction de transporteur et permet de lier plusieurs molécules hydrophiles et hydrophobes telles que le rétinol, le cholestérol, les acides gras, la vitamine D3, la mucine et le lactose (Kontopidis *et al.*, 2002, 2004; Dominguez-Ramirez *et al.*, 2013; Çelebioğlu *et al.*, 2015). La structure particulière de la β -LG pourrait expliquer l'adhésion spécifique de la β -LG au pilus de LGG, non observée avec les autres protéines du lait.

La surface de LGG est composée de nombreuses molécules : les pili SpaCBA, les grands et les petits EPS et d'autres molécules de surface comme les protéines MBF et MabA. Pour confirmer le rôle du pilus SpaCBA dans l'adhésion avec la β -LG différents mutants de surface de LGG ont été utilisés : LGG *spaCBA*, LGG *welE* et LGG *welEspaCBA*. Ces différents mutants peuvent également être utiles pour déterminer si des molécules de surface autres que le pilus, sont capables d'interagir avec les caséines, l' α -LA et la BSA.

1.2. Adhésion de LGG *spaCBA*

Les pourcentages d'évènements d'adhésion entre LGG *spaCBA* et les différentes protéines laitières (caséines, β -LG, α -LA et BSA) sont présentées dans la **Figure 40**. Comme pour la souche sauvage, les évènements d'adhésion reportés sur cette figure représentent les courbes de retrait avec des signatures spécifiques de l'étirement de biomolécules.

Le pourcentage d'évènements d'adhésion avec LGG *spaCBA* est respectivement de $7,5 \pm 0,5$, $13,5 \pm 5,5$, $13,5 \pm 0,5$ et $11,0 \pm 3,0$ % pour les caséines, la β -LG, l' α -LA et la BSA (**Figure 40A**). La diminution du pourcentage d'évènements d'adhésion entre la β -LG et LGG *spaCBA* par rapport à la souche sauvage confirme le rôle du pilus SpaCBA dans l'adhésion entre LGG et cette protéine.

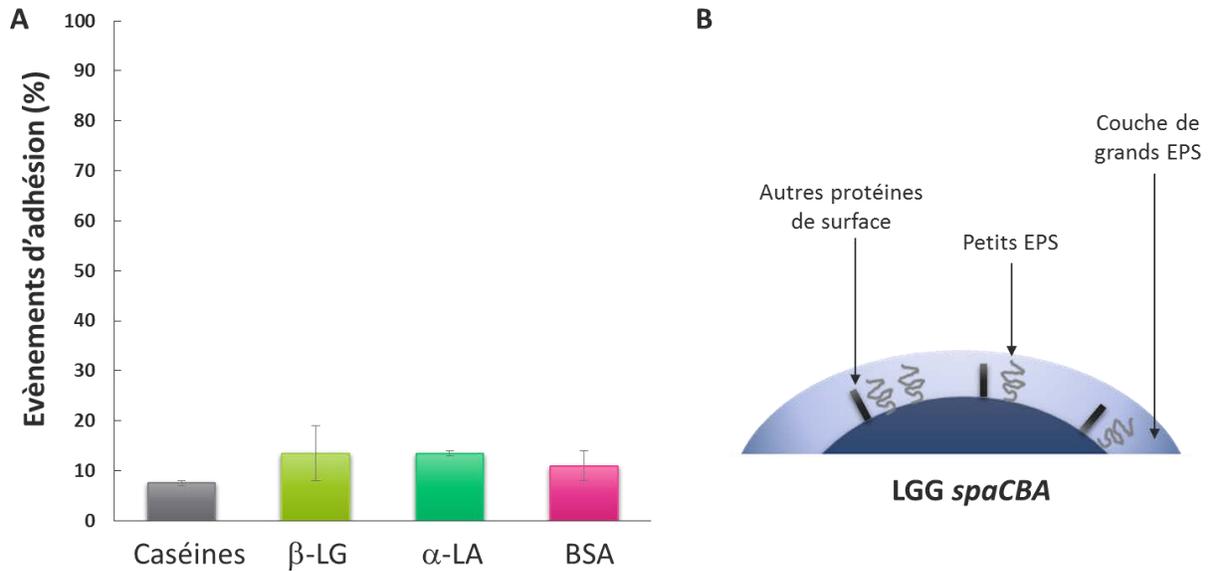


Figure 40 : Evènements d’adhésion mesurés par AFM entre LGG *spaCBA* et les différentes protéines laitières : caséines, β-LG, α-LA et BSA (A). Composition de surface simplifiée de LGG *spaCBA* (B)

Même si les évènements d’adhésion entre LGG *spaCBA* et les protéines de lait sont rares, ils sont très reproductibles. Les signatures observées sont les mêmes pour toutes les PS et sont représentées dans la **Figure 41 (A, B et C)**.

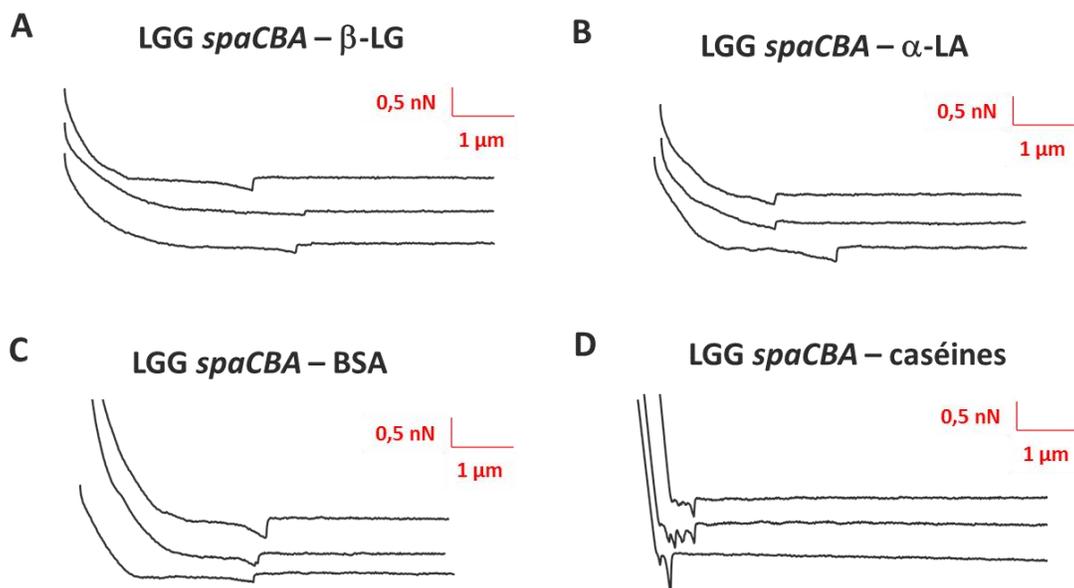


Figure 41 : Exemple de signatures spécifiques observées lors de l’adhésion entre LGG *spaCBA* et la β-LG (A), l’α-LA (B), la BSA (C) ou les caséines (D)

Résultats et discussion

Le nombre de ruptures observées varie entre 1 et 2, la force d'adhésion maximale observée entre 100 et 200 pN et la distance de rupture de la molécule entre 0,6 et 1,4 μm . La force d'adhésion maximale observée sur ces courbes est différente de celle observée lors de l'étirement de pilus avec la β -LG qui est de 700 ± 1 pN. Ces paramètres de force diffèrent de ceux retrouvés lors de l'adhésion entre LGG WT et la β -LG et démontrent qu'une biomolécule différente du pilus SpaCBA est étirée chez le mutant *spaCBA*. Cette signature est spécifique de l'étirement de molécules saccharidiques (Francius *et al.*, 2009). La souche mutante LGG *spaCBA* n'exprime pas de pili *spaCBA* au niveau de sa surface et les autres molécules telles que les EPS sont donc plus accessibles pour les protéines lactières (**Figure 40B**). Les caractéristiques des signatures observées lors de l'étirement de biomolécules sont équivalentes à celles observées par Francius *et al.* (2009) lorsqu'ils ont étudié l'étirement des EPS de LGG par des pointes fonctionnalisées avec de la concanavaleine A. Ainsi, en absence de pilus, toutes les PS seraient capables d'adhérer à LGG par l'intermédiaire des EPS, mais dans une bien moindre mesure puisque le pourcentage d'évènement adhésif pour ces protéines est inférieur à 15%.

Les caséines présentent elles aussi des signatures spécifiques de l'étirement de biomolécules sur leur courbe de retrait, à raison de $7,5 \pm 0,5$ % (**Figure 40**). Le nombre de ruptures est en moyenne de $2,8 \pm 0,2$, la force d'adhésion maximale observée est en moyenne de $1,8 \pm 0,1$ nN et la distance de rupture de la molécule est en moyenne de $1,1 \pm 0,1$ μm . Un exemple de courbe de retrait entre les caséines et LGG *spaCBA* est présentée sur la **Figure 41D**. Il est difficile de savoir quelle molécule de surface de LGG est impliquée dans l'adhésion avec les caséines car les courbes ont une allure assez particulière, différentes de l'étirement des EPS observé avec les PS. Afin de déterminer les molécules mises en jeu dans l'interaction avec les caséines, l'étude des autres mutants de surfaces de LGG est nécessaire.

1.3. Adhésion de LGG *welE*

Les pourcentages d'évènements d'adhésion entre LGG *welE* et les différentes protéines lactières (caséines, β -LG, α -LA et BSA) sont présentées dans la **Figure 42**. Le pourcentage d'évènements d'adhésion caractéristique de l'étirement de biomolécules avec LGG *welE* est respectivement de

56,0 ± 6,0, 96,5 ± 1,5, 98,5 ± 1,5 et 88,5 ± 2,5 % pour les caséines, la β-LG, l'α-LA et la BSA (Figure 42).

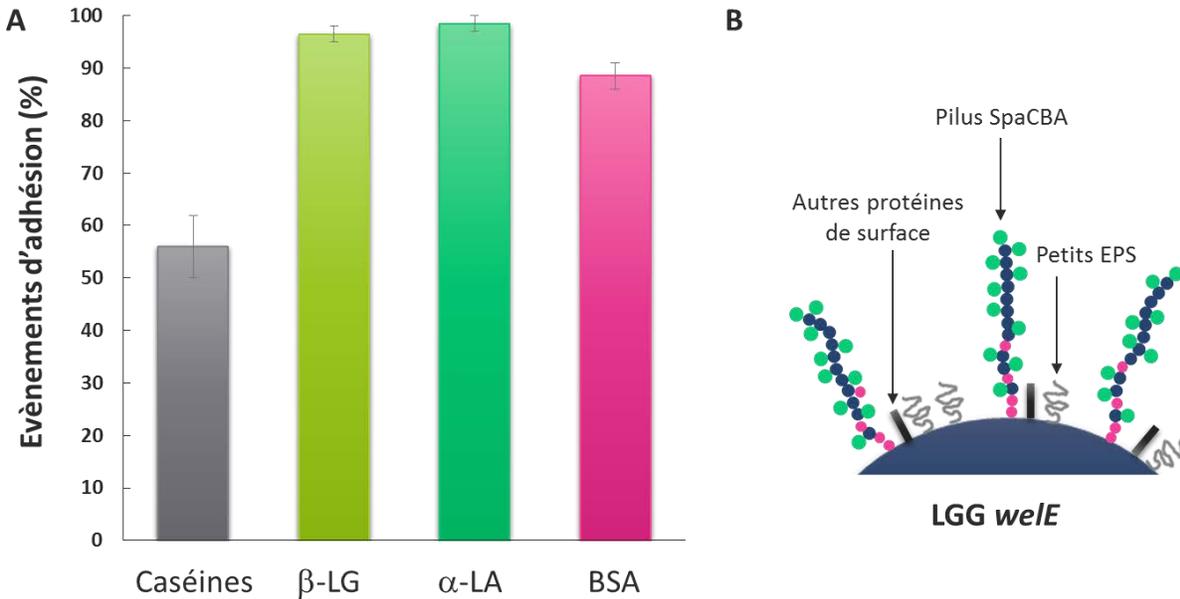


Figure 42 : Evènements d'adhésion mesurés par AFM entre LGG *welE* et les différentes protéines laitières : caséines, β-LG, α-LA et BSA (A). Composition de surface simplifiée de LGG *welE* (B)

1.3.1. Cas de la β-lactoglobuline

Le nombre d'évènements adhésifs entre la β-LG et LGG *welE* augmente par rapport à la souche sauvage et les paramètres d'adhésion sont différents. Pour LGG WT, le nombre moyen de ruptures observé sur la courbe de retrait était de $3,2 \pm 0,1$ et ce nombre de ruptures variait entre 0 et 5. Pour le mutant *welE*, le nombre de ruptures augmente avec une moyenne de $3,5 \pm 0,0$ et ce nombre varie entre 0 et 8. Le mutant *welE* est connu pour surexposer ses pili, en raison de l'absence de la couche d'EPS (Lebeer *et al.*, 2012a). Ainsi, l'augmentation de l'exposition des pili chez ce mutant pourrait leur permettre d'établir des points de contact plus nombreux avec la β-LG et ainsi d'augmenter le nombre d'évènements de ruptures observés sur les courbes de retrait. La surexposition des pili augmente également la probabilité de contact entre la protéine et les pili, ce qui peut également

Résultats et discussion

expliquer l'augmentation du pourcentage des événements d'adhésion entre la souche *welE* et la β -LG en comparaison avec la souche sauvage.

Les signatures observées entre la β -LG et LGG *welE* ne sont pas les mêmes que pour la souche sauvage. Elles sont plus saccadées, avec de nombreux pics d'adhésion et le motif montrant des enchainements de pentes et de plateaux n'est plus retrouvé (**Figure 43**). Les signatures observées sur les courbes de retrait entre la β -LG et LGG *welE*, peuvent résulter de l'attachement et du détachement successifs des protéines β -LG fixées sur la pointe avec le pilus SpaCBA, du fait de l'augmentation du nombre de sites d'adhésion disponible chez le mutant *welE*. Les signatures observées sur les courbes de retrait présentent des distances de rupture souvent supérieure à 1 μ m, la longueur moyenne du pilus SpaCBA. Une hypothèse pour expliquer la présence de ces longues distances de rupture serait que les pili auraient tendance à former un réseau entre eux, étant donné qu'ils ne sont plus bloqués par les EPS, et l'interaction avec la β -LG permettrait de dissocier ce réseau. Lorsque la pointe interagit avec un pilus et qu'elle se retire de la surface de la cellule, elle décroche tout un ensemble de pili collés les uns aux autres ce qui entrainerait la présence de plusieurs ruptures et donc la présence de ces courbes saccadées.

Deux modèles prédictifs sont utilisés pour permettre de décrire les comportements de la molécule étirée. Les modèles FJC et WLC décrivent respectivement des comportements de type polysaccharidiques et polypeptidiques. Les courbes de retrait obtenues pour LGG WT et LGG *welE* sont ajustées avec ces deux modèles (**Figure 43**). Pour chaque pic ajusté, un coefficient de détermination est calculé pour évaluer la performance du modèle FJC et WLC. Le coefficient de détermination du modèle FJC est toujours supérieur à 0,9 pour LGG WT et le mutant *welE*. Ces valeurs, proches de 1, indiquent que le modèle FJC est bien adapté aux données expérimentales. Au contraire, le modèle WLC n'est pas toujours performant. Plusieurs pics ont un coefficient de détermination inférieur à 0,8 (**Figure 43**). Ces ajustements indiquent que les molécules étirées pendant le retrait de la pointe possèdent un comportement de type polysaccharidique ou à la fois des comportements polypeptidiques et polysaccharidiques (Dupres *et al.*, 2009). Le pilus de LGG est composé de trois sous-unités : SpaA, SpaB et SpaC. Le pilus SpaCBA est glycosylé et cette glycosylation est portée par la sous-unité SpaC (Tytgat *et al.*, 2016b). Les deux modèles FJC et WLC montrent que la molécule étirée lors de l'interaction entre la bactérie et la β -LG présente des comportements polypeptidiques et polysaccharidiques. Cela suggère que les protéines glycosylées

des pili, plus précisément les sous-unités SpaC, sont probablement impliquées dans l'interaction avec la β -LG. Lebeer *et al.* (2012a) ont démontré, par des techniques d'immunotransfert, que la sous-unité SpaC est plus exposée chez le mutant *welE*. La surexposition de ces sous-unités SpaC impliquées dans l'adhésion de LGG avec la β -LG confirmerait l'augmentation du nombre de sites d'adhésion disponible pour la β -LG et donc la présence de multiples pics d'adhésion sur la courbe de retrait.

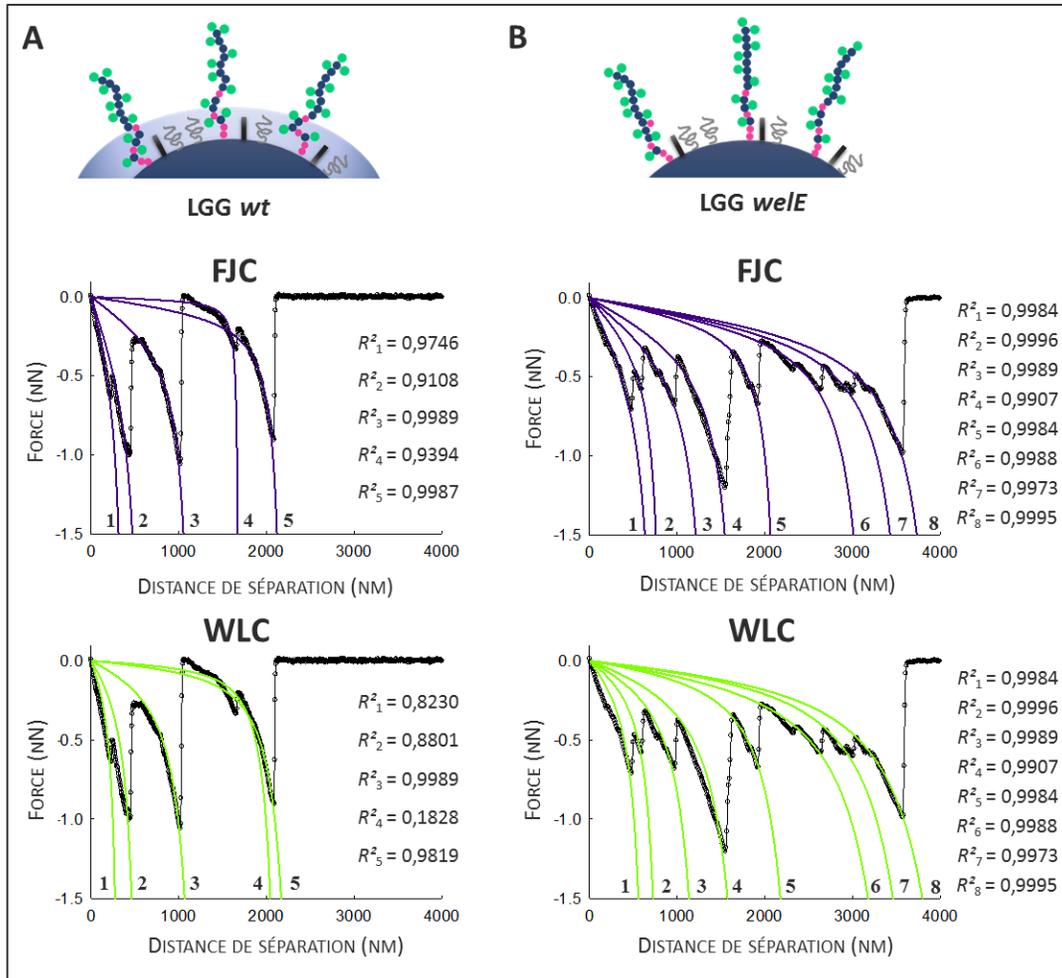


Figure 43 : Signatures obtenues sur les courbes de retrait lors de l'adhésion entre la β -LG et LGG WT (A) ou LGG *welE* (B). Les modèles FJC et WLC ont été appliqués sur ces courbes de retrait. Un coefficient de détermination, R^2 , est calculé pour chaque partie de la courbe de retrait modélisée

Pour comprendre le mécanisme d'adhésion entre les pili SpaCBA et la β -LG, les profils des courbes de retrait pour les souches WT et *welE* ont été analysées et certains paramètres de force ont été mesurés : la force de rupture (F_{rupt}), la longueur de contour (L_c), la longueur de Kuhn (l_k) et la longueur de persistance (l_p). Ces paramètres ont été déterminés grâce à l'ajustement des courbes

Résultats et discussion

de retrait avec les modèles FJC et WLC. Ces résultats sont présentés dans le **Tableau 13**. Les forces d'adhésion et les longueurs de contour sont plus importantes avec le mutant *welE* qu'avec la souche sauvage. Les longueurs de Kuhn et les longueurs de Persistance sont les mêmes pour les deux souches, ce qui indique que des biomolécules de même longueur ont été étirées au cours de l'interaction.

Tableau 13 : Paramètres de force mesurés lors de l'adhésion entre la β -LG et LGG WT ou LGG *welE*

	Forces de rupture (F_{rupt}) (nN)	Longueur de contour (L_c) (nm)	Longueur de Kuhn (l_k) (nm)	Longueur de persistance (l_p) (nm)
LGG WT	0,13 \pm 0,01 0,81 \pm 0,01	386,4 \pm 17,4	0,19 \pm 0,00	0,15 \pm 0,00
LGG <i>welE</i>	0,58 \pm 0,01 1,31 \pm 0,01	932,7 \pm 27,7	0,19 \pm 0,00	0,15 \pm 0,00

La longueur de contour des biomolécules étirées est plus importante pour le mutant *welE* que pour LGG WT, ce qui signifie qu'une partie plus longue du pilus est étirée pour le mutant *welE*. De plus, la valeur de la longueur de contour confirme que les biomolécules étirées sont des pili, car des images topographiques obtenues par AFM montrent que la longueur du pilus SpaCBA est d'environ 1 μ m (Tripathi *et al.*, 2013). Il est connu que chez LGG WT, les EPS masquent la partie basale du pilus contrairement au mutant LGG *welE*, où les pili sont totalement exposés (Burgain *et al.*, 2015; Lebeer *et al.*, 2012). L'augmentation de la force d'adhésion pour LGG *welE* peut être expliquée par la présence de pili totalement exposés présentant donc plus de points de contact avec la β -LG.

Il a été récemment proposé un mécanisme de type fermeture éclair comme mécanisme d'adhésion entre les pili et LGG. Ce mécanisme implique plusieurs molécules SpaC réparties le long du pilus (Tripathi *et al.*, 2013). Dans le présent travail, les résultats suggèrent que le même mécanisme peut se produire entre LGG et la β -LG. Les points de contact entre les protéines de β -LG fixées sur la pointe et les pili se trouvant à la surface de LGG peuvent se détacher graduellement pendant le retrait de la pointe, ce qui rappelle l'adhésion des pili grâce au mécanisme de type fermeture éclair.

1.3.2. Cas des autres protéines lactières

Précédemment, les résultats ont montré que les caséines n'adhéraient pas aux molécules de surface de LGG et que l' α -LA et la BSA adhéraient peu avec la souche sauvage. Par contre, de nombreux

événements d'adhésion caractéristiques de l'étirement de biomolécules ont été observés avec la souche *welE* (**Figure 44**). Les signatures observées sur les courbes de retrait sont similaires à celles observées pour la β -LG. La surexposition du pilus SpaCBA en absence des longs EPS permettrait à ces protéines d'interagir avec celui-ci. Certaines sous-unités du pilus, notamment les sous unités SpaB, se situent majoritairement à la base du pilus et seraient donc masquées par la couche de longs EPS. En l'absence d'EPS, ces sous-unités seraient démasquées et favoriseraient l'interaction avec ces trois protéines. Une autre hypothèse serait qu'en l'absence d'EPS, d'autres molécules de surface comme les protéines MabA et MBF ou les petits EPS devenant accessibles, aient la capacité d'interagir avec les protéines du lait. Toutefois, la distance maximale des molécules étirées varie entre 1,3 et 3,2 μm , ce qui ne peut pas correspondre à l'étirement des protéines MabA, MBF ou des petits EPS qui sont des molécules trop petites (Francius *et al.*, 2009; Perea Vélez *et al.*, 2010; von Ossowski *et al.*, 2011). Cette remarque affaiblit considérablement la seconde hypothèse. La première hypothèse est donc privilégiée.

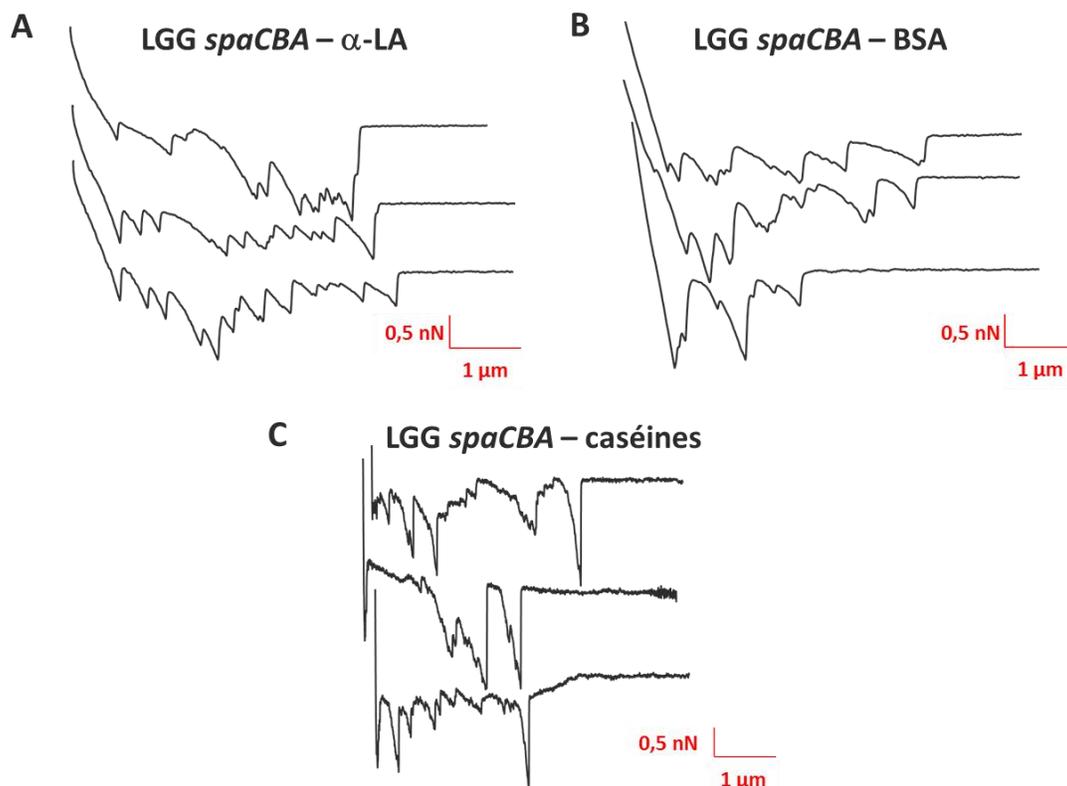


Figure 44 : Exemples de signatures spécifiques observées lors de l'adhésion entre LGG *welE* et l' α -LA (A), la BSA (B) ou les caséines (C)

1.4. Adhésion de LGG *welEspaCBA*

Les évènements d'adhésion entre LGG *welEspaCBA* et les différentes protéines laitières (caséines, β -LG, α -LA et BSA) sont présentées dans la **Figure 45**.

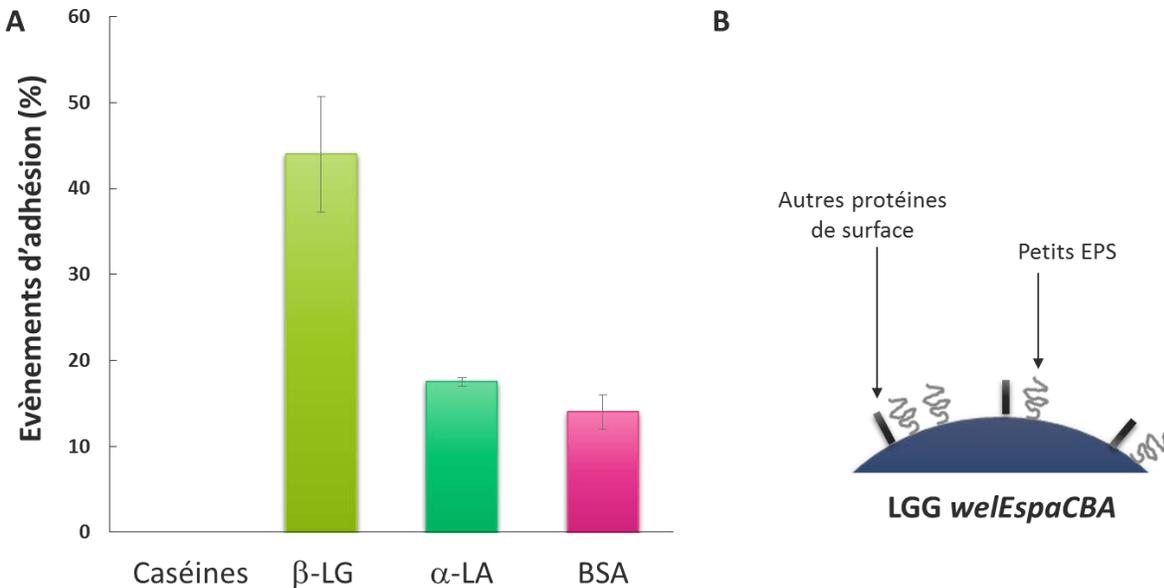


Figure 45 : Evènements d'adhésion mesurés par AFM entre LGG *welEspaCBA* et les différentes protéines laitières : caséines, β -LG, α -LA et BSA (A). Composition de surface simplifiée de LGG *welEspaCBA* (B)

Aucun évènement d'adhésion spécifique de l'étirement de biomolécules n'est observé avec les caséines. En revanche, le pourcentage d'évènements d'adhésion caractéristiques de l'étirement de biomolécules avec LGG *welEspaCBA* est respectivement de $44,0 \pm 6,7$, $17,5 \pm 0,5$ et $14,0 \pm 2,0$ % pour la β -LG, l' α -LA et la BSA (**Figure 45**) et les courbes de retrait correspondantes sont présentées dans la **Figure 46**. Ces évènements d'adhésion montrent que d'autres molécules de surface, autres que le pilus SpaCBA et les EPS, sont impliquées dans l'adhésion. La force d'adhésion maximale observée pendant l'étirement de la biomolécule est d'environ 0,2 nN pour toutes les PS (**Figure 46**). Les signatures observées peuvent rappeler les propriétés d'adhésion des petits EPS (Francius *et al.*, 2009) ou l'étirement du peptidoglycane (Beaussart *et al.*, 2013), accessibles en absence de longs EPS et des pili SpaCBA, mais l'étude d'autres mutants de surface serait nécessaire pour valider ces hypothèses.

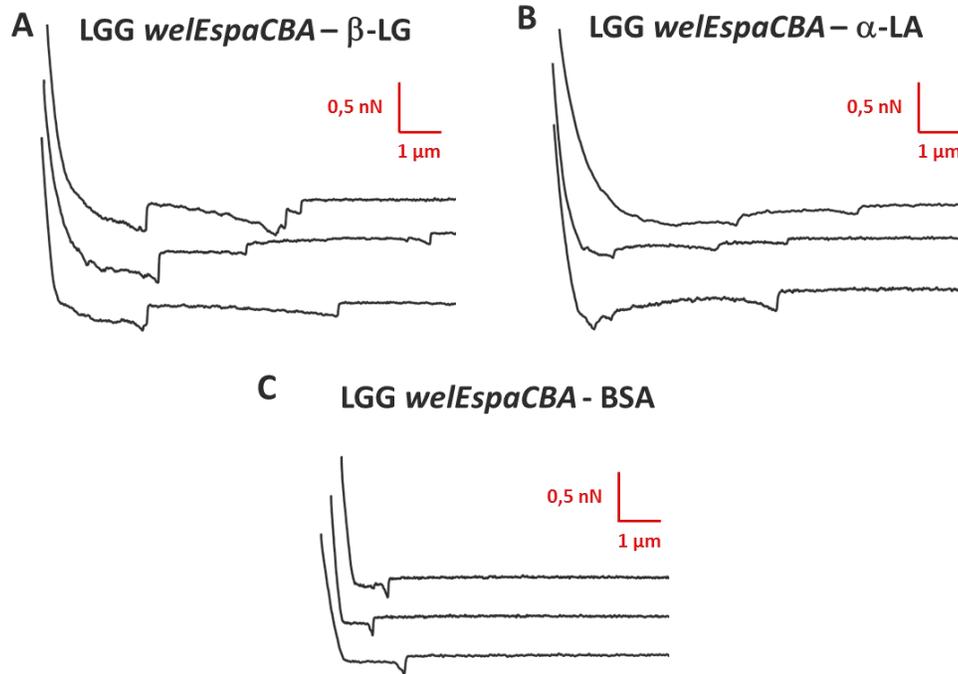


Figure 46 : Courbes de retrait présentant des signatures spécifiques observées lors de l’interaction entre LGG *welEspaCBA* et la β -LG (A), l’ α -LA (B) ou la BSA (C)

2. Adhésion de LGG à la MFGM

La MFGM est connue pour ses effets bénéfiques sur la santé et pour ses propriétés d’adhésion avec les bactéries lactiques. L’adhésion entre la MFGM et les bactéries a déjà été visualisée par des techniques de microscopie lors de l’étude de la localisation des bactéries dans la matrice fromagère (Tunick *et al.*, 1993; Laloy *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 2006a; Hickey *et al.*, 2015a). A notre connaissance, les mécanismes moléculaires régissant l’adhésion des bactéries à la MFGM n’a jamais été étudiée par AFM.

Les évènements d’adhésion entre la MFGM et LGG, la souche sauvage et deux de ses mutants de surface (LGG *spaCBA* et LGG *welE*) sont présentées dans la

Figure 47. Les évènements d’adhésion correspondent aux adhésions présentant des signatures spécifiques de l’étirement de biomolécules. Le pourcentage d’évènements d’adhésion

Résultats et discussion

caractéristiques de l'étirement de biomolécules est respectivement de $75,5 \pm 1,5$, $7,0 \pm 3,5$ et $99,0 \pm 1,0$ % pour LGG WT, LGG *spaCBA* et LGG *welE* (

Figure 47).

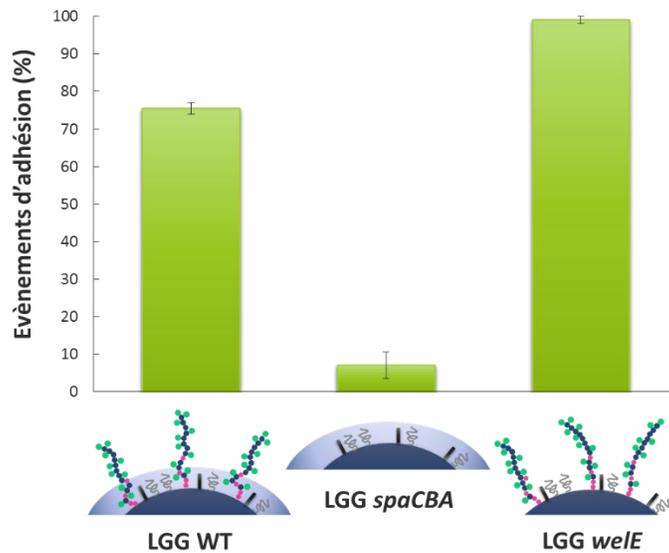


Figure 47 : Quantification des évènements d'adhésion entre la MFGM et LGG sauvage et deux de ses mutants de surface (LGG *spaCBA* et LGG *welE*)

Il apparait clairement que les pili SpaCBA de LGG jouent un rôle déterminant dans l'adhésion de la MFGM avec les bactéries. En effet, en absence de pilus au niveau de sa surface (mutant *spaCBA*), la capacité d'adhésion de LGG à la MFGM diminue très significativement par rapport à la souche sauvage. A l'inverse, lorsque les pili sont surexposés (mutant *welE*), la capacité d'adhésion de LGG à la MFGM augmente significativement par rapport à la souche sauvage (

Figure 47). L'analyse des courbes de retrait entre la MFGM et LGG WT révèle la présence de signatures spécifiques de l'étirement de biomolécules (Figure 48A). Sur quelques courbes des signatures typiques de l'étirement du pilus SpaCBA sont observées (Figure 48B). En effet, des signatures présentant des alternances de plateaux et de pentes déjà observées lors de l'interaction entre LGG WT et la β -LG sont également retrouvées avec la MFGM.

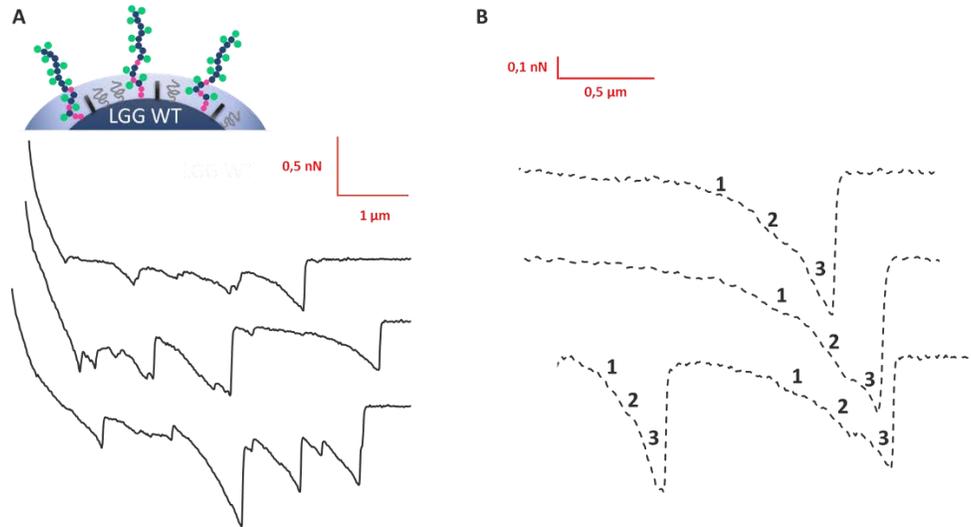


Figure 48 : Courbes de retrait obtenues par AFM présentant des signatures spécifiques lors de l'adhésion de LGG WT avec la MFGM. Exemples de courbes de retrait caractéristiques de l'interaction entre la MFGM et LGG WT (A). Lors de l'adhésion de la MFGM et LGG WT, des signatures spécifiques de l'étirement de pili SpaCBA sont retrouvées (B)

Le rôle du pilus SpaCBA dans l'interaction avec la MFGM est confirmé par l'analyse des courbes de retrait entre la MFGM et LGG *spaCBA* ou LGG *welE* (**Figure 49C et D**).

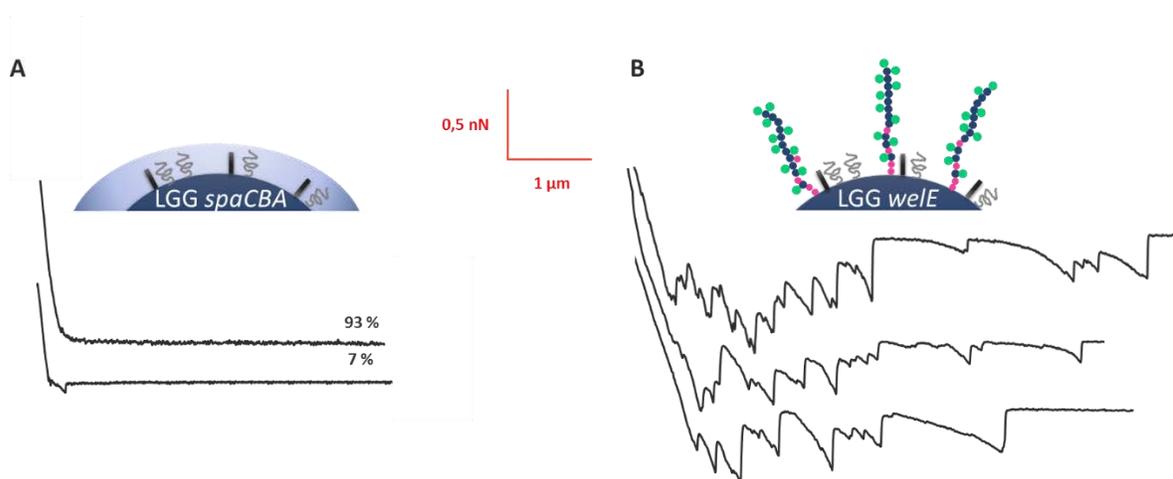


Figure 49 : Courbes de retrait obtenues par AFM présentant des signatures spécifiques lors de l'adhésion de LGG *spaCBA* ou LGG *welE* avec la MFGM. Exemples de courbes de retrait caractéristiques de l'adhésion de la MFGM avec LGG *spaCBA* (A) et LGG *welE* (B)

En effet, avec LGG *spaCBA*, les signatures spécifiques de l'étirement de biomolécules deviennent rares et sont totalement différentes de celles observées avec la souche sauvage (**Figure 49A**). Les paramètres de force mesurés lors de l'adhésion de la MFGM à la souche sans pili (mutant *spaCBA*)

Résultats et discussion

sont tous moins importants que pour la souche sauvage (**Tableau 14**). Chez le mutant *spaCBA*, le pilus SpaCBA est absent. Ces signatures peuvent être spécifiques de l'étirement de molécules polysaccharidiques et notamment d'EPS comme décrit par Francius *et al.* (2009).

Tableau 14 : Paramètres de force déterminés durant l'adhésion de la MFGM aux différentes souches de LGG

	Nombre de ruptures	Force d'adhésion maximale (nN)	Distance de rupture maximale (µm)
LGG WT	1,9 ± 0,0	0,5 ± 0,0	5,9 ± 0,1
LGG <i>spaCBA</i>	1,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
LGG <i>welE</i>	5,8 ± 0,7	0,7 ± 0,1	8,4 ± 1,1

Au contraire, pour LGG *welE*, le nombre d'évènement d'adhésion augmente par rapport à la souche sauvage. Des signatures très saccadées et présentant de nombreux pics d'adhésion sont retrouvées sur les courbes de retrait entre la MFGM et la souche *welE* (**Figure 49B**) avec un nombre de ruptures, une force d'adhésion maximale et une distance de rupture moyenne beaucoup plus importante que pour la souche sauvage (**Tableau 14**). L'augmentation du nombre de pics d'adhésion et des paramètres de force peut être expliquée par la meilleure accessibilité des sites d'adhésion de la MFGM au niveau des pili, du fait de la surexposition du pilus chez ce mutant. Les résultats observés avec les mutants *spaCBA* et *welE* confirment le rôle clé du pilus SpaCBA dans l'adhésion entre la MFGM et LGG.

De nombreuses protéines glycosylées sont présentes dans la MFGM et notamment la mucine MUC1. Il existe de nombreuses similitudes entre la mucine MUC1 et la mucine tapissant les cellules intestinales. Ce sont toutes les deux des protéines de haut poids moléculaire, fortement glycosylées et principalement O-glycosylées. Elles sont composées de N-acétylgalactosamine, de N-acétylglucosamine, de fucose, de galactose, d'acide sialique, de mannose dans différentes proportions (Patton *et al.*, 1995; Bansil & Turner, 2006). Les signatures observées lors de l'adhésion entre la MFGM et LGG *welE* ont déjà été retrouvées dans une autre étude lors de l'étirement de la mucine gastro-intestinale par des lectines greffées sur une pointe AFM (Gunning *et al.*, 2013), suggérant ainsi que la mucine MUC1 de la MFGM serait impliquée dans l'adhésion de la MFGM avec LGG. Les mucines sont des protéines fortement glycosylées, avec de nombreux sites d'adhésion pour les lectines. Les auteurs ont expliqué ces signatures par des attachements et des détachements successifs des lectines sur la chaîne de mucine, possibles grâce à la présence de plusieurs sites d'adhésion disposés tout le long de la molécule. Les signatures observées sur les

courbes de retrait entre la MFGM et LGG *welE*, pourraient donc être dues à l'attachement et au détachement successif de la mucine MUC1 fixée sur la pointe avec le pilus SpaCBA, du fait de l'augmentation du nombre de sites d'adhésion disponible chez le mutant *welE*. Gunning *et al.* (2013) désignent ces signatures sous le nom de « *glycocode* » car elles sont typiques de l'étirement d'une chaîne glycosylée.

Pour confirmer le rôle de la protéine MUC1 dans l'adhésion, des mesures de force entre de la mucine purifiée et LGG WT ou deux de ses mutants de surface (LGG *spaCBA* et LGG *welE*) sont réalisées par AFM. Le pourcentage d'évènements d'adhésion caractéristique de l'étirement de biomolécules est respectivement de $58,5 \pm 11,5$, $13,0 \pm 1,0$ et $86,0 \pm 2,0$ % pour LGG WT, LGG *spaCBA* et LGG *welE* (**Figure 50**).

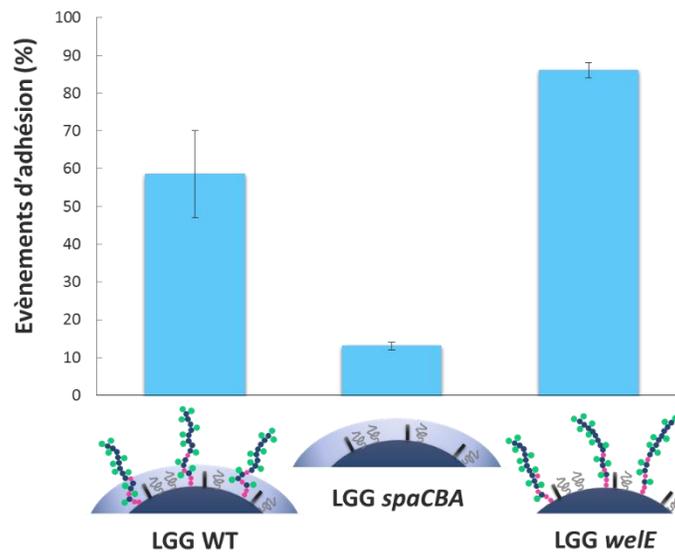


Figure 50 : Quantification des évènements d'adhésion entre la mucine purifiée et LGG sauvage et deux de ses mutants de surface (LGG *spaCBA* et LGG *welE*)

Comme cela a déjà été observé avec la MFGM, les évènements d'adhésion avec LGG *spaCBA* diminuent par rapport à la souche sauvage alors qu'ils augmentent avec LGG *welE*. Ces résultats démontrent le rôle clé du pilus SpaCBA dans l'adhésion entre LGG et la mucine purifiée. Les courbes de retrait enregistrées lors de l'adhésion entre la mucine purifiée et LGG WT (**Figure 51A**), LGG *spaCBA* (**Figure 51B**) et LGG *welE* (**Figure 51C**) confirment le rôle du pilus SpaCBA dans l'adhésion. Les courbes de retrait enregistrées avec LGG WT présentent des signatures spécifiques de l'étirement de biomolécules avec un nombre de rupture moyen de $2,2 \pm 0,1$, une force d'adhésion maximale moyenne de $0,8 \pm 0,1$ nN et une distance de rupture moyenne de $0,7 \pm$

Résultats et discussion

0,0 μm . Les courbes de retrait observées lors de l'adhésion entre LGG et la MFGM ou la mucine purifiée montre des signatures similaires (**Figure 52**), appuyant ainsi le rôle de la protéine MUC1 de la MFGM dans l'adhésion avec LGG. En absence de pilus SpaCBA (mutant *spaCBA*), les signatures spécifiques observées sur les courbes de retrait deviennent rares (13,0 %) et totalement différentes de celles observées avec la souche sauvage (**Figure 51B**). Ces résultats montrent que les pili SpaCBA sont essentiels dans l'adhésion entre LGG et la mucine purifiée.

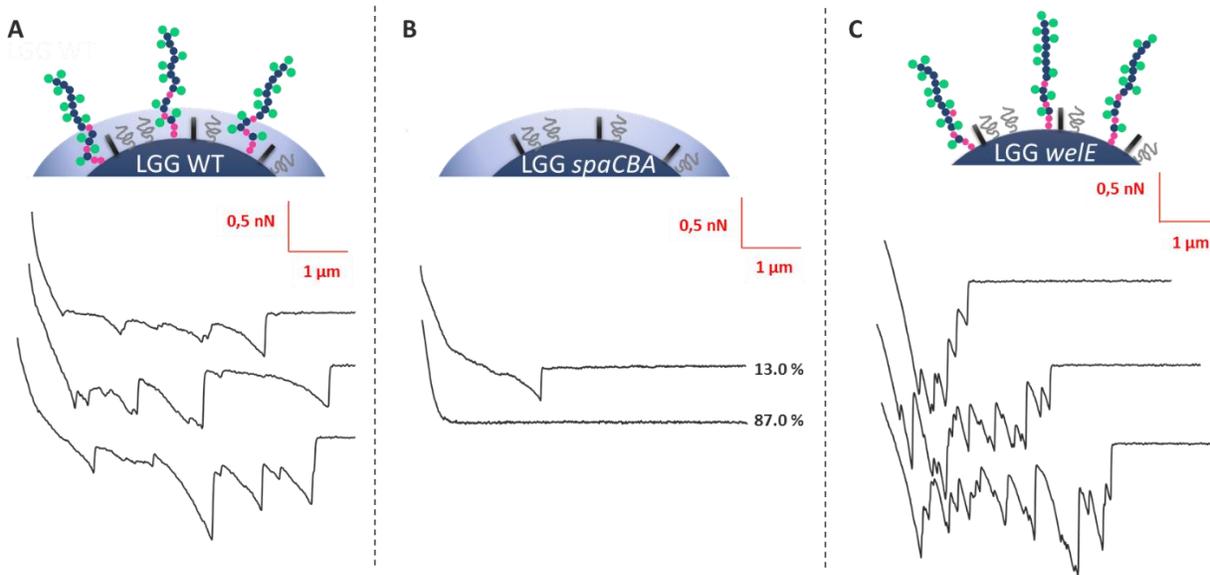


Figure 51 : Courbes de retrait obtenues par AFM présentant des signatures spécifiques lors de l'adhésion de LGG WT, LGG *spaCBA* ou LGG *welE* avec la mucine purifiée. Exemples de courbes de retrait caractéristiques de l'adhésion de la MFGM avec LGG WT (A), LGG *spaCBA* (B) et LGG *welE* (C)

Les courbes de retrait observées lors de l'adhésion entre la mucine purifiée et LGG *welE* sont très saccadées, avec la présence de nombreux pics d'adhésion, et ressemblent à celles observées lors de l'adhésion de LGG *welE* à la MFGM. Cependant les paramètres de forces mesurés sont différents. Les pics d'adhésion présentent des forces d'adhésion plus importantes pour la mucine purifiée ($1,4 \pm 0,0$ nN). Cela peut être lié au fait que la mucine est pure alors que dans la MFGM, la mucine est diluée et mélangée avec un ensemble de protéines et de lipides.

Le profil d'une courbe de retrait caractéristique de l'adhésion entre LGG *welE* et la MFGM est comparé avec celui d'une courbe caractéristique de l'adhésion entre LGG *welE* et la mucine purifiée (**Figure 52B**). Certaines parties de la courbe de retrait de la MFGM sont caractéristiques du motif « glycode » retrouvé sur les courbes de retrait de la mucine, renforçant l'hypothèse que l'adhésion entre LGG et la MFGM est gouvernée par la protéine MUC1. Les signatures observées

sur les courbes de retrait enregistrées lors de l'adhésion entre la MFGM et LGG *welE* présentent des distances de rupture très importantes : $8,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$. Aucune molécule présente à la surface de LGG et présente dans la MFGM ne présente une telle longueur. Ces longues distances pourraient être dues à l'étirement du pilus SpaCBA et de la mucine MUC1 en même temps, et les distances correspondraient au cumul de plusieurs de ces molécules. Une autre explication serait que, contrairement aux autres protéines laitières utilisées dans cette étude qui étaient des protéines purifiées, la MFGM est un mix de plusieurs molécules : des protéines glycosylées, des glycolipides ou encore des phospholipides. Lorsque la mucine MUC1 de la MFGM adhère à la surface de LGG, différentes molécules de la MFGM peuvent être attachées à la protéine MUC1 et donc être étirées lors du retrait de la pointe de la surface de LGG. En effet sur les courbes de retrait observées, les ruptures reviennent plusieurs fois à la ligne de base, ce qui signifie que des molécules individuelles sont successivement décrochées.

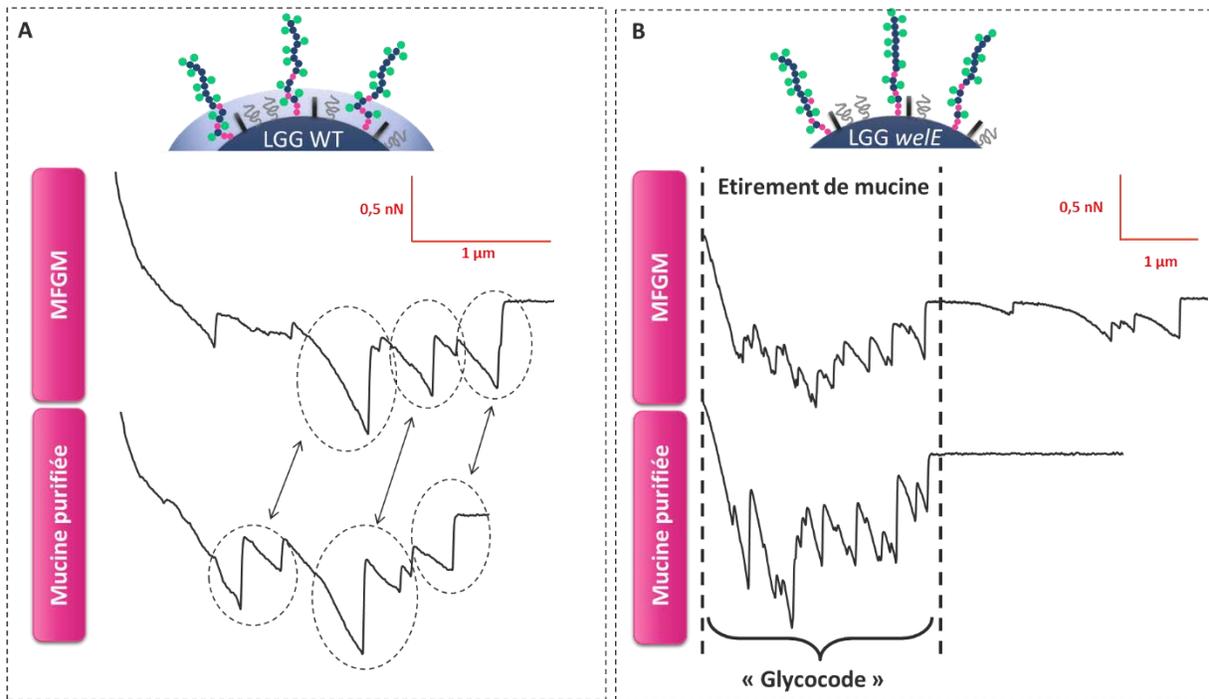


Figure 52 : Comparaison des profils des courbes de retrait observées entre LGG WT (A) ou LGG *welE* (B) et la MFGM ou la mucine purifiée

3. Conclusion

L'étude de l'adhésion entre LGG et les protéines laitières a permis de mettre en évidence différents phénomènes :

- (1) LGG WT interagit spécifiquement avec la β -LG et non avec les caséines, l' α -LA et la BSA. L'utilisation de mutants de surface de LGG démontre le rôle clé du pilus SpaCBA dans l'interaction de LGG WT avec la β -LG.
- (2) D'autres molécules de surface peuvent interagir avec la β -LG, l' α -LA et la BSA lorsque les pili SpaCBA sont absents. Ces molécules pourraient être les longs et/ou les courts EPS et/ou encore les protéines de surface (MabA ou MBF). Toutefois, chez la souche sauvage ces molécules ne semblent pas accessibles et ne permettent pas l'adhésion entre LGG WT et l' α -LA, la BSA et les caséines. De la même façon, ces trois protéines semblent interagir avec des sous-unités de la base du pilus SpaCBA (quand les exopolysaccharides sont absents) mais dans la souche sauvage, celles-ci sont masquées en présence d'EPS et ne permettent pas l'adhésion.
- (3) LGG interagit spécifiquement avec la MFGM. L'utilisation de mutants de surface démontre également le rôle clé du pilus SpaCBA dans l'interaction avec la MFGM.

Ainsi, nous pouvons conclure que l'adhésion entre LGG et la matrice laitière se fait principalement avec la β -LG et la MFGM grâce à la présence de pilus SpaCBA à la surface de LGG. La question qui se pose maintenant est la suivante : la connaissance des acteurs moléculaires impliqués dans les phénomènes d'adhésion entre LGG et les constituants du lait peut-elle modifier la structure de la matrice d'encapsulation et plus particulièrement, être mise à profit pour améliorer l'encapsulation des bactéries (**Figure 53**) ?

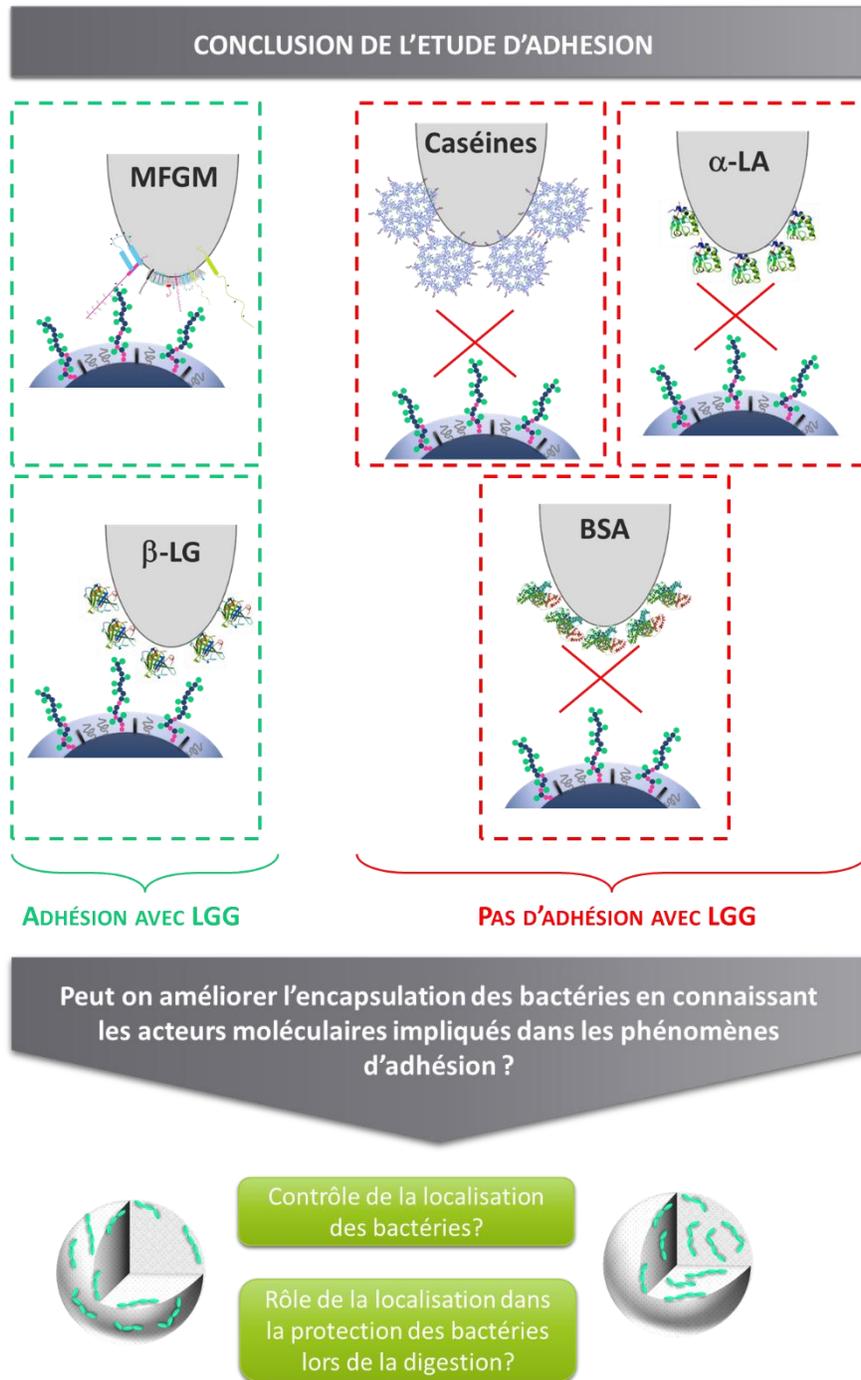


Figure 53 : Bilan de l'adhésion entre LGG et la matrice laitière

II. LA STRUCTURATION DE LA MATIERE EST-ELLE INFLUENCEE PAR L'ADHESION ENTRE BACTERIES ET MATRICE ?

L'étude de l'adhésion entre LGG et les différents constituants du lait révèle que LGG peut interagir spécifiquement avec la β -LG et la MFGM. De plus, les interactions entre les bactéries et les protéines laitières contrôlaient la localisation des bactéries à l'intérieur de la matrice lorsque celles-ci étaient encapsulées (Burgain *et al.*, 2014c). La composition de la matrice d'encapsulation est très importante car elle peut contrôler la localisation des bactéries dans l'espace. La sélection de la matrice d'encapsulation semble donc être une étape cruciale lors de l'encapsulation de bactéries pour une protection optimale jusqu'à ce qu'elles atteignent l'intestin. En effet, une matrice efficace doit d'abord protéger les bactéries au cours du stockage, de la conservation dans l'aliment puis lors de la digestion gastrique et enfin permettre la libération des bactéries au niveau de l'intestin dans un état viable et fonctionnel.

L'objectif ici est d'étudier l'impact de l'adhésion entre LGG et les protéines laitières sur la structuration de la matrice d'encapsulation. Pour cela, les bactéries ont été encapsulées par émulsification en utilisant différentes matrices d'encapsulation présentant différents ratios de caséines et de PS. Le procédé d'encapsulation utilisé a été développé dans une précédente thèse effectuée par Jennifer BURGAIN (Burgain *et al.*, 2014b). Les microparticules fraîchement produites ont été observées par des techniques de microscopie comme le MEB ou le CLSM pour caractériser la microstructure et la localisation des bactéries dans la matrice d'encapsulation. Ces deux techniques de microscopie ont également permis d'étudier l'impact de la digestion gastro-intestinale sur la structure des particules et sur la viabilité des bactéries. L'objectif est de formuler une matrice capable de protéger les bactéries au cours de la digestion gastrique et de les libérer vivantes au niveau de l'intestin.

1. Impact de la composition de la matrice d'encapsulation dans la protection et la libération de LGG

1.1. Choix des formulations utilisées

Précédemment, il a été montré que LGG pouvait adhérer spécifiquement à la β -LG (I. Etude de l'adhésion entre LGG et les protéines laitières). L'objectif ici est d'étudier l'impact de l'adhésion entre LGG et la β -LG sur la structuration de la matière et plus particulièrement lors de l'encapsulation. Les bactéries sont encapsulées dans différentes matrices protéiques grâce à un procédé d'encapsulation par émulsification, développé dans une précédente thèse au laboratoire (Burgain, 2013). Il a déjà été montré que l'augmentation de la concentration en PS dans la matrice d'encapsulation améliorait la survie de LGG au cours de la digestion gastrique (Burgain, 2013). L'objectif ici est de caractériser plus finement l'impact de la concentration en PS sur la localisation des bactéries dans la microparticule et sur la structure de la matrice au cours de la digestion. Pour cela, différents ratio de caséines/PS dans la matrice d'encapsulation ont été étudiés: 100/0, 80/20 et 60/40, respectivement. Il est nécessaire de garder une concentration en caséines assez élevée pour garantir la formation du réseau protéique lors du procédé par émulsification et pour assurer la résistance des microparticules au cours de la digestion. La formulation 80/20 a été choisie car elle correspond aux proportions de caséines et de PS retrouvées naturellement dans le lait. Les formulations 100/0 et 60/40 sont deux formulations extrêmes permettant d'accentuer les différences afin de pouvoir comparer l'impact l'absence et l'abondance de PS dans la matrice.

1.2. Caractérisation structurale des microparticules

La surface et l'intérieur des microparticules ont été observés par MEB pour étudier l'influence des trois formulations sur leur microstructure et la localisation des bactéries dans le réseau formé (**Figure 54**). La matrice composée uniquement de caséines apparaît très dense et non poreuse (**Figure 54 A1**) et les bactéries se trouvent principalement à la surface des microparticules (**Figure 54 A2**). Seules quelques bactéries sont visualisées à l'intérieur des microparticules (**Figure 54A1**). En revanche, pour les deux formulations contenant des PS, la plupart des bactéries sont situées à

Résultats et discussion

l'intérieur des microparticules (**Figure 54 B1 et C1**) et seules quelques-unes sont présentes à la surface (**Figure 54 B2 et C2**). Des différences de densité de la matrice sont observées en fonction de la concentration en PS utilisée. Une augmentation de leur concentration conduit à une porosité plus élevée.

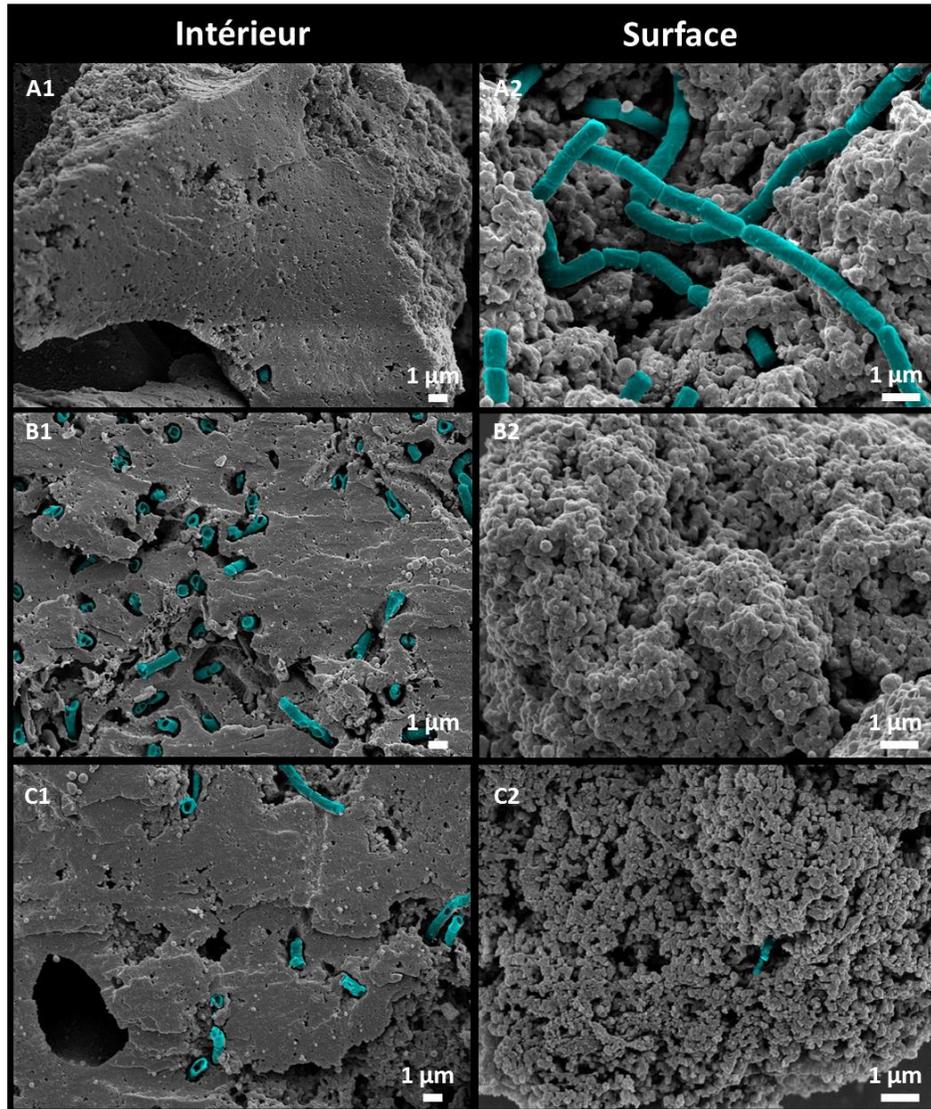


Figure 54 : Localisation de LGG à l'intérieur (1) et à la surface (2) des microparticules pour les trois formulations contenant divers rapports de caséines / PS : 100/0 (A) ; 80/20 (B) et 60/40 (C). L'observation a été faite par MEB à deux grossissements 5000 × et 10 000 ×. Pour une meilleure visualisation, les bactéries ont été colorées artificiellement en bleu avec le logiciel ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Etats-Unis)

La localisation des bactéries dans les microparticules semble être clairement régie par la composition de la formulation. De récents travaux démontrent que LGG présente la capacité d'adhérer avec les PS (Burgain *et al.*, 2014c) et il a été montré dans ce manuscrit que cette adhésion est majoritairement portée par la β -LG. Ces adhésions peuvent être responsables de la localisation des bactéries à l'intérieur des microparticules lorsque des PS sont présentes. Lorsque la matrice est composée uniquement de caséines, LGG pourrait avoir une préférence pour l'interface eau/huile pendant le processus d'encapsulation induisant son emplacement final à la surface de la microparticule. La localisation des bactéries dans la matrice peut avoir un impact important sur leur survie au cours de la digestion gastrique. Dans les microparticules, des bactéries localisées en surface seront plus exposées à l'acidité de l'estomac et à la présence d'enzymes protéolytiques que des bactéries localisées à l'intérieur. La localisation des bactéries en surface peut donc affecter négativement leur survie au cours de la digestion gastrique.

1.3. Caractérisation des microparticules au cours de la digestion gastrique et intestinale *in vitro*.

La taille, la forme, l'évolution de la dégradation des microparticules et la répartition des bactéries dans les microparticules ont été observées au cours de la digestion par MEB. Des images représentatives des phénomènes observés sont présentées au début de la digestion gastrique (**Figure 55**), à la fin de la digestion gastrique (**Figure 56**) et à la fin de la digestion intestinale (**Figure 57**).

Au cours de la digestion gastrique, les microparticules produites avec les formulations 100/0 (**Figure 55 A1, A2** et **Figure 56 A1, A2**) et 80/20 (**Figure 55 B1, B2** et **Figure 56 B1, B2**) sont stables et gardent leur intégrité du début à la fin. Comme cela a déjà été décrit pour les microparticules fraîches pour la formulation 100/0, les bactéries sont présentes en grande quantité à la surface des microparticules. A l'inverse, aucune bactérie n'est présente en surface pour la formulation 80/20. Le comportement des microparticules produites avec la formulation 60/40 est radicalement différent lors de la digestion gastrique. En effet, les microparticules sont partiellement digérées dès le début de la digestion gastrique (**Figure 55 C1, C2**). A ce stade, des particules plus petites apparaissent et des bactéries libres dans le milieu ou incluses dans une matrice désintégrée

Résultats et discussion

sont observées. A la fin de la digestion gastrique (**Figure 56 C1, C2**), les bactéries sont toutes libérées des microparticules et se retrouvent dans le milieu. Certains fragments de microparticules sont encore détectables mais ils étaient pour la plupart désintégrés à la fin de la digestion gastrique.

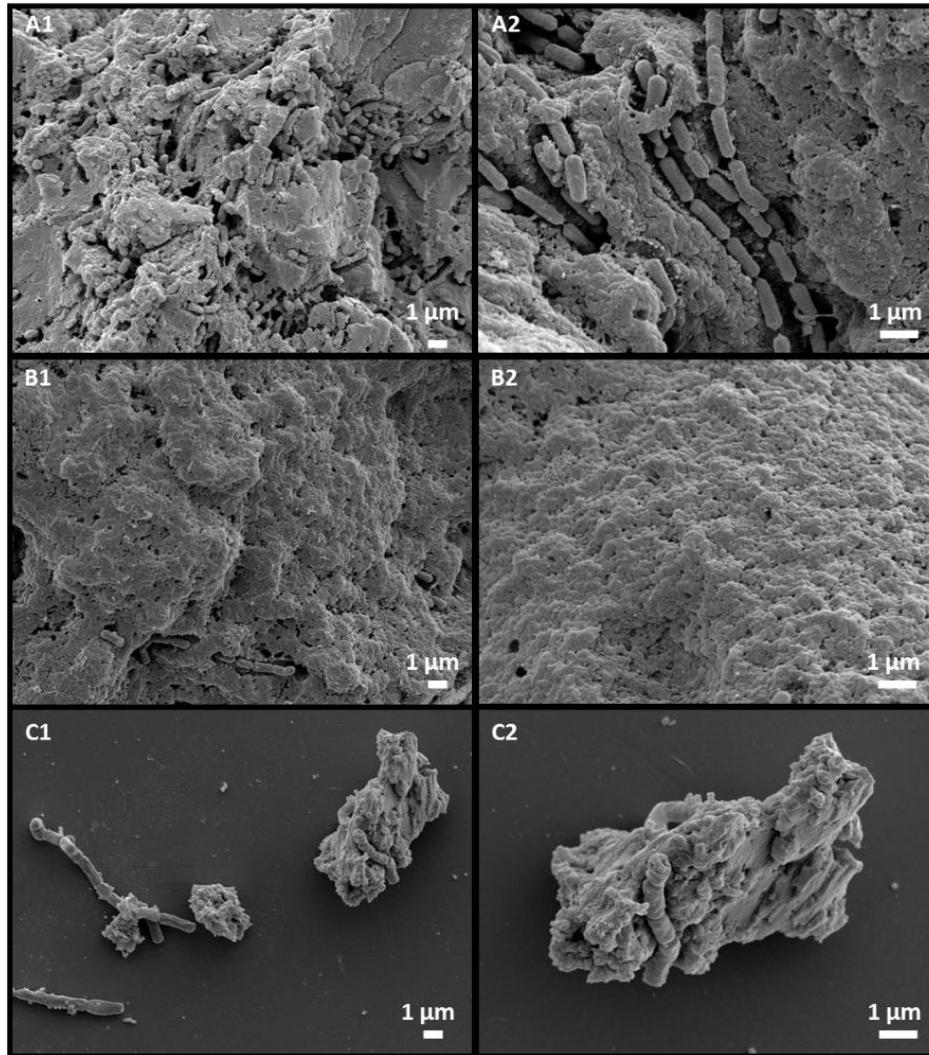


Figure 55 : Microparticules prélevées en début de digestion gastrique *in vitro* et observées par MEB à deux grossissements $5\,000\times$ (1) et $10\,000\times$ (2). Les trois formulations contiennent divers ratios de caséine/PS 100/0 (A); 80/20 (B) et 60/40 (C)

Même si leurs comportements sont similaires au cours de la digestion gastrique, les microparticules composées uniquement de caséines et de 20 % de PS, présentent un comportement très différent lors de la digestion intestinale. Pour la formulation 100/0, la structure des particules est faiblement affectée par le milieu de digestion et les microparticules restent stables jusqu'à la fin de la digestion intestinale, avec des bactéries incluses dans la matrice (**Figure 57 A1, A2**). En revanche, pour la

formulation 80/20, la majorité des microparticules sont dissociées et les bactéries sont libérées dans le milieu (**Figure 57 B1, B2**). Pour la formulation 60/40, la structure initiale de la microparticule est complètement désintégrée au cours de la digestion gastrique et seulement quelques fragments résiduels sont visualisés dans l'intestin (**Figure 57 C1, C2**). Pour cette formulation, les bactéries sont déjà pour la plupart sous forme libre quand elles arrivent dans l'intestin.

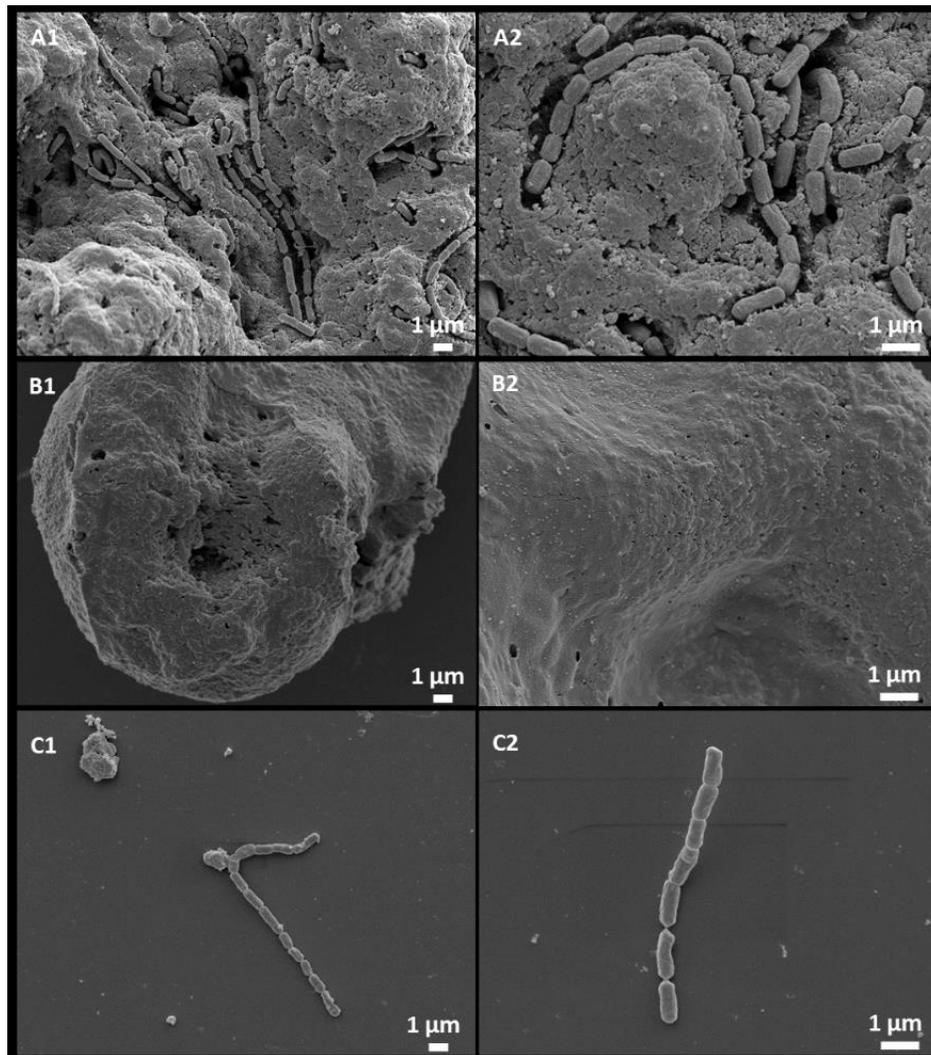


Figure 56 : Microparticules prélevées en fin de digestion gastrique *in vitro* et observées par MEB à deux grossissements $5\,000\times$ (1) et $10\,000\times$ (2). Les trois formulations contiennent divers ratios caséine/PS : 100/0 (A), 80/20 (B) et 60/40 (C)

Résultats et discussion

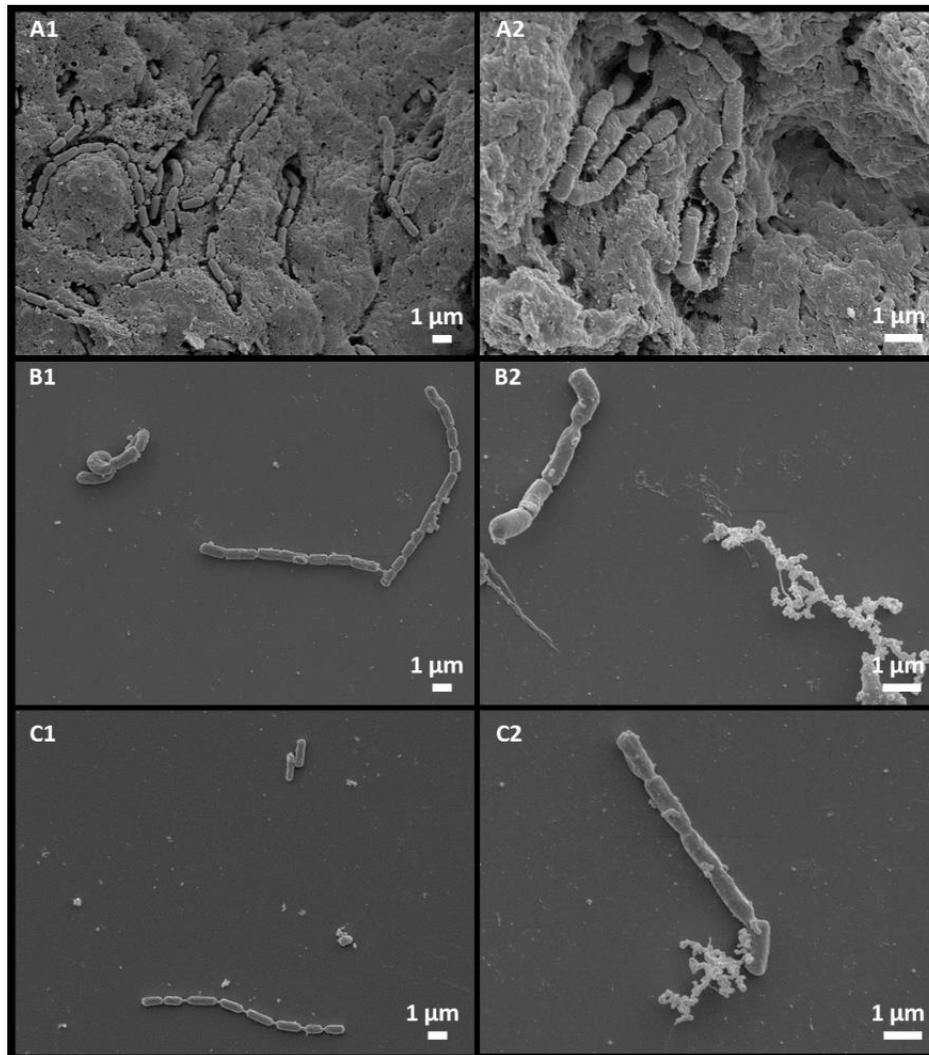


Figure 57 : Microparticules prélevées en fin de digestion intestinale *in vitro* et observées par MEB à deux grossissements $5\ 000\times$ (1) et $10\ 000\times$ (2). Les trois formulations contiennent divers ratios caséine/PS : 100/0 (A), 80/20 (B) et 60/40 (C)

Le comportement différent des formulations 100/0 et 80/20 lors de la digestion intestinale peut être expliqué grâce à la structure de la matrice (**Figure 58**). En fin de digestion intestinale, quand la matrice est composée uniquement de caséines, elle est très dense et le réseau de protéines semble conservé tout au long de la digestion. En revanche, l'ajout de PS entraîne la présence d'une matrice plus poreuse et spongieuse en fin de digestion intestinale.

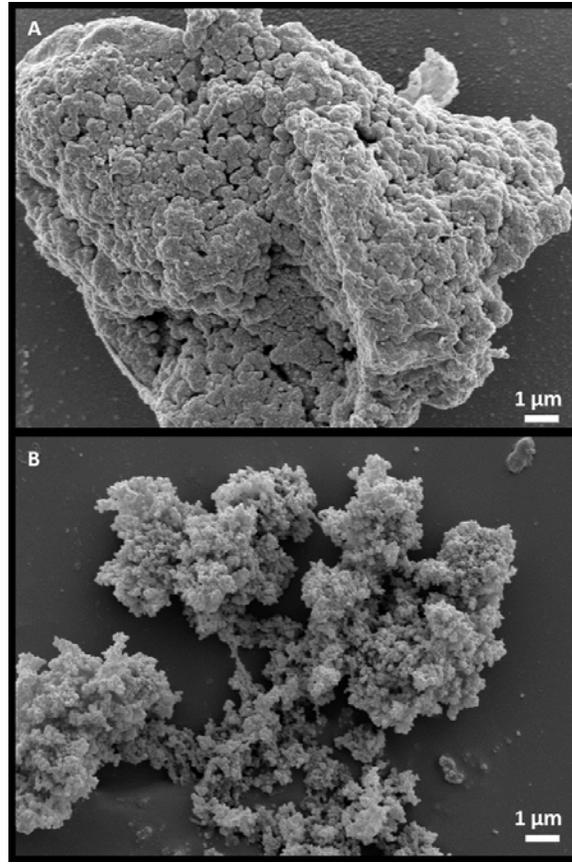


Figure 58 : Structure résiduelle des microparticules observées à la fin de la digestion intestinale *in vitro* par MEB au grossissement 10 000 ×. Les deux formulations contiennent des ratios de caséine/PS de 100/0 (A) et 80/20 (B)

1.4. Survie des bactéries au cours de la digestion

Le MEB a permis d'évaluer la structure de la matrice, la taille et la forme des microparticules ainsi que la localisation des bactéries dans la microparticule au cours de la digestion. Par contre, cette technique ne permet pas de fournir des informations sur la viabilité des bactéries au cours de la digestion. Pour corréler la viabilité des bactéries à leur localisation dans la microparticule et à l'évolution de la structure de la microparticule lors de la digestion, le CLSM a été utilisé (**Figure 59**). Grâce à l'utilisation de deux sondes fluorescentes, il est notamment possible de différencier les cellules selon l'intégrité de leur membrane. En effet, lorsque les bactéries possèdent une paroi cellulaire intacte, elles apparaissent vertes et sont alors considérées comme vivantes. A l'inverse,

Résultats et discussion

lorsque la paroi cellulaire des bactéries est endommagée, les bactéries apparaissent rouges et sont donc considérées comme mortes.

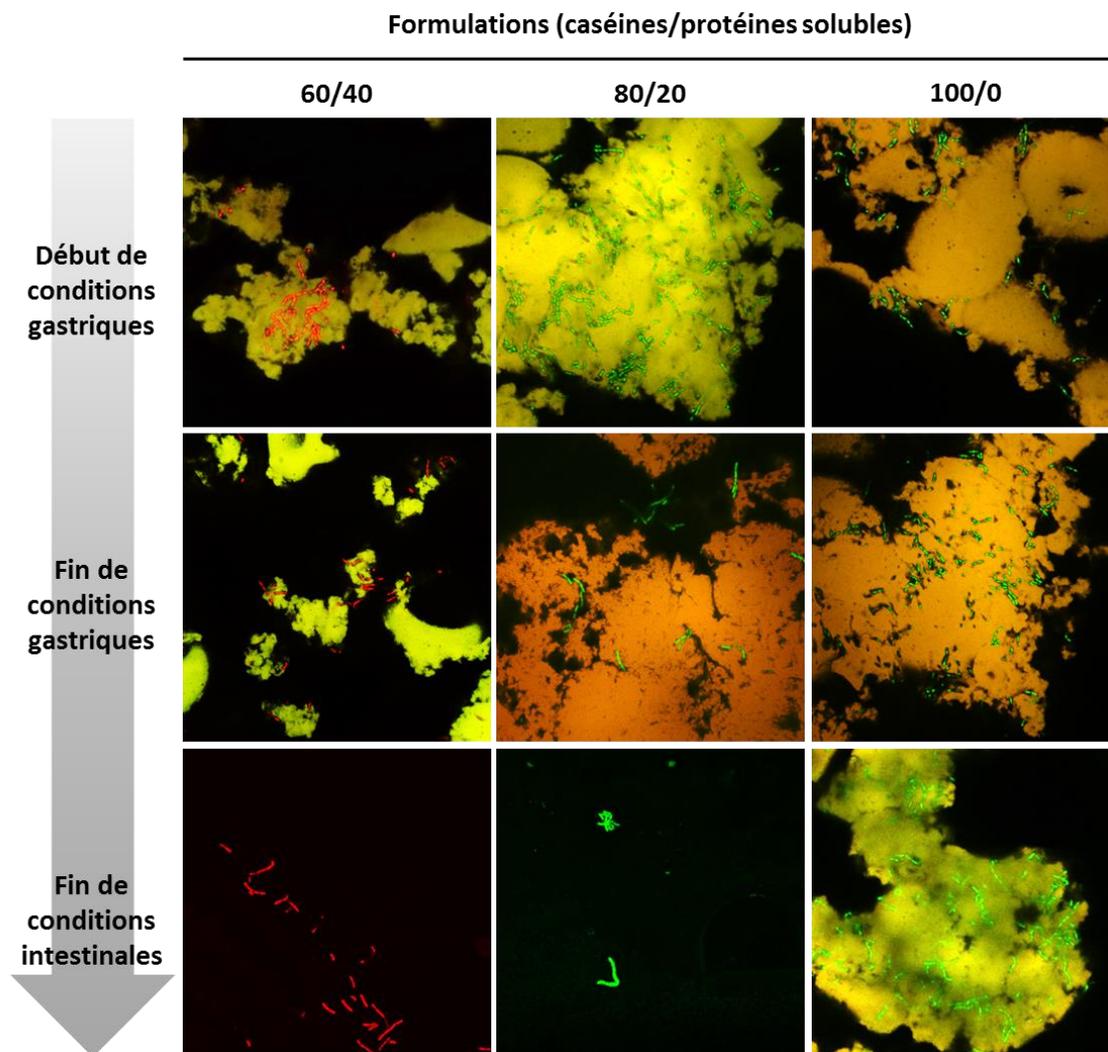


Figure 59 : Viabilité bactérienne observée par CLSM lors de la digestion gastrique et intestinale *in vitro*.

Des images ont été réalisées en début de digestion gastrique, en fin de digestion gastrique et en fin de digestion intestinale. Les bactéries présentant une paroi cellulaire intacte (et considérées comme vivantes) apparaissent en vert et les bactéries présentant une paroi cellulaire endommagée (et considérées comme mortes) apparaissent en rouge

Pour les formulations 100/0 et 80/20, de nombreuses bactéries vivantes sont observées après la digestion gastrique. En revanche, la présence de bactéries mortes est observée pour la formulation 60/40, dès le début de la phase gastrique (**Figure 59**).

Après la digestion intestinale, une majorité de bactéries vivantes sont encore observées pour les formulations 100/0 et 80/20. Cependant, des différences sont observées dans l'intégrité de la

matrice : les bactéries vivantes se retrouvent encore dans la matrice pour la formulation 100/0 tandis que des bactéries vivantes sont libres dans le milieu intestinal pour la formulation 80/20 (**Figure 59**). Comme prévu pour la formulation 60/40, après digestion intestinale, des bactéries mortes et libres dans le milieu sont observées sur toutes les images, ce qui signifie que la majorité des bactéries n'ont pas survécu au processus de digestion.

La survie de LGG lors de la digestion *in vitro* dépend donc fortement de la formulation de la matrice. Lorsque la matrice est composée uniquement de caséines, la viabilité de LGG est conservée à la fois dans l'estomac et dans l'intestin. Les mêmes observations sont faites avec la formulation 80/20. En revanche, avec la formulation 60/40, la viabilité des bactéries est affectée dès le début de la digestion gastrique. La proportion de caséines constituant la matrice influence également fortement l'efficacité de la protection des bactéries pendant la digestion. En particulier, un niveau plus élevé de caséines conduit à une meilleure viabilité bactérienne. Le comptage bactérien avec les mêmes formulations a été fait dans une étude antérieure de notre équipe (Burgain *et al.*, 2013a) et leurs résultats ont montré la même tendance en fonction des formulations.

L'effet protecteur du caséinate de sodium ou des microparticules de caséines insolubles dans l'eau (obtenues par gélification des caséines sous l'action de la présure) sur la viabilité des bactéries au cours de la digestion gastrique a déjà été démontré (Heidebach *et al.*, 2009a; Burgain *et al.*, 2013a). La matrice laitière peut avoir un effet protecteur pour les bactéries grâce à l'effet tampon des protéines du lait. Les microparticules utilisées dans notre étude étant riches en protéines laitières, un gradient de pH peut avoir lieu autour des microparticules et assurer la présence d'un pH plus neutre à l'intérieur des microparticules, améliorant ainsi la protection des bactéries (Heidebach *et al.*, 2009a). La matrice protéique permettrait donc de retarder l'exposition des bactéries au faible pH de l'estomac (Würth *et al.*, 2015). L'exposition retardée et progressive du faible pH permettrait aux bactéries de s'adapter au pH stressant de l'estomac et donc de mieux résister à cette exposition (Heidebach *et al.*, 2010).

En plus de l'effet protecteur des caséines, la structure des microparticules joue un rôle clé dans la protection de LGG pendant la digestion. Dans notre étude, la formulation régit la structure interne des microparticules et affecte directement la viabilité des bactéries pendant la digestion. Lorsque les caséines sont en quantité suffisante (pour les formulations 100/0 et 80/20), les microparticules ont une structure dense et de faible porosité. En revanche, pour la formulation 60/40, la

Résultats et discussion

concentration en caséines est plus faible et la structure des microparticules est moins dense et plus poreuse. L'importance de la structure sur la désintégration des aliments dans le tractus gastro-intestinal a été démontrée (Singh *et al.*, 2015). Des liens ont été établis entre les taux de désintégration ou les taux d'hydrolyse des gels alimentaires et la structure de l'aliment. Par exemple, Barbé *et al.* (2013) ont démontré que des gels présure de protéines laitières présentent une microstructure dense qui ralentit le taux de désintégration au cours de la digestion gastrique. Guo *et al.* (2016) ont également étudié le comportement de gels de PS au cours de la digestion. La fermeté du gel joue un rôle important lors de la dégradation d'un gel pendant la digestion. D'une manière générale, une augmentation de la fermeté du gel diminue leur taux de désintégration dans l'estomac (Singh *et al.*, 2015).

Dans notre étude, des analyses de rhéologie par compression de la matrice ont été réalisées pour déterminer le comportement de déformation de la matrice tout au long de la digestion gastrique. Les résultats sont présentés sous forme de courbes montrant les valeurs de force en fonction du déplacement du module ou de l'épaisseur de l'échantillon (**Figure 60A**). Les courbes de compression obtenues pour les gels issus des trois formulations, et n'ayant pas été soumis à la digestion gastrique, ont toutes le même comportement. La différence entre les gels est la valeur de déplacement à atteindre pour avoir une valeur de force donnée. La valeur de déplacement est la plus importante pour la formulation 60/40 et la moins importante pour la formulation 100/0. Le déplacement du module pour atteindre une force de compression donnée est plus important pour un matériau déformable que pour un matériau non déformable comme cela est présenté dans la **Figure 60B**. Plus le gel est déformable, plus la valeur de déplacement est importante. De la même façon, plus le gel est déformable et plus l'épaisseur de l'échantillon est réduite. Ainsi, la formulation 100/0 possède systématiquement la structure de gel la moins déformable. En revanche, la formulation 60/40 présente toujours un comportement de gel plus déformable. La formulation 80/20 a un comportement intermédiaire.

En ce qui concerne la stabilité après la digestion gastrique, la même tendance est observée pour les différentes formulations (**Figure 60A**). Pour une même formulation, les courbes force-déplacement sont décalées mais l'ordre est le même : la formulation 100/0 est la moins déformable et la formulation 60/40 est la plus déformable.

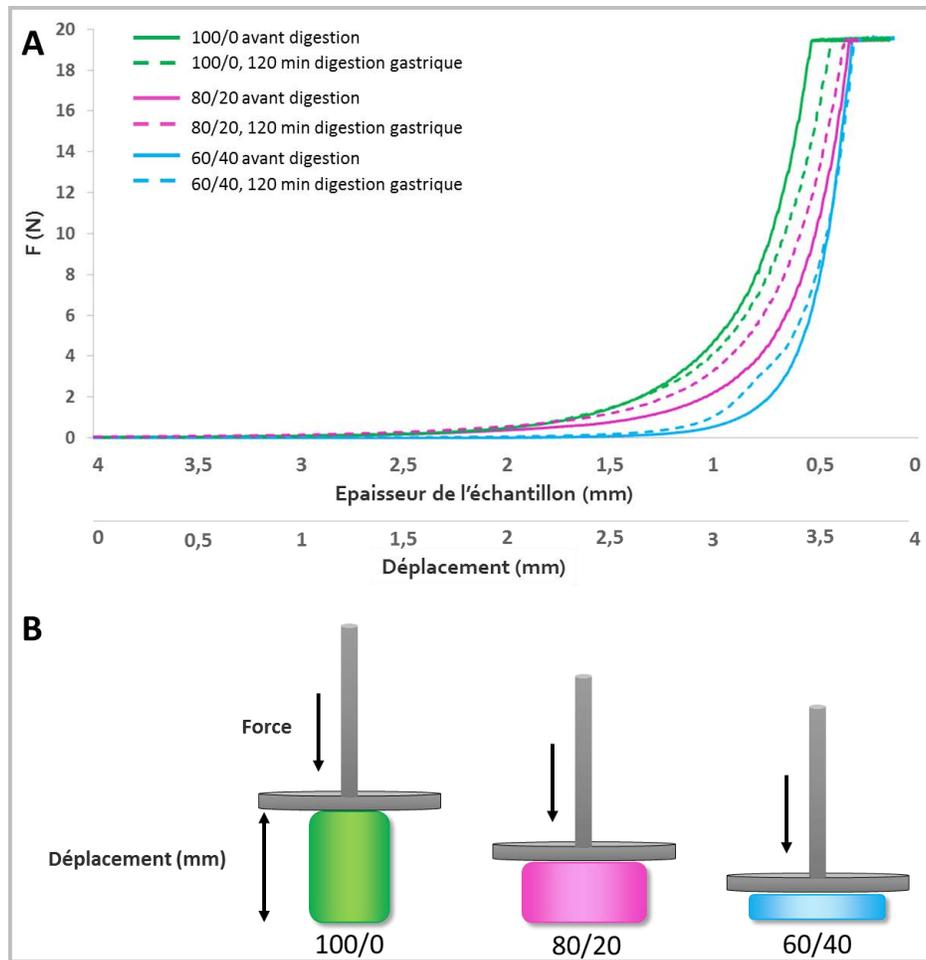


Figure 60 : Courbes de déplacement de force pour les trois formulations de ratios caséine/PS (100/0, 80/20 et 60/40) avant et après digestion gastrique (A). Représentation schématique du comportement de la matrice pendant la compression (B)

Lorsque la matrice est composée uniquement de caséines, les différences de déformation observées avant et après la digestion sont facilement compréhensibles et certainement liées à la fermeté des gels. La complexité de la composition des matrices 80/20 et 60/40, composées de PS et de caséines, ne permet pas de faire une corrélation directe entre la fermeté du gel et sa déformation avant et après digestion gastrique. En effet, pour une même formulation, les matrices sont plus déformables avant qu'après la digestion. Ceci peut-être dû aux diverses modifications physicochimiques des colloïdes présents dans la matrice qui se produisent tout au long du transit gastro-intestinal. En combinant ces résultats avec nos résultats d'imagerie, certaines hypothèses peuvent être proposées. En raison de la densité de la matrice (**Figure 58**) et du faible comportement déformable (**Figure 60**) de la formulation 100/0, la diffusion de la pepsine à l'intérieur des microparticules est probablement limitée et l'hydrolyse des protéines est ralentie (Ye *et al.*, 2016). Ainsi, les bactéries

Résultats et discussion

présentes à l'intérieur des microparticules sont protégées lors de la phase gastrique. En revanche, les microparticules produites avec la formulation 60/40 présentent une structure plus molle (**Figure 60**) et lâche (**Figure 54**) responsable de la déstructuration rapide des microparticules dans l'estomac. Dans ce cas, les bactéries sont libérées à un stade précoce de la digestion et la composition du milieu est défavorable à leur survie. C'est pourquoi une perte importante de bactéries viables est observée. Pour une structure lâche, Ye *et al.* (2016) ont démontré une diffusion rapide de la pepsine à l'intérieur des microparticules provoquant une hydrolyse rapide des protéines laitières. La forte mortalité de bactéries observée pour cette formulation peut s'expliquer par un contact direct avec des conditions stomacales agressives (pH bas, présence d'enzyme protéolytique) en raison de l'absence de protection des microparticules.

1.5. Conclusion

Pour la première fois, des techniques de microscopie complémentaires (MEB et CLSM) ont été utilisées pour mettre en évidence l'importance de la composition de la matrice sur l'encapsulation des bactéries et l'impact de la concentration en PS. Les résultats obtenus sont résumés dans un schéma bilan sur la **Figure 61**.

Tout d'abord, la composition de la matrice influence significativement l'emplacement des bactéries dans les microparticules. Les PS impactent la localisation des bactéries dans les microparticules en favorisant leur localisation à l'intérieur. Cette localisation préférentielle à l'intérieur de la microparticule peut être possible grâce au phénomène d'adhésion entre les bactéries et la β -LG. Ainsi, en connaissant les acteurs moléculaires impliqués dans les phénomènes d'adhésion, il semble donc possible de prédire la localisation de la bactérie dans les microparticules.

Ensuite, la concentration en PS impacte l'intégrité de la matrice pendant la digestion et la survie des bactéries jusqu'à ce qu'elles atteignent l'intestin. En sélectionnant judicieusement le ratio caséines/PS, il est possible de trouver une matrice capable de préserver la viabilité des bactéries lors de la digestion gastrique et intestinale et de libérer les bactéries vivantes au niveau de l'intestin. Il est nécessaire d'avoir suffisamment de caséines pour maintenir un réseau protéique dense, mais il faut également avoir une concentration en PS permettant à la matrice de se désintégrer au niveau

de l'intestin. Dans ce travail, seule la formulation 80/20 permet la protection de la viabilité des bactéries lors de la digestion gastrique et la libération des bactéries vivantes au niveau de l'intestin.

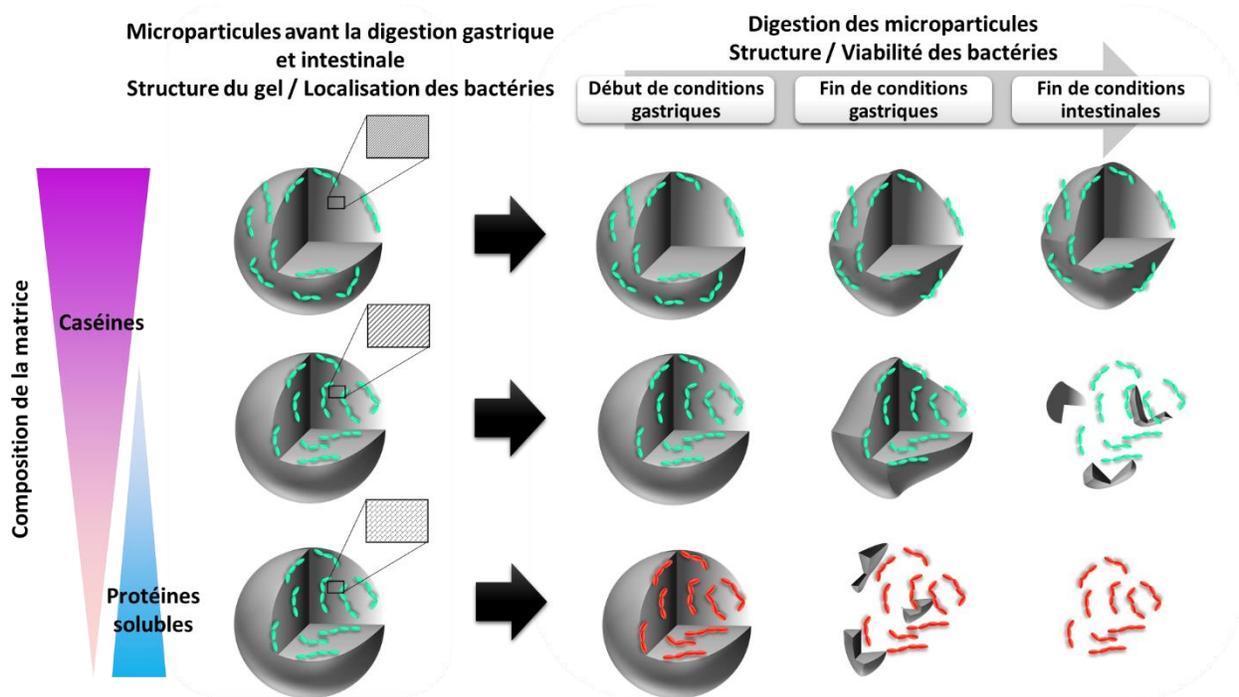


Figure 61 : Synthèse sur l'influence de la composition de la matrice d'encapsulation sur la structure des microparticules et leur comportement lors de la digestion

2. Incorporation de la MFGM dans la matrice d'encapsulation

2.1. Intérêt de l'utilisation de la MFGM

La localisation des bactéries dans les microparticules semble être clairement régie par la composition de la formulation et par les adhésions entre les bactéries et la matrice laitière. En effet, l'adhésion entre LGG et la β -LG semble favoriser la localisation de LGG à l'intérieur de la matrice et ainsi améliorer sa survie au cours de la digestion gastrique.

Nous avons démontré précédemment par AFM que LGG était également capable d'adhérer à la MFGM. Ainsi, l'ajout de MFGM dans la matrice d'encapsulation pourrait également améliorer la localisation des bactéries à l'intérieur de la microparticule. Les bactéries seraient mieux protégées contre les conditions drastiques de l'estomac (pH acide, présence de pepsine) et les bactéries

Résultats et discussion

atteindraient leur site cible (l'intestin) dans un état viable et fonctionnel. En plus de ses effets positifs sur la santé, la capacité d'adhésion aux bactéries fait de la MFGM un ingrédient très intéressant pour l'encapsulation de bactéries.

Pour étudier le potentiel de la MFGM en tant qu'ingrédient pour l'encapsulation de LGG, l'impact de l'ajout de la MFGM sur la rhéologie et la texture des gels obtenus lors du procédé d'encapsulation sont étudiés en utilisant un plan de mélanges.

2.2. Caractérisation de la MFGM

La MFGM utilisée dans ce travail est composée de $36,9 \pm 8,9$ % de protéines et de $28,3 \pm 0,4$ % de lipides. Un gel SDS-PAGE révèle la présence de nombreuses protéines de la MFGM : XO, PAS3, BTN, ADPH, PAS 6/7 et FABP (Figure 62).

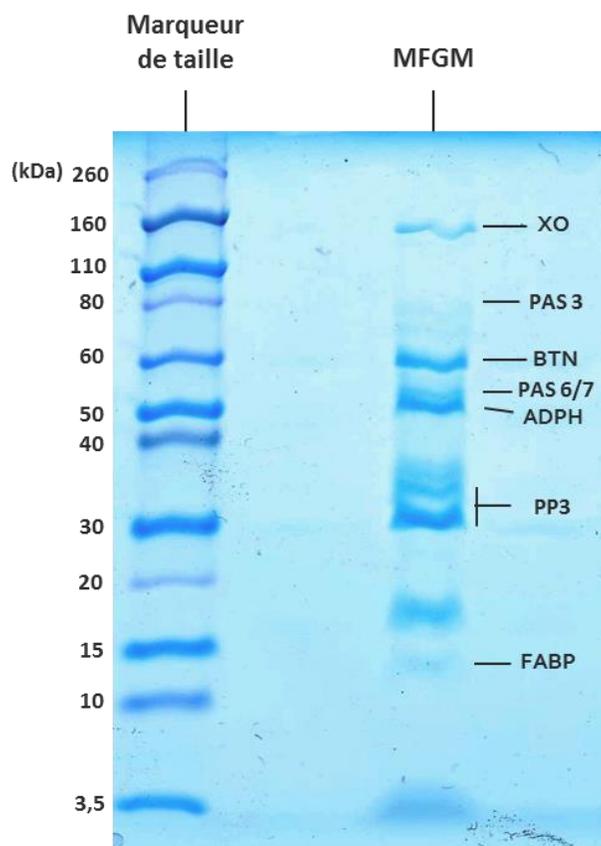


Figure 62 : Composition protéique de la MFGM par gel SDS-PAGE 8 %

Des fractions majeures et mineures de PP3 sont estimées avec un poids moléculaire entre 28 et 35 kDa. L'étendue des bandes PP3 est causée par sa forte glycosylation (Rombaut *et al.*, 2007). La protéine MUC1 n'est pas visualisée sur le gel. Les conditions de migration n'ont peut-être pas permis de séparer les mucines du fait de leur forte glycosylation. De plus, lors du procédé d'extraction, les mucines ont pu s'agréger entre elles et créer un polymère de haut poids moléculaire, impossible à séparer sur le gel SDS-PAGE (Bansil & Turner, 2006).

2.3. Effet de l'addition de MFGM sur la rhéologie et la structure des gels obtenus

Le plan de mélanges pour les quatre constituants permet de générer un modèle mathématique présentant les effets et les interactions entre les différents constituants dans les conditions expérimentales choisies (**Tableau 15**). Le modèle mathématique permet de générer des surfaces de réponse permettant de connaître la valeur théorique de chacune des réponses étudiées sur l'ensemble du domaine d'étude (**Figure 63**). Une courbe d'isoreponse réunit tous les mélanges possédant la même valeur de réponse. Ces représentations graphiques permettent d'identifier la composition du mélange optimal à formuler pour atteindre des valeurs de réponses ciblées.

Pour tracer les courbes d'isoreponses (**Figure 63**), il est nécessaire de fixer un des quatre constituants du mélange. Dans le cas présent, le choix de la teneur en caséines a été fixé à 80 %. Cette proportion correspond à la proportion de caséines présente dans la matrice étudiée dans la partie précédente, capable de préserver la viabilité des bactéries lors de la digestion gastrique et intestinale et de libérer les bactéries vivantes au niveau de l'intestin. Ainsi les 20 % restants contiendront un mélange de PS natives, de PS dénaturées et de MFGM, dont les proportions sont à déterminer selon les réponses attendues. Dans ce travail, les réponses ont été choisies dans le but d'obtenir un gel le plus ferme possible et le plus rapidement possible. En effet, plus le gel est ferme et plus le taux de désintégration de ce dernier dans l'estomac est lente (Singh *et al.*, 2015). Pour cela les réponses attendues sont : une température de gélification la plus basse possible et des modules élastique et visqueux les plus élevés.

L'objectif de ce travail est d'observer l'effet de l'addition de la MFGM dans la matrice sur la rhéologie et la structure des gels produits. Le calcul des coefficients pour la MFGM seule (b_4)

Résultats et discussion

montre que la MFGM est le composé qui influence le plus la température de gélification, le module élastique et le module visqueux (**Tableau 15**).

Tableau 15 : Coefficient du modèle mathématique dérivé de la matrice de Scheffé pour les réponses : température de gélification, module élastique, module visqueux et teneur en eau pour les différentes formulations de la matrice. Le coefficient R² pour chaque modèle utilisé est présenté en dessous de chaque colonne

	Nom	Température de gélification	Coefficient		
			G'	G''	Teneur en eau
Caséines	b ₁	30,81	77,51	28,62	79,40
PS natives	b ₂	-72,07	1588,45	529,16	84,00
PS dénaturées	b ₃	-68,19	3984,76	1358,16	150,28
MFGM	b ₄	130,35	-8444,114	-2847,97	80,94
Interaction d'ordre 2 entre les constituants	b ₁₋₂	110,67	-1925,27	-651,33	7,42
	b ₁₋₃	101,86	-5111,23	-1772,52	-51,40
	b ₂₋₃	6617,94	-273961,03	-92925,21	-4520,46
	b ₁₋₄	-143,51	11067,47	3729,05	27,99
	b ₂₋₄	-7263,16	257800,07	88699,83	3820,32
Interaction d'ordre 3 entre les constituants	b ₃₋₄	-4860,16	183763,262	60819,68	2821,50
	b ₁₋₂₋₃	-8218,22	344788,96	116748,56	5498,38
	b ₁₋₂₋₄	8888,22	-316400,29	-108895,76	-4989,62
	b ₁₋₃₋₄	6135,96	-230637,97	-76625,82	-3703,36
	b ₂₋₃₋₄	12279,316	-244321,15	-77131,75	-2697,59
	R ²	0,81	0,90	0,91	0,82

L'effet de la MFGM seule, influence positivement la température de gélification (augmentation de la réponse avec l'augmentation des proportions de ce constituant) et influence négativement les modules élastique et visqueux (diminution de la réponse avec l'augmentation des proportions de ce constituant). La MFGM diminuerait donc la fermeté du gel et le temps pour obtenir un gel. Ces résultats sont en accord avec les études de Morin *et al.* (2008) sur l'impact de l'ajout de babeurre sur les propriétés de gels obtenus par coagulation enzymatique par de la présure. Dans leur étude, le suivi du module élastique G' montre que l'addition de babeurre contenant de la MFGM diminue la fermeté du gel. Morin *et al.* (2008) mettent également en relation la fermeté et la microstructure du gel. Une diminution de la fermeté du gel entraîne une microstructure plus poreuse et moins dense.

Seulement les courbes d'isoreponses (**Figure 63**) montrent un effet inverse de la MFGM. L'augmentation de la proportion en MFGM diminue la température de gélification et augmente le module élastique et le module visqueux (**Figure 63**).

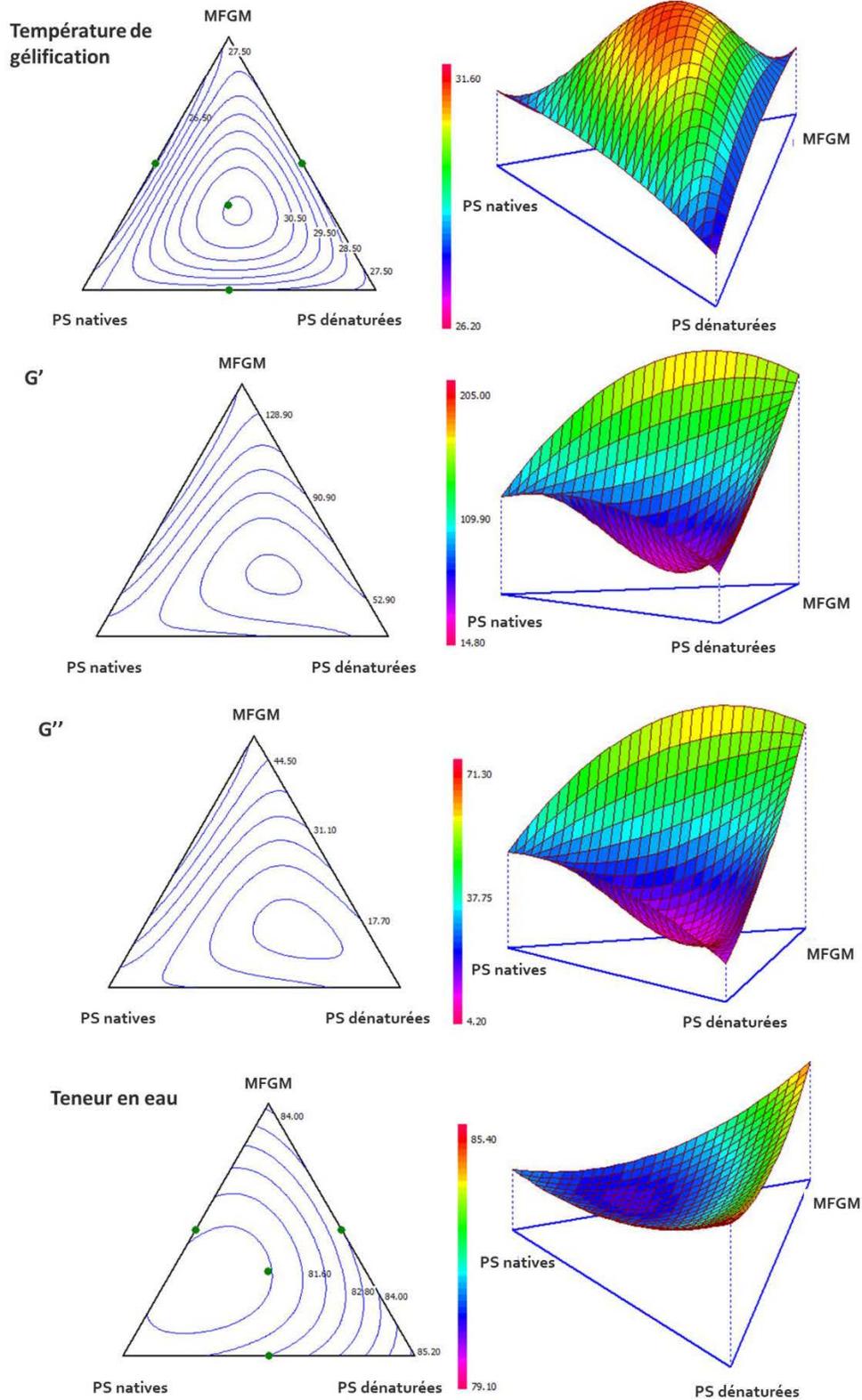


Figure 63 : Variation des différentes réponses (température de gélification, G' , G'' et teneur en eau) en fonction de la composition en protéines. La proportion de caséines est fixée à 80 %.

Résultats et discussion

Les comportements observés par l'étude des coefficients et des courbes d'isoréponses de la MFGM seule sont contradictoires. Cela s'explique par la présence de très fortes interactions entre les facteurs. En effet les valeurs des coefficients pour les interactions entre les différents constituants de la matrice sont très élevées (**Tableau 15**). Pour étudier l'influence de la composition des différents constituants des mélanges, les courbes d'isoréponses sont donc utilisées car elles prennent en compte l'ensemble des interactions entre les facteurs et donnent des valeurs de réponses sur l'ensemble du domaine de l'étude.

Les courbes d'isoréponses démontrent que l'addition de PS natives ou de MFGM diminue la température de gélification et augmente les valeurs des modules élastique et visqueux. A l'inverse, l'addition de PS dénaturées augmente la température de gélification et diminue les valeurs des modules élastiques et visqueux. La composition optimale du mélange pour atteindre une valeur de température de gélification minimale (26,5 °C), une valeur de G' maximale (135,0 Pa) et une valeur de G'' maximale (51,5 Pa), est donnée dans le **Tableau 16**.

Tableau 16 : Composition du mélange optimal pour atteindre les réponses choisies : température de gélification minimale, G' et G'' maximaux

Réponses choisies	Composition du mélange optimal pour atteindre les réponses choisies			
	Caséines	PS natives	PS dénaturées	MFGM
Température de gélification minimale	80 %	Entre 4,5 et 15,8 %	Entre 0,1 et 0,3 %	Entre 4,2 et 15,8 %
G' maximal		Entre 1 et 11 %	0 %	Entre 9 et 19 %
G'' maximal		Entre 0,9 et 10,7 %	0 %	Entre 9,3 et 19,1 %

Les résultats présentés dans le **Tableau 16** montrent que la présence de PS dénaturées n'est pas favorable pour atteindre les réponses choisies. Les résultats de différentes études sur l'effet des PS dénaturées sur les propriétés des gels produits lors de la coagulation enzymatique révèlent des effets similaires. L'augmentation de la concentration de PS dénaturées diminue les valeurs du module élastique G' et impacte négativement la fermeté du gel (Morin *et al.*, 2008; Perreault *et al.*, 2016). La dénaturation des PS n'affecte pas la réaction enzymatique de la coagulation mais influence l'agrégation des micelles de caséines (Vasbinder *et al.*, 2003). Cela peut se traduire par l'apparition d'un gel plus poreux (Morin *et al.*, 2008). Cet effet négatif des PS dénaturées sur l'agrégation des micelles de caséines peut être expliqué par la formation d'agrégats de PS (Reddy & Kinsella, 1990; Giroux *et al.*, 2015) qui, en interagissant avec les micelles de caséines, empêcherait ou réduirait le rapprochement des micelles de caséines entre elles. Lorsque la fermeté du gel diminue, la

microstructure du gel devient plus poreuse. Le réseau protéique n'est plus assez dense pour expulser l'eau du gel, qui est ainsi capable de retenir une plus importante quantité d'eau. Les courbes d'isoréponses concernant la teneur en eau du gel démontrent que l'ajout de PS dénaturées augmente la teneur en eau du gel (**Figure 63**).

Pour obtenir une température de gélification minimale et des valeurs de G' et G'' maximales, différentes formulations composées uniquement de PS natives et de MFGM peuvent être proposées car la MFGM, en présence de PS natives, impacte positivement les propriétés du gel. Le pourcentage de PS natives peut varier entre 4,5 et 10,7 % et le pourcentage de MFGM entre 9,3 et 15,8 % pour avoir les trois réponses souhaitées (**Tableau 16**). La MFGM est difficile à produire à l'échelle laboratoire. Elle nécessite beaucoup de temps et de main d'œuvre et le coût de production est donc élevé. Ainsi, il est préférable de limiter autant que possible la quantité de MFGM dans la formulation. Ainsi, une formulation composée de 80 % de caséines, de 10 % de PS natives et de 10 % de MFGM semble la plus favorable pour produire des gels fermes. Cette formulation a également l'avantage d'être celle pour laquelle les gels ont une teneur en eau minimale (**Figure 63**).

3. Conclusion

L'utilisation d'un plan de mélanges a permis d'étudier l'impact de différents constituants du lait sur les propriétés d'un gel formé par coagulation enzymatique suite à l'action de la chymosine. L'objectif était de trouver la formulation la plus favorable pour obtenir un gel rapidement (avec une température de gélification la moins importante possible), ferme et dense (avec des valeurs de G' et G'' les plus importantes possibles). La justification du choix de la matrice grâce au plan de mélanges et aux résultats antérieurs sont résumés dans la **Figure 64**. Il serait maintenant intéressant de voir si l'utilisation de cette matrice peut améliorer l'encapsulation de LGG.

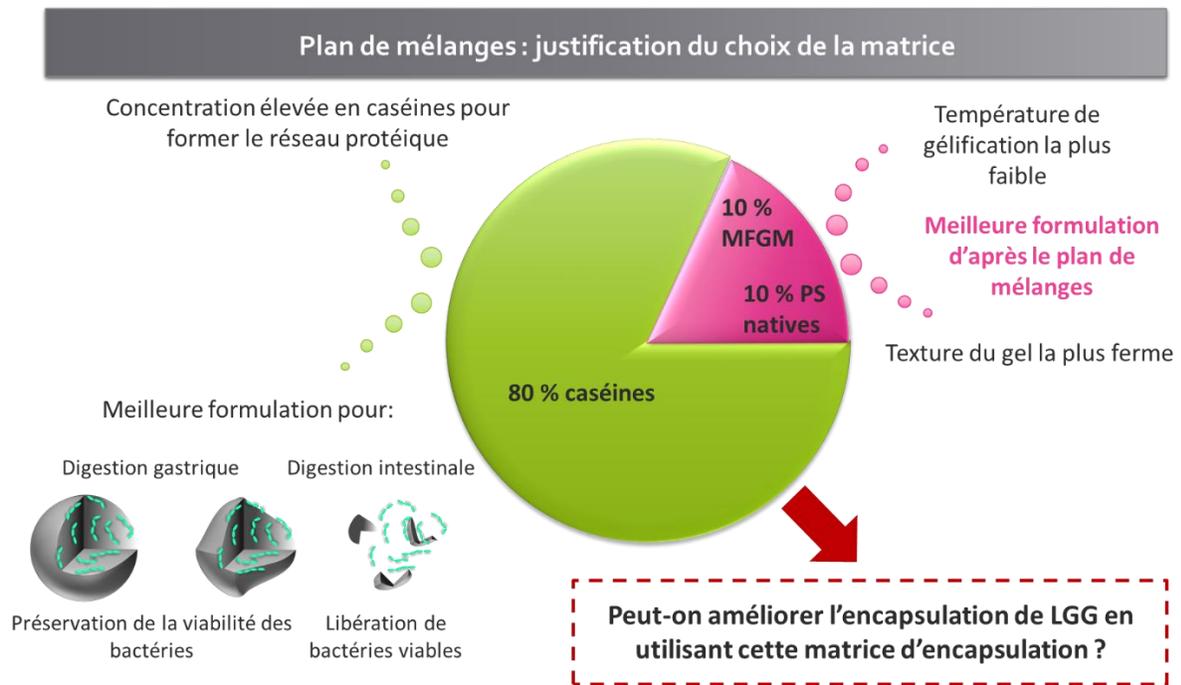


Figure 64 : Bilan sur le plan de mélanges

III. STABILISATION DE LGG PAR SECHAGE PAR ATOMISATION

La composition de la matrice d'encapsulation est très importante car elle permet de contrôler : la localisation des bactéries dans la matrice, la libération de la bactérie au niveau d'un site cible, comme par exemple l'intestin et les propriétés du gel formé lors de l'encapsulation. Le choix de la matrice d'encapsulation est donc crucial lors de l'encapsulation de bactéries.

Le choix du procédé d'encapsulation est également très important. Jusqu'à maintenant, un procédé d'encapsulation par émulsification en utilisant la gélification des protéines du lait a été utilisé pour encapsuler LGG. Ce procédé a été breveté et présente de nombreux avantages comme la production de microparticules sphériques et insolubles dans l'eau, l'obtention d'un taux d'encapsulation élevé et la très bonne résistance aux conditions gastriques. Cependant, ce procédé présente quelques inconvénients :

- les microparticules obtenues, fortement hydratées, ne se conservent pas bien et une étape de lyophilisation (industriellement coûteuse), est nécessaire pour permettre leur stabilité au cours du stockage.
- lors de la récupération des microparticules dans la phase huileuse, le drainage de l'huile peut entraîner une perte de bactéries qui se trouvent en surface des particules.
- enfin, la présence d'une fine couche d'huile résiduelle à la surface des microparticules persiste, même après lavage, ce qui est néfaste d'un point de vue sensoriel et nutritionnel (Burgain *et al.*, 2013a).

Il est donc nécessaire de trouver un procédé d'encapsulation qui puisse palier tous ces problèmes.

L'objectif de cette partie est d'adapter le procédé par émulsification qui utilise la gélification des protéines du lait à un procédé de séchage par atomisation (**Figure 65**). Le séchage par atomisation a été choisi car il doit permettre de produire des particules sèches en une seule étape et de garantir la bonne stabilité des particules au cours du stockage. De plus, ce procédé est facilement extrapolable à l'échelle industrielle. Les expériences ont été réalisées sur une tour de séchage à l'échelle pilote. L'objectif était de découpler la réaction de coagulation du lait comme pour le procédé d'émulsification.

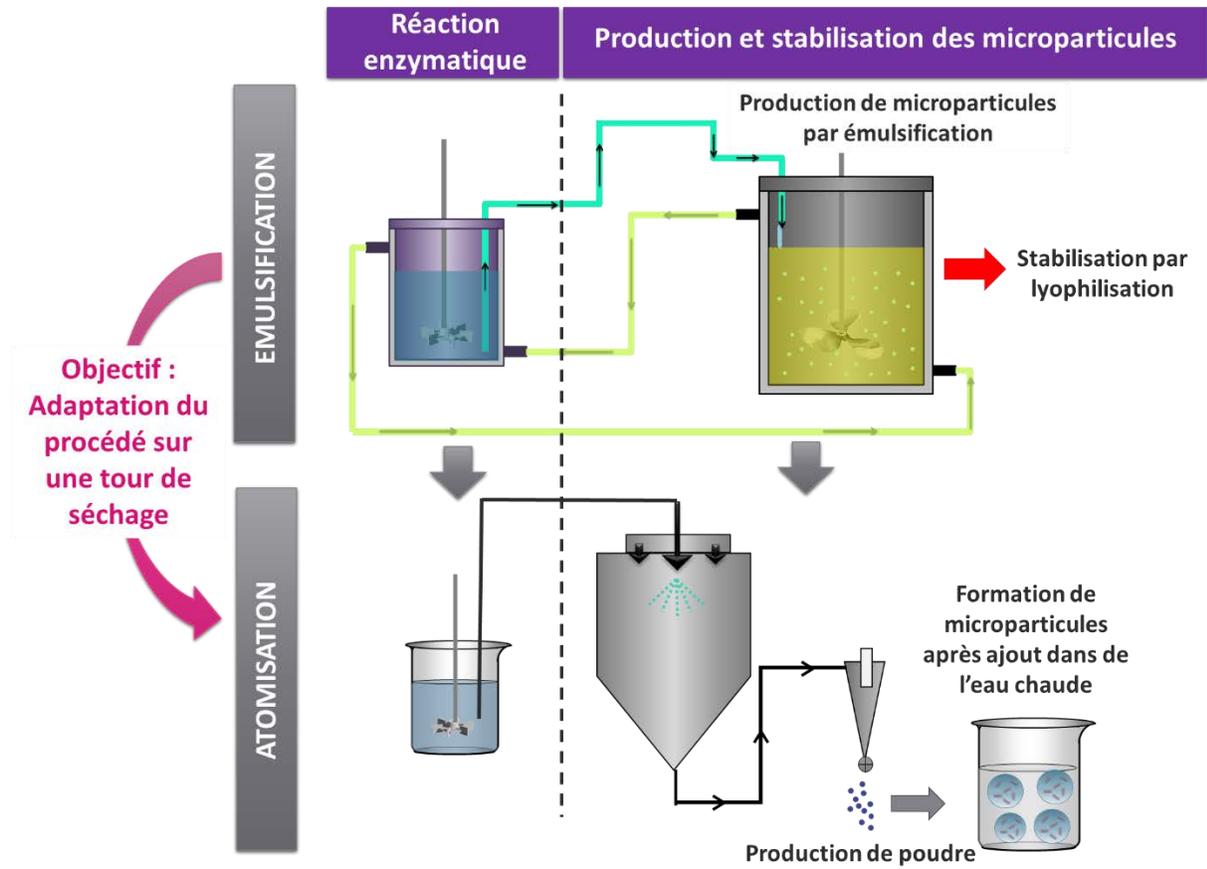


Figure 65 : Adaptation d'un procédé d'encapsulation par émulsification sur un procédé d'encapsulation par séchage par atomisation

1. Optimisation du procédé d'encapsulation par séchage par atomisation

1.1. Choix des conditions de séchage

L'objectif de ce travail est de décliner le procédé d'encapsulation par émulsification par un procédé d'encapsulation par séchage par atomisation (**Figure 65**). Cette étude va débiter par l'optimisation des conditions de séchage. Pour cela différentes températures d'air de sortie ont été étudiées. Le but était de trouver les meilleures conditions de séchage pour assurer une bonne survie des bactéries après séchage et produire des poudres à faible teneur en eau pour assurer leur conservation lors du stockage.

L'étude bibliographique a montré que la température de sortie pouvait affecter la viabilité des bactéries si elle n'était pas maîtrisée. C'est donc un paramètre important à contrôler. Différentes températures d'air de sortie ont donc été testées : 85, 70 et 55 °C. Ces températures ont été choisies en se référant aux températures souvent employées dans les études utilisant l'atomisation pour l'encapsulation des bactéries (**Tableau 5**).

1.2. Choix de la matrice d'encapsulation

Afin de se rapprocher au mieux des propriétés physico-chimiques des microparticules produites par émulsification, une matrice composée de 90 % de caséines et 10 % de PS dénaturées a été utilisée. Cette formulation avait été démontrée comme idéale pour encapsuler LGG par émulsification (Burgain *et al.*, 2013a), ainsi seul le procédé de production des microparticules est différent entre les deux études. D'un point de vue pratique, le concentré protéique a été incubé avec de la chymosine avant la pulvérisation de la même façon que la réaction enzymatique du procédé par émulsification. L'autre matrice utilisée contient la même proportion de protéines mais n'a pas été incubée avec de la chymosine avant la pulvérisation et a servi de témoin pour comprendre le rôle de la chymosine sur les propriétés des poudres. Il y a donc deux types de matrices et trois conditions de séchage, soit six conditions à tester (**Tableau 17**).

Résultats et discussion

Tableau 17 : Conditions de séchage et matrices testées lors de l'encapsulation de LGG par atomisation

Matrices utilisées	Températures théoriques d'air de sortie (°C)
Concentré 90 % caséines et 10 % PS dénaturées, non incubé avec la chymosine	85
	70
	55
Concentré 90 % caséines et 10 % PS dénaturées, incubé avec la chymosine (30 min à 8 °C)	85
	70
	55

1.3. Impact des conditions de séchage sur la survie de LGG

Les concentrations de bactéries vivantes avant et après séchage par atomisation dans les microparticules produites sont présentées dans le **Tableau 18**.

Tableau 18 : Concentration en bactéries avant et après séchage par atomisation

Matrice	Température théorique d'air de sortie (°C)	Concentration en bactéries avant séchage (\log_{10} CFU/g)	Concentration en bactéries après séchage (\log_{10} CFU/g)
Sans chymosine	85	$7,5 \pm 0,2$	$7,8 \pm 0,1$
	70	$7,9 \pm 0,2$	$8,3 \pm 0,2$
	55	$7,6 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,1$
Avec chymosine	85	$8,6 \pm 0,6$	$8,7 \pm 0,1$
	70	$9,0 \pm 0,8$	$8,9 \pm 0,3$
	55	$9,0 \pm 1,1$	$8,9 \pm 0,9$

Après séchage, les concentrations de bactéries dans les poudres sont comprises entre 7,8 et 8,9 \log_{10} UFC/g, soit $6,3 \times 10^7$ et $7,9 \times 10^8$ UFC/g (**Tableau 18**). Pour obtenir des effets bénéfiques sur la santé, il est recommandé que le produit ait une concentration en bactéries de 10^6 UFC/ml au moment de la consommation ou de consommer quotidiennement 10^8 - 10^9 bactéries (Tripathi & Giri, 2014). Compte tenu de ces valeurs de référence, la concentration trouvée dans les poudres produites est très satisfaisante.

De façon apparemment paradoxale, la concentration bactérienne dans la plupart des poudres fraîches (après séchage) est plus élevée que la concentration bactérienne dans le concentré (avant séchage). Lors de la pulvérisation du concentré, le passage à travers la buse bifluide et le mécanisme de nébulisation qui s'en suit (conduisant à la formation de gouttelettes) induisent des

contraintes de cisaillement élevées au concentré à pulvériser. Les résultats de dénombrements bactériens obtenus peuvent être expliqués par une fragmentation des chaînettes formées par LGG. Cet effet a déjà été décrit lors de l'encapsulation de LGG par extrusion, un autre procédé d'encapsulation qui provoque également de fortes contraintes de cisaillement (Doherty *et al.*, 2010). Pour tenir compte du cisaillement, une étude plus poussée a été réalisée tout d'abord sur l'organisation puis sur la viabilité des cellules (**Figure 66**).

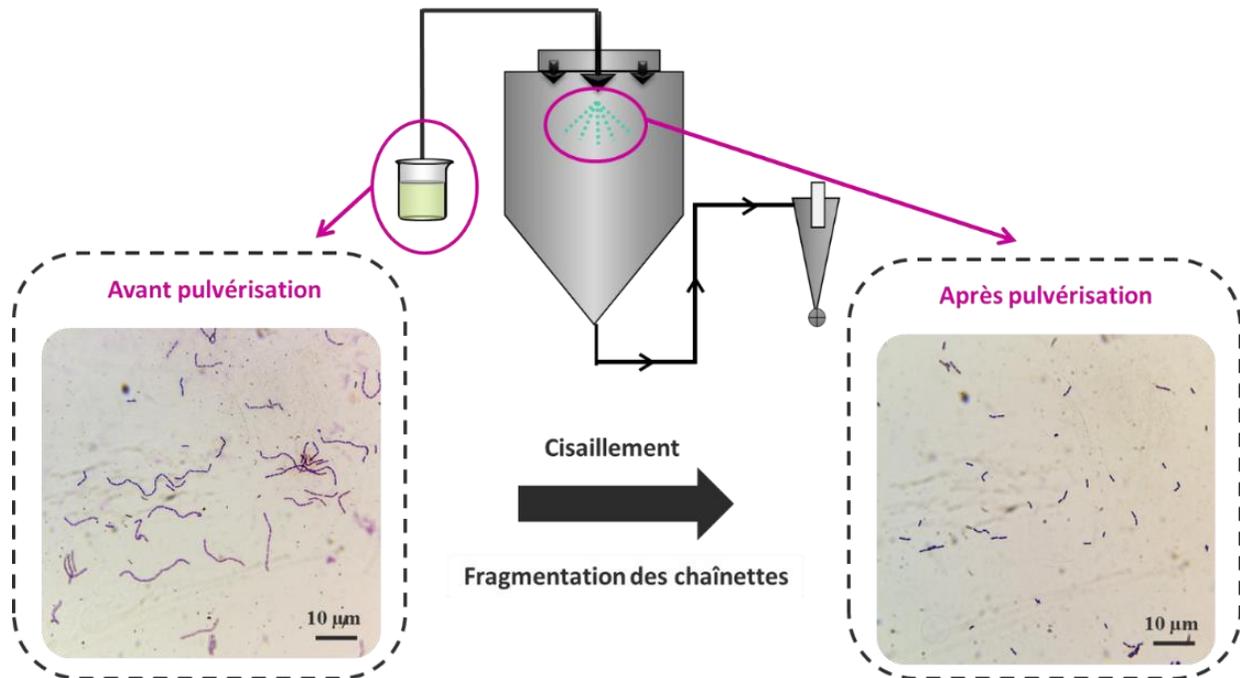


Figure 66 : Effet du cisaillement induit par la pulvérisation sur l'organisation cellulaire

Les images de microscopie optique sur les bactéries colorées par coloration de Gram révèlent des modifications dans l'organisation des cellules bactériennes. Avant la pulvérisation, LGG se présente sous forme de bâtonnets organisés en chaînettes. Cette organisation en chaînette est modifiée après la pulvérisation : des bactéries individualisées ou en courtes chaînettes sont retrouvées dans la solution pulvérisée. Sur une boîte de Petri, des bactéries organisées en une chaînette et une bactérie isolée conduisent toutes les deux à la formation d'une seule colonie. La contrainte de cisaillement provoquée lors de la pulvérisation est donc responsable de la rupture des chaînettes, ce qui provoque une augmentation du nombre de colonies et donc de la concentration de bactéries mesurée. Dans le concentré non incubé avec la chymosine, la concentration de LGG est respectivement de 6,8 et 7,4 \log_{10} UFC/g avant et après pulvérisation. Lorsque le concentré subit l'étape de réaction enzymatique avec la chymosine, la concentration de LGG est respectivement

Résultats et discussion

de 7,3 et 7,8 log₁₀UFC/g avant et après pulvérisation. La contrainte de cisaillement est donc responsable de l'apparition d'un facteur de cisaillement qui est de 3,3 et 2,7 fois plus de cellules comptées après pulvérisation par rapport aux cellules comptées avant la pulvérisation pour les concentrés non incubés ou incubés avec la chymosine respectivement. La formation de gouttelettes causée par l'effet de cisaillement lors de la pulvérisation dans des buses bi-fluides est essentiellement contrôlée par la pression de l'air et la viscosité du liquide (Petit et al., 2015). La température de l'air de sortie n'a donc pas d'influence sur le facteur d'augmentation mesuré. Nous avons donc considéré le même facteur d'augmentation pour toutes les conditions de séchage par pulvérisation et nous avons calculé une valeur corrigée de concentration bactérienne avant séchage et après pulvérisation (**Tableau 19**).

Tableau 19 : Concentration en bactéries avant et après séchage par atomisation avec la réduction logarithmique associée. Un facteur de cisaillement est utilisé pour corriger les valeurs avant séchage pour prendre en compte l'effet du cisaillement lors de la pulvérisation grâce au calcul suivant : concentration en bactéries (log₁₀CFU/g) = concentration avant séchage × log (facteur de cisaillement)

Matrice	Température d'air de sortie théorique (°C)	Facteur de cisaillement	Concentration en bactéries (log ₁₀ CFU/g)			Réduction logarithmique
			Avant séchage	Après pulvérisation	Après séchage	
Sans chymosine	85	3,3	7,5 ± 0,2	8,1 ± 0,2	7,8 ± 0,1	0,3
	70		7,9 ± 0,2	8,4 ± 0,2	8,3 ± 0,2	0,1
	55		7,6 ± 0,1	8,1 ± 0,1	7,8 ± 0,1	0,3
Avec chymosine	85	2,7	8,6 ± 0,6	9,0 ± 0,6	8,7 ± 0,1	0,3
	70		9,0 ± 0,8	9,4 ± 0,8	8,9 ± 0,3	0,5
	55		9,0 ± 1,1	9,4 ± 1,1	8,9 ± 0,9	0,5

Enfin, en utilisant ces valeurs corrigées, une réduction logarithmique du nombre de bactéries peut être calculée. Ces résultats fournissent des informations sur la capacité de LGG à survivre à des conditions de séchage par pulvérisation. Dans tous les cas, une diminution de moins de 0,5 log est observée et confirme l'excellente survie des bactéries lors de l'encapsulation par séchage par pulvérisation (**Tableau 19**).

1.4. Impact des conditions de séchage sur les propriétés physicochimiques des poudres

1.4.1. Teneur en eau

La teneur en eau des poudres a été déterminée pour chaque température de séchage et pour les formulations avec ou sans chymosine. En ce qui concerne les poudres obtenues à partir du concentré non incubé avec la chymosine, des teneurs en eau de 6,3, 7,9 et 11,6 % sont observées pour des températures d'air de sortie respectivement de 85, 70 et 55 °C (**Tableau 20**). Des valeurs similaires sont obtenues pour les formulations incubées avec de la chymosine : environ 5,8, 8,0 et 12,0 % pour des températures d'air de sortie de 85, 70 et 55 °C respectivement. Pour une capacité d'évaporation donnée, la diminution de la température de l'air de sortie lors du séchage par atomisation est liée à une augmentation de son humidité relative (**Tableau 9**). Il en résulte une augmentation significative de la teneur en eau de la poudre, car l'activité de l'eau tend à s'équilibrer avec l'humidité relative de l'air (Schuck *et al.*, 2012a). L'incubation du concentré avec la chymosine n'influence pas significativement les valeurs de teneur en eau comme le montre le **Tableau 20**.

La teneur en eau de la poudre influence fortement la stabilité du produit et peut également impacter la viabilité des bactéries pendant le stockage. La teneur en eau est donc un paramètre de qualité à prendre en compte pour les poudres contenant des cellules (Ying *et al.*, 2010). Une teneur en eau comprise entre 4 et 7 % est habituellement recommandée pour assurer le maintien de la qualité de la poudre pendant le stockage (Ananta *et al.*, 2005). Dans cette étude, cette condition n'a été atteinte que pour la température d'air de sortie la plus élevée (à savoir 85 °C).

Tableau 20 : Propriétés physicochimiques des poudres produites. Les résultats en colonne, associés à des lettres identiques ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$)

Matrice	Température d'air de sortie théorique (°C)	Teneur en eau (%)	$d(50)$ (μm)
Sans chymosine	85	$6,3 \pm 0,1^a$	$17,7 \pm 0,4^a$
	70	$7,9 \pm 0,2^b$	$13,8 \pm 0,4^{ab}$
	55	$11,6 \pm 0,1^c$	$10,6 \pm 0,9^{ab}$
Avec chymosine	85	$5,8 \pm 0,2^a$	$14,7 \pm 2,8^{ab}$
	70	$8,0 \pm 0,1^b$	$13,1 \pm 0,5^{ab}$
	55	$12,0 \pm 0,1^c$	$9,7 \pm 1,0^b$

1.4.2. Taille des particules

Le contrôle de la taille des particules est crucial lorsque des particules solides sont ajoutées aux aliments. En effet, il est recommandé de maintenir une taille de particule inférieure à 100 μm pour éviter des impacts négatifs sur les propriétés organoleptiques, en particulier dans la bouche (Hansen *et al.*, 2002). Le diamètre moyen de toutes les poudres produites dans cette étude est inférieur à 18 μm (**Tableau 20**). Les distributions granulométriques sont très proches. Une distribution de taille monomodale est observée pour la majorité des formulations (**Figure 67**). Seule la poudre produite à une température d'air de sortie de 55 °C, sans incubation préalable de chymosine, présente une distribution de taille bimodale (ligne verte clair pleine, **Figure 67**). La présence de particules entre 30 et 100 μm peut refléter l'agglomération induite par le séchage par atomisation. En effet, l'air recirculant dans la chambre de séchage peut transporter de la poudre sèche à proximité de la buse. Cette poudre peut avoir été mouillée par des gouttelettes pulvérisées, ce qui la rend alors collante et capable de former des agglomérats.

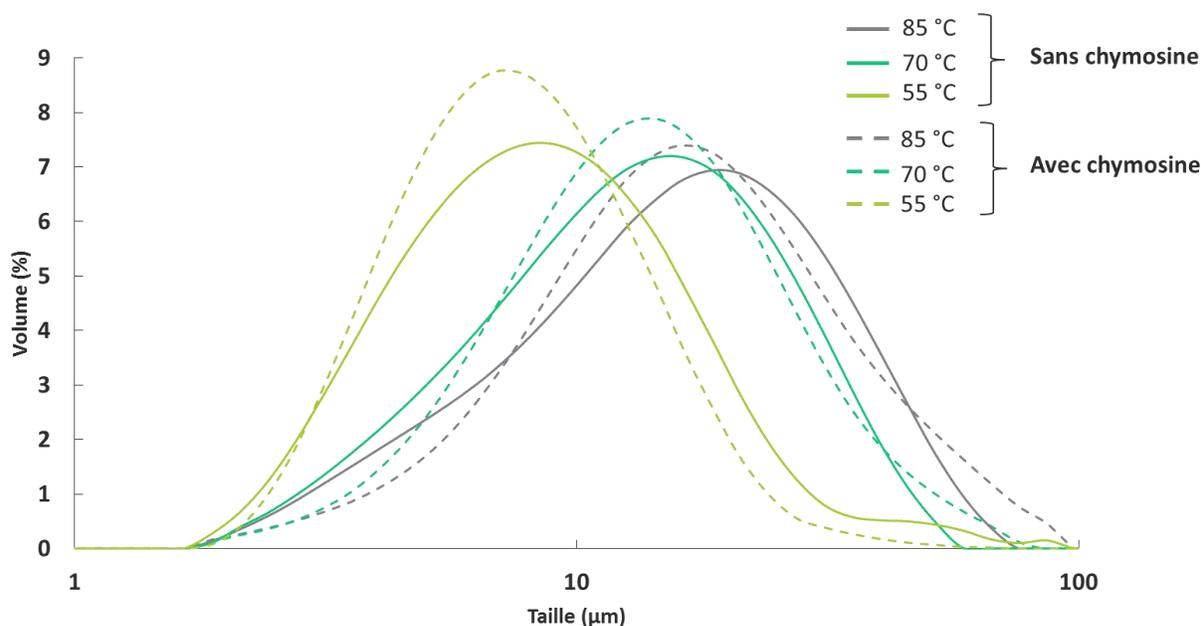


Figure 67 : Distribution granulométrique des poudres produites

1.4.3. Morphologie des poudres

Les images obtenues par MEB montrent que la forme des poudres produites n'est pas significativement modifiée avec le changement de la température de l'air de sortie ou avec une incubation avec la chymosine (**Figure 68**).

Toutes les particules sont lisses et non sphériques. Sadek *et al.* (2014) ont démontré que la morphologie des particules est contrôlée par la composition de la matrice laitière. Par exemple, il est connu que les PS forment des particules sphériques et lisses. Au contraire, la présence de caséines est responsable d'une structure plus rugueuse, creuse, non sphérique et dense (Gaiani *et al.*, 2007; Sadek *et al.*, 2014). Ici, la matrice est un mélange de caséines et de PS dénaturées à un ratio de 90:10 (p/p). Comme on pouvait s'y attendre, la morphologie des particules est caractéristique des poudres à teneur élevée en caséine (**Figure 68**). Aucune bactérie n'est observée à la surface des microparticules, même si plus d'une centaine de microparticules ont été examinées à des grossissements élevés. Le même constat avait déjà été fait dans d'autres études (Liu *et al.*, 2015; Khem *et al.*, 2016b). Il peut être suggéré que les bactéries se localisent toutes à l'intérieur des microparticules.

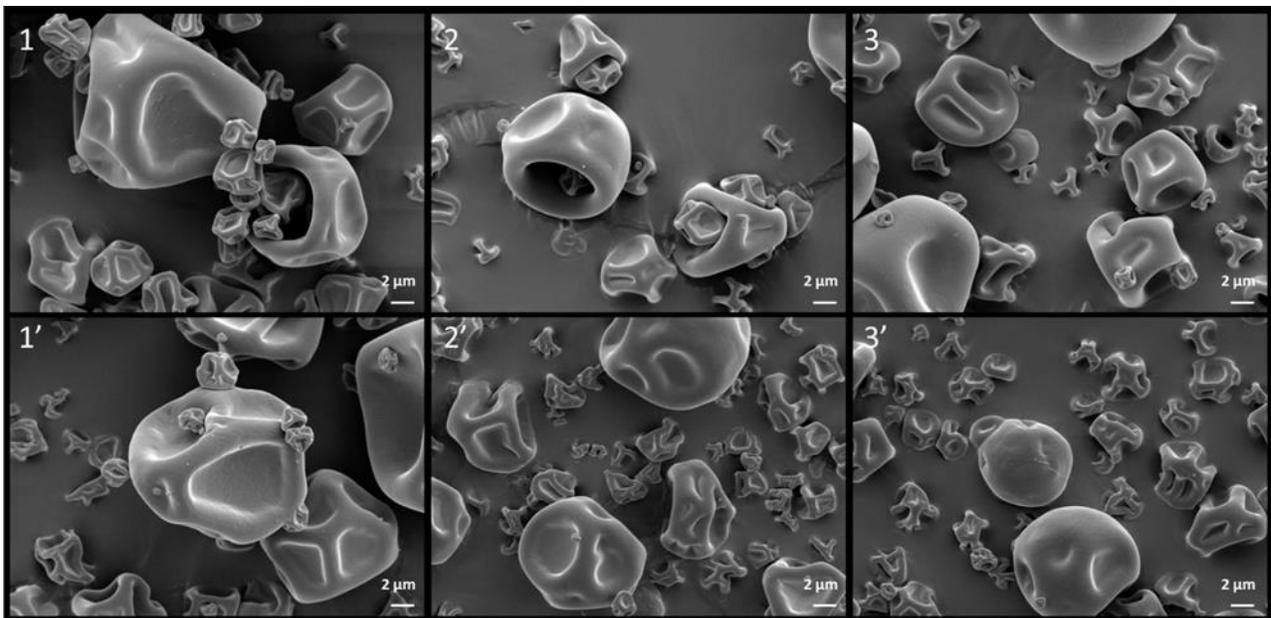


Figure 68 : Poudres obtenues après séchage par atomisation (grossissement $\times 3\ 000$) par MEB. LGG a été encapsulé dans une matrice laitière non incubée (1, 2 et 3) ou incubée (1', 2' et 3') avec de la chymosine.

Différentes températures d'air de sortie ont été utilisées : 85 (1 et 1'), 70 (2 et 2') et 55 °C (3 et 3')

1.5. Effet de la chymosine sur les propriétés de reconstitution des poudres

Les propriétés de réhydratation des poudres peuvent être évaluées grâce aux mesures suivantes : mouillabilité, dispersibilité et solubilité (Figure 69).

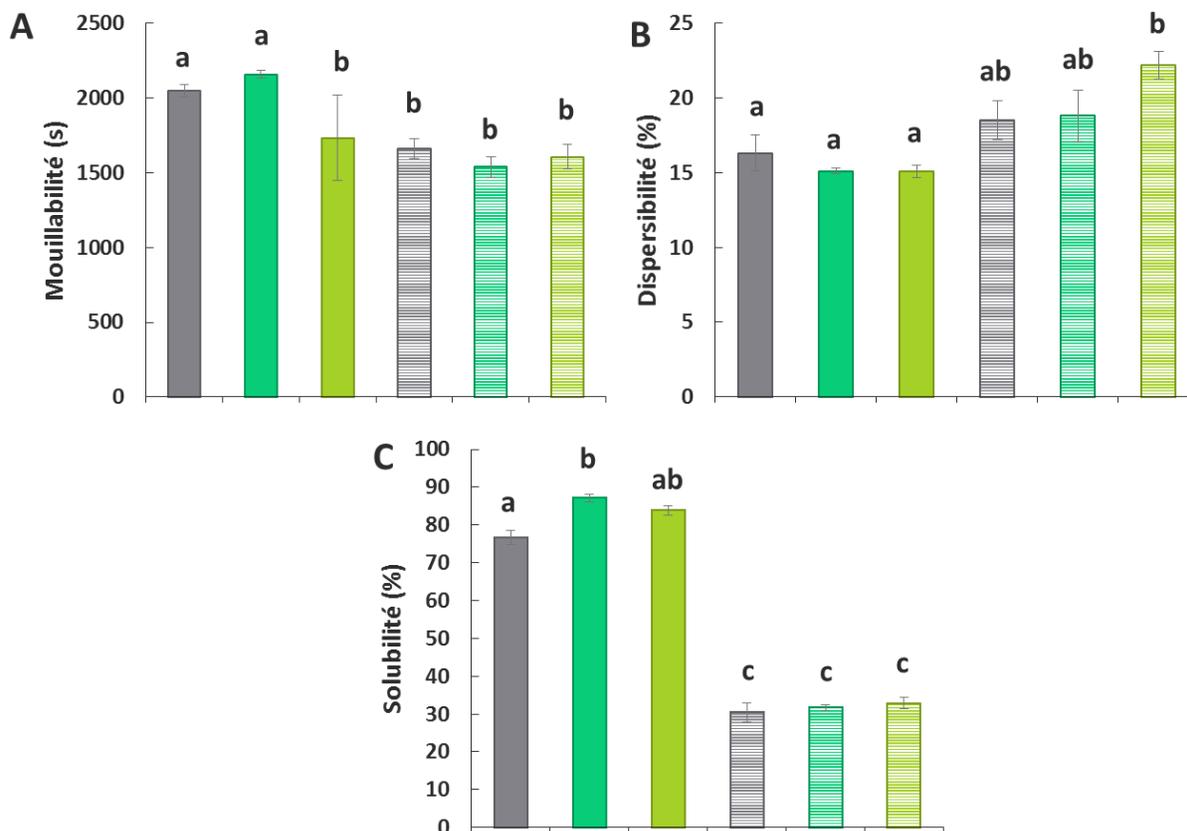


Figure 69 : Propriétés de réhydratation des poudres. Mouillabilité (A), dispersibilité (B) et solubilité (C) des poudres obtenues à partir d'un concentré non incubé (barres pleines) ou préalablement incubé (barres rayées) avec de la chymosine à une température de sortie de 85 (gris), 70 (vert foncé) ou 55 ° C (vert clair). La présence de lettres différentes au-dessus des barres signifie que les valeurs sont significativement différentes ($p < 0,05$)

Les valeurs de mouillabilité observées pour les différentes poudres produites sont présentées dans la **Figure 69A**. Pour les poudres obtenues à partir d'un concentré non incubé avec de la chymosine, aucune différence significative n'est observée lorsque celles-ci sont obtenues avec des températures d'air de sortie de 85 ou 70 °C. Par contre, la diminution de la température de séchage à 55 °C diminue significativement le temps de mouillage de ces poudres. Du fait de sa forte teneur en eau, la poudre produite à une température d'air de sortie de 55 °C sans incubation préalable avec

la chymosine présente une surface plus collante, ce qui favorise leur agglomération. Ainsi, leur agglomération provoque une augmentation de la taille des poudres probablement responsable des temps de mouillage plus rapides (Ji *et al.*, 2016). Pour les poudres provenant du concentré préalablement incubé avec de la chymosine et séchées à des températures d'air de sortie de 85 et 70 °C, leur mouillabilité est significativement améliorée. Cela peut être dû à la perte du caséinomacropéptide hydrophobe induit par l'action de la chymosine et entraînant une déstabilisation des micelles de caséine. Par contre, aucune différence significative n'est observée pour les poudres produites à 55 °C avec ou sans incubation avec la chymosine.

Il est connu que le temps de mouillage d'une poudre laitière dépend fortement de sa composition (Fitzpatrick *et al.*, 2016). Par exemple, pour une granulométrie similaire, les poudres de caséines présentent de meilleurs temps de mouillage que les poudres de PS (Gaiani *et al.*, 2011). Toutes les poudres étudiées ne sont pas mouillées en moins de 5 min. Le temps de mouillage élevé observé ici est sans doute la conséquence de la faible taille des particules ($d(50) < 18 \mu\text{m}$). En effet, il est attendu que les particules fines présentent de grandes difficultés pour vaincre la tension superficielle de l'eau.

La dispersibilité des poudres produites avec ou sans incubation avec la chymosine n'est pas affectée de manière significative par la température de l'air de séchage. Seules les poudres produites après incubation de chymosine à 55 °C présentent des différences significatives (**Figure 69B**). En effet, la teneur en eau élevée peut induire une agglomération des poudres. Ainsi, une augmentation de la taille des particules due à l'agglomération peut améliorer la dispersibilité des poudres (Sharma *et al.*, 2012). En général, les poudres composées principalement de PS du lactosérum présentent une bonne dispersibilité, supérieure à 80 %, alors que pour les poudres de caséine, la dispersibilité peut diminuer jusqu'à 10 % seulement (Sadek *et al.*, 2014). Dans notre cas, les résultats de dispersibilité sont caractéristiques de poudres contenant une teneur élevée en caséines (**Figure 69B**).

D'un point de vue général, des différences sont observées pour la mouillabilité et la dispersibilité de toutes les poudres. La solubilité des poudres n'est pas affectée par la température de séchage mais elle est impactée par la composition du mélange. La solubilité des poudres est systématiquement inférieure lorsque le concentré est incubé avec de la chymosine avant le séchage par atomisation (**Figure 69C**). Un travail récent a montré que les poudres de PS et de caséines micellaires présentent respectivement une solubilité de 100 et 55 % (Sadek *et al.*, 2014). Dans notre

Résultats et discussion

cas, les résultats de solubilité pour les poudres non incubées avec de la chymosine sont caractéristiques des poudres contenant un mélange de caséines et de PS avec une solubilité d'environ 80 % (**Figure 69C**). D'autre part, pour les poudres obtenues après l'étape d'incubation avec la chymosine, une solubilité significativement inférieure est mesurée, autour de 30 %, en raison de la production de microparticules insolubles dans l'eau. Cette faible solubilité est le résultat de l'action de la chymosine avant la pulvérisation. L'impact de l'incubation du concentré avec la chymosine avant la pulvérisation sur la solubilité des poudres produites sera détaillé dans les prochains paragraphes.

1.6. Choix de la formulation et des conditions de séchage pour l'encapsulation de LGG

Cette première partie de l'étude a permis d'identifier la meilleure formulation (incubation ou non du concentré avec la chymosine) et les meilleures conditions de séchage pour encapsuler LGG. Comme toutes les expériences permettent d'avoir un taux de survie élevé des bactéries, ce sont les propriétés physico-chimiques des poudres qui sont discriminantes. Dans notre étude, la teneur en eau permettant un stockage approprié et une bonne stabilité de la poudre n'est obtenue que pour la température d'air de sortie la plus élevée, c'est-à-dire une teneur en eau de 6 % pour les poudres produites à 85 °C. L'avantage principal de l'action de la chymosine avant séchage par atomisation réside dans la production de poudres présentant une faible solubilité lors de la reconstitution dans l'eau. La faible solubilité peut être intéressante dans l'industrie alimentaire pour la production de microparticules insolubles dans l'eau. Ces poudres peuvent véhiculer et protéger les bactéries probiotiques dans des aliments à forte teneur en eau en évitant la dispersion des bactéries dans le produit.

En conséquence, la meilleure combinaison pour la formulation et le procédé pour encapsuler LGG est d'utiliser une étape d'incubation avec de la chymosine avant la pulvérisation suivie d'un séchage par atomisation à une température d'air de sortie de 85 °C. La fin de l'étude sera axée sur cette poudre en particulier.

2. Caractérisation de la poudre optimale : protéines préalablement incubées avec de la chymosine et séchées par atomisation à 85 °C

La première partie de ce travail a permis d'optimiser les paramètres du procédé de séchage par atomisation en mettant en avant une température d'air de sortie (85 °C) optimale (incubation préalable avec la chymosine) pour l'encapsulation de bactéries et de montrer l'intérêt d'incuber le concentré avec la chymosine pour les propriétés physicochimiques des poudres. Pour terminer ce travail, une étude plus poussée du comportement de ces poudres a été menée lors de leur réhydratation dans de l'eau. L'objectif était de déterminer si ce procédé d'encapsulation permettait de conserver le caractère insoluble dans l'eau des microparticules comme cela avait été démontré dans le procédé d'encapsulation par émulsification.

Le MEB a été utilisé pour caractériser l'évolution de la structure des poudres lors de leur reconstitution dans de l'eau à 8 ou 40 °C. Ces températures ont été choisies pour obtenir des différences marquées de comportement lors de la reconstitution. En effet, la température de 8 °C ne doit pas permettre à la réaction non enzymatique de la coagulation d'agir et donc empêcherait la formation de microparticules, alors que la température de 40 °C permet la réaction et donc favorise la formation de microparticules suite à la création d'un réseau protéique par les micelles de caséines. Les poudres ajoutées dans de l'eau froide (8 °C) se réhydratent partiellement et permettent la libération des bactéries dans le milieu (**Figure 70A et B**). La visualisation des bactéries dans la poudre partiellement réhydratée confirme que les bactéries sont toutes localisées à l'intérieur des microparticules avant reconstitution dans l'eau. Au contraire, après 30 min de reconstitution dans de l'eau chaude (40 °C), les microparticules sont dispersées mais non réhydratées. En effet, les microparticules reconstituées à 40 °C sont totalement intactes sur les images MEB et permettent la rétention des bactéries dans la structure interne (**Figure 70D et E**). Certaines bactéries sont encore visibles dans les fissures à la surface des microparticules.

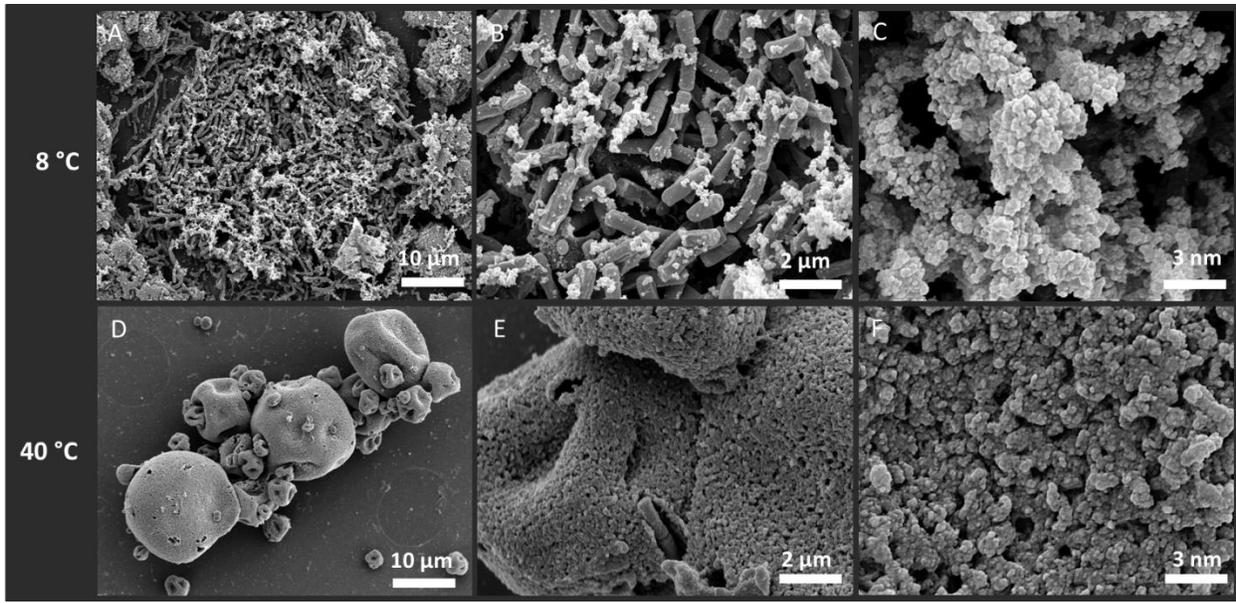


Figure 70 : Microparticules reconstituées dans de l'eau pendant 2 h et sous agitation à 8 °C (A, B et C) et à 40 °C (D, E et F) observées par MEB ; $\times 2\,000$ (A et D), $\times 10\,000$ (B et E), $\times 50\,000$ (C et F)

La reconstitution des poudres est sensible à la température. Cette différence de comportement résulte de l'action de la chymosine dans le concentré avant le procédé de séchage par atomisation. La chymosine est une enzyme utilisée lors de la coagulation du lait, qui implique l'hydrolyse enzymatique de la κ -caséine suivie de l'interaction non enzymatique entre les micelles de caséines déstabilisées conduisant à la formation d'un gel (Carlson *et al.*, 1987). Cette formation de gel est irréversible. Dans le procédé de production de microparticules développé ici, la réaction enzymatique a lieu avant le procédé de séchage par atomisation mais la formation du réseau de micelles de caséine est évitée en maintenant la température du concentré à 8 °C. La réaction non enzymatique ne se produit que lorsque la poudre est reconstituée au-dessus de 10 °C, ce qui explique la différence de comportement de reconstitution observée à 8 et 40 °C (**Figure 71**). En effet, à une température de 40 °C, les micelles de caséines interagissent ensemble en créant un réseau compact qui empêche leur réhydratation, conduisant à une suspension de microparticules piégeant des bactéries (**Figure 70F**). A 8 °C, les forces de répulsion entre les micelles de caséines les tiennent éloignées les unes des autres et la structure de la matrice est plus poreuse, permettant ainsi la réhydratation des microparticules (**Figure 70C**). Le découplage des étapes enzymatiques et non enzymatiques du mécanisme de coagulation du lait était déjà développé dans le procédé d'encapsulation par émulsification mais il ne permettait pas d'obtenir ce comportement original et dépendant de la température : solubilisation des poudres et libération des bactéries à froid ;

coagulation des caséines et formation des microparticules insolubles piégeant les bactéries à chaud. De plus, le procédé conduisait à la production de microparticules humides nécessitant une étape de séchage coûteuse pour leur conférer une bonne stabilité au cours du stockage (Burgain, Gaiani, Cailliez-Grimal, Jeandel, & Scher, 2013; Heidebach, Först, & Kulozik, 2009). Ici, les poudres peuvent être stables lors du stockage grâce à une seule opération unitaire (séchage par atomisation) dont le coût à l'échelle industrielle est plus faible que l'émulsification.

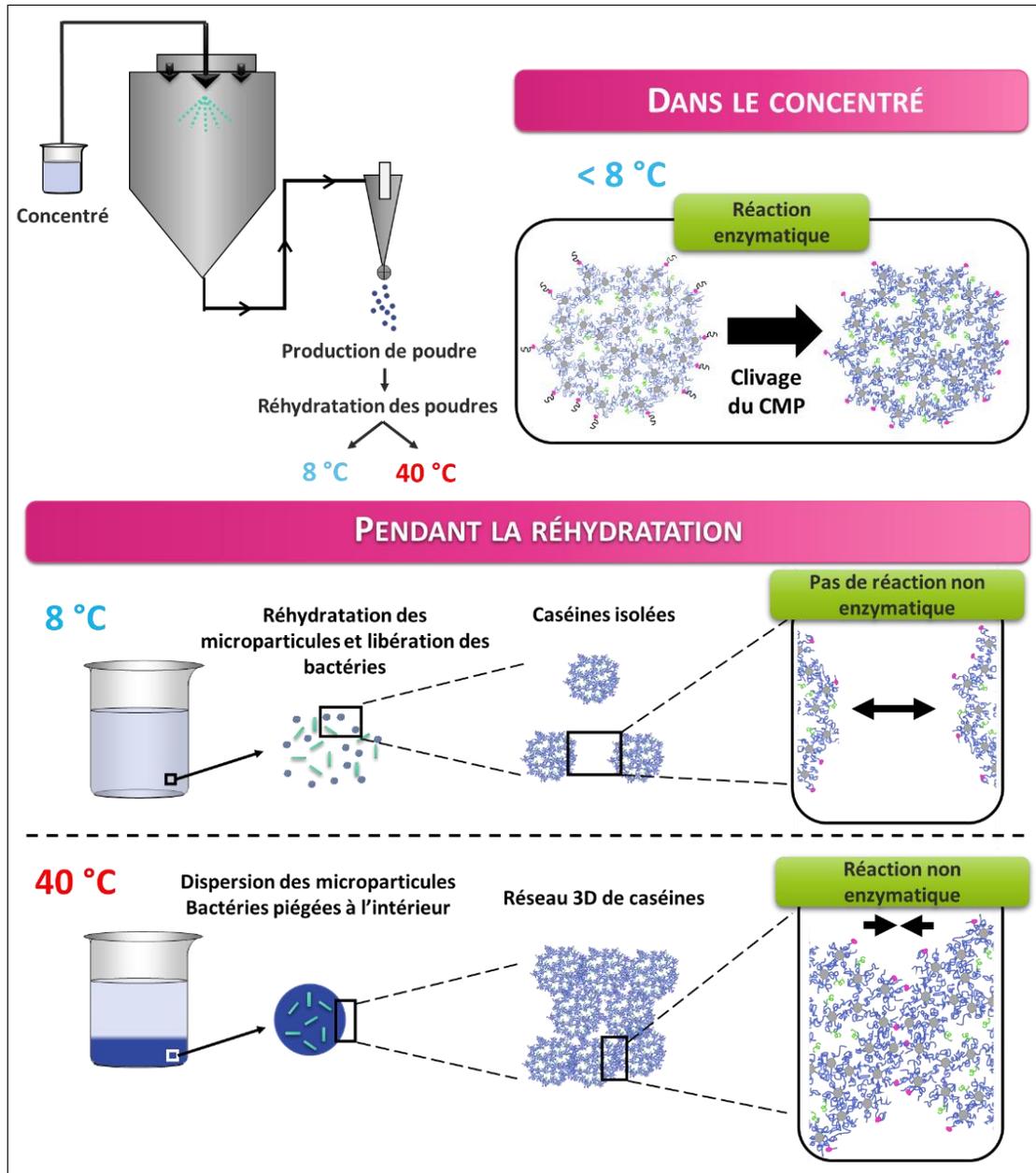


Figure 71 : Action de la chymosine sur les protéines lactières avant le séchage par atomisation et lors de la reconstitution des poudres obtenues dans de l'eau à 8 ou 40 °C. CMP : caséinomaclopeptide.

Résultats et discussion

L'action de la chymosine sur la reconstitution des poudres à 8 et 40 °C est confirmée en mesurant la solubilité de la poudre après 30 min de réhydratation à des températures différentes allant de 8 à 40 °C (**Tableau 21**).

Tableau 21 : Solubilité des poudres selon la température de reconstitution (°C)

Température de reconstitution (°C)	Solubilité (%)
8	35,7 ± 0,4
15	31,2 ± 0,4
20	26,8 ± 0,9
30	25,6 ± 0,1
40	14,6 ± 0,1

Lorsque l'incubation avec la chymosine n'a pas lieu avant le séchage par atomisation, la solubilité des poudres est très peu affectée par la température. Un comportement totalement différent est observé pour les microparticules produites après incubation avec la chymosine (**Figure 71**). A 8 °C, la solubilité de la poudre diminue à 36 %. L'augmentation de la température de reconstitution abaisse encore plus la solubilité de la poudre (**Tableau 21**). La faible solubilité de la poudre à 8 °C peut s'expliquer par la formation de matières insolubles au niveau des gouttelettes lors de la pulvérisation (c'est-à-dire après pulvérisation mais avant que les gouttelettes n'atteignent l'état solide). En effet, la réaction non enzymatique de la coagulation peut apparaître avant la formation de la poudre. Lors de la pulvérisation du concentré, la température des gouttelettes augmente progressivement au cours de l'atomisation et peut permettre le rapprochement des micelles de caséines et la formation d'un réseau très dense, insoluble. La matière insoluble peut être vue sur les images MEB obtenues pour des microparticules reconstituées à 8 °C (**Figure 70B**).

La stabilité des poudres reconstituées dans de l'eau à 8 et 40 °C a été suivie d'une analyse Turbiscan en vue de confirmer le comportement de reconstitution des poudres avec la température (**Figure 72**). A 8 °C, une légère augmentation de la fraction de lumière transmise en haut du tube est observée, correspondant à l'éclaircissement du milieu. Au fond du tube, la sédimentation de seulement quelques particules est détectable par une augmentation de la proportion de lumière rétrodiffusée (**Figure 72A**). A 40 °C, les mêmes phénomènes sont observés mais de manière bien plus marquée (**Figure 72B**). Ces mesures confirment la réhydratation des poudres à 8 °C et la production de microparticules insolubles et dispersées à 40 °C. La légère sédimentation observée

à 8 °C résulte vraisemblablement du peu de matières insolubles produites lors du séchage par atomisation.

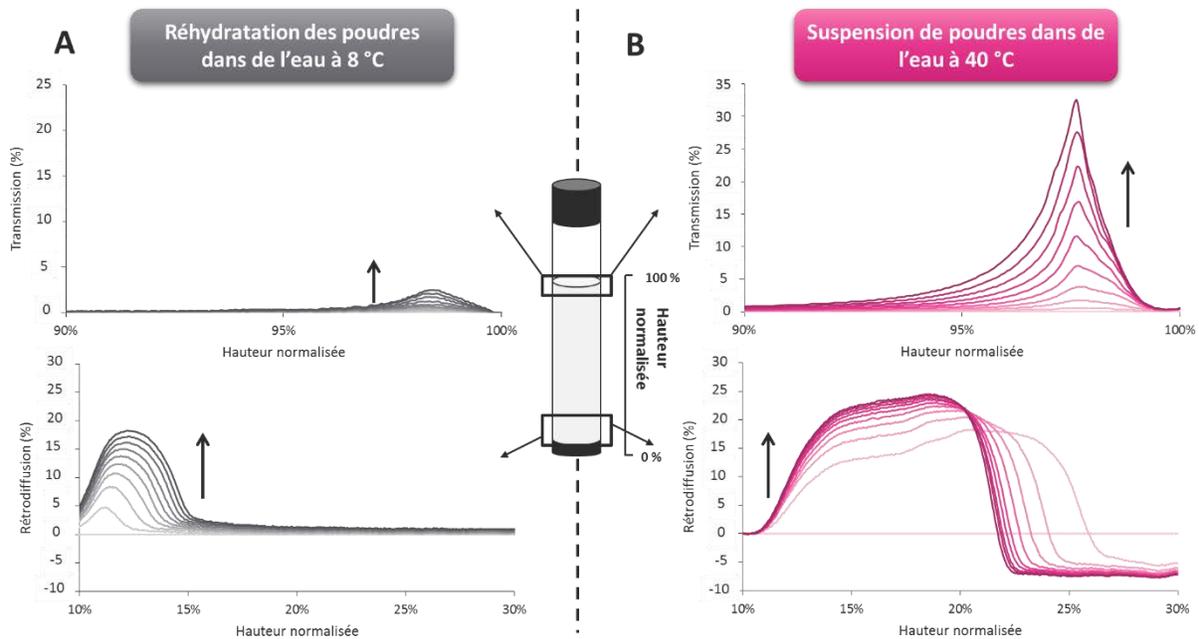


Figure 72 : Evolution de la lumière transmise et rétrodiffusée après la reconstitution de la poudre dans de l'eau à 8 °C (A) ou 40 °C (B). Les flèches indiquent la direction de l'évolution depuis le début jusqu'à la fin de la mesure (20 min). La rétrodiffusion et la transmission sont utilisées pour suivre la sédimentation des microparticules au fond du tube et la clarification du milieu en haut du tube respectivement

3. Conclusion

Le procédé d'encapsulation par émulsification décrit par Jennifer Burgain a été décliné avec succès sur un procédé de séchage par atomisation. Les conditions de séchage du procédé permettent d'obtenir un bon taux de survie des bactéries après l'étape de séchage. Ce procédé a permis de développer des poudres présentant de nouveaux comportements lors de la reconstitution. En effet, les poudres sont capables d'avoir des comportements de reconstitution différents en fonction de la température : une réhydratation aux faibles températures (8 °C) et une dispersion aux fortes températures (40 °C). Ces nouvelles fonctionnalités sont le résultat de l'action de la chymosine avant le séchage par pulvérisation, qui a été découplé de la formation de gel.

Résultats et discussion

Les poudres produites présentent différents avantages et différentes applications industrielles intéressantes (**Figure 73**). Par contre, le procédé d'encapsulation développé dans ce travail possède deux principaux inconvénients. Tout d'abord, le maintien du concentré à une température inférieure à 8 °C avant la pulvérisation est difficilement réalisable au niveau industriel. En effet, le volume de concentré utilisé en industrie est beaucoup plus important que celui utilisé à l'échelle pilote. Il paraît donc compliqué et coûteux de maintenir cette température. Le second inconvénient est d'empêcher la coagulation de la solution avant la nébulisation. Durant les différentes productions par atomisation, des problèmes de bouchage de buse ont été observés lors de la pulvérisation. En effet, lors du transfert du concentré vers la buse et lors de son arrivée au niveau de la buse, le concentré peut se réchauffer et entraîner la coagulation de la solution. Cela entraîne le bouchage de la buse. Les conditions de bouchage ne surviennent pas à toutes les productions mais dépendent des conditions environnementales de l'installation. En effet, les conditions de l'air environnemental ne sont pas maîtrisées sur notre installation et ne sont donc pas constantes d'une production à l'autre (variation de température et d'humidité de l'air ambiant, utilisé pour produire de l'air de séchage après chauffage par une résistance électrique). Pour pallier ces problèmes et utiliser ce procédé au niveau industriel, le concentré pourrait être stocké dans des cuves à doubles enveloppes réfrigérées. Des conduites réfrigérées pourraient également être installées pour faire circuler le concentré jusqu'à la buse située au-dessus de la tour. Ainsi, en prévoyant quelques investissements pour contrôler les conditions environnementales, ce procédé est donc envisageable au niveau industriel.

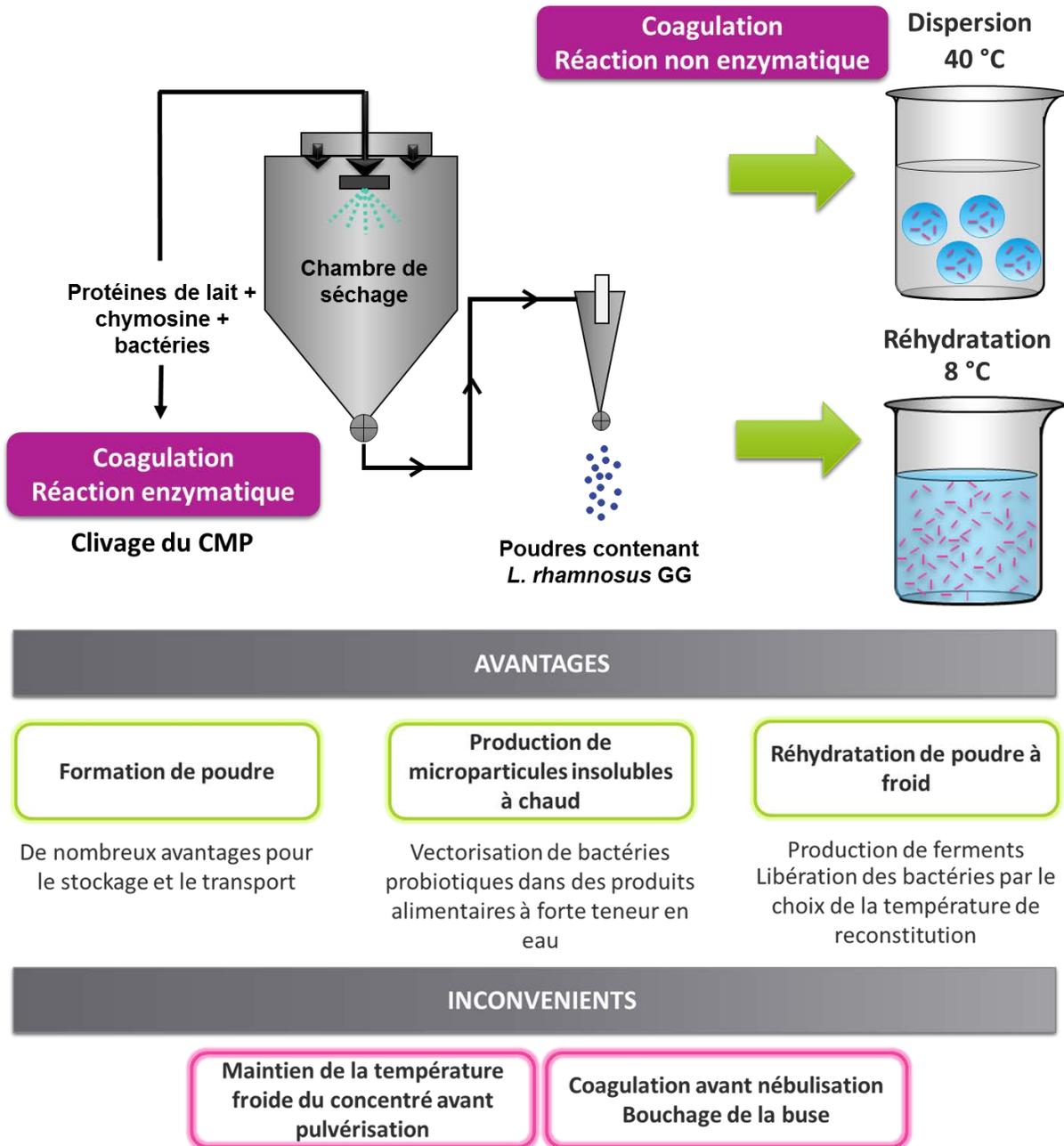


Figure 73 : Avantages et inconvénients du procédé de séchage par atomisation

IV. INTERACTION ENTRE LGG ET LES CELLULES INTESTINALES CACO-2

Ce travail de thèse a permis d'éclaircir différents points :

- (1) LGG est capable d'établir des interactions spécifiques avec certaines protéines laitières comme la β -LG et la MFGM par l'intermédiaire de son pilus SpaCBA.
- (2) Une matrice d'encapsulation (80 % caséines et 20 % PS) permet de protéger idéalement LGG lors de la digestion gastrique et de libérer de manière contrôlée LGG au niveau de l'intestin.
- (3) Un procédé d'encapsulation par séchage par atomisation permet d'encapsuler LGG dans une matrice laitière. Les poudres produites sont stables au cours du stockage et leur solubilité peut être modulée en fonction de la température du milieu de réhydratation.

Ces résultats montrent qu'il est possible de trouver un procédé et une matrice d'encapsulation qui permettent de protéger les bactéries au cours de la digestion gastrique et de les libérer vivantes au niveau de l'intestin. Cependant, même si les bactéries atteignent l'intestin dans un état viable, il n'est pas certain qu'elles soient fonctionnelles pour exercer leur effet probiotique. Par exemple, LGG possède des effets immunomodulateurs qui dépendent de son interaction avec les cellules épithéliales de l'intestin. L'adhésion de LGG aux cellules épithéliales de l'intestin est gouvernée par la présence de son pilus SpaCBA (Lebeer *et al.*, 2012a). Il semble donc nécessaire que LGG puisse interagir avec les cellules épithéliales de l'intestin pour exercer cette action immunomodulatrice en particulier. Or, il s'avère que les pili SpaCBA de LGG ont également la capacité d'interagir avec différentes protéines laitières de la matrice d'encapsulation. Même si la matrice se désintègre au niveau de l'intestin pour libérer les bactéries, certaines protéines laitières comme la β -LG et la MFGM peuvent partiellement résister à la digestion gastrique et éventuellement se fixer au niveau du pilus SpaCBA (Reddy *et al.*, 1988; Le *et al.*, 2012). Ainsi les protéines laitières pourraient interférer avec l'adhésion entre LGG et les cellules épithéliales de l'intestin et empêcher ainsi LGG d'exercer son action probiotique. L'objectif ici, est de confirmer le rôle du pilus SpaCBA dans l'interaction de LGG aux cellules épithéliales de l'intestin et

d'étudier l'impact de l'ajout de protéines laitières sur la capacité d'adhésion de LGG au niveau de son site d'action.

1. Rôle du pilus SpaCBA de LGG dans l'interaction avec les cellules Caco-2

Récemment, des études ont montré le rôle clé du pilus SpaCBA dans l'adhésion de LGG aux cellules épithéliales de l'intestin Caco-2 en se basant sur l'analyse comparative de mutants de surface de LGG (Lebeer *et al.*, 2012a). Pour valider notre modèle de culture cellulaire et confirmer le rôle du pilus spaCBA dans l'adhésion, ces analyses ont été répétées (**Figure 74**).

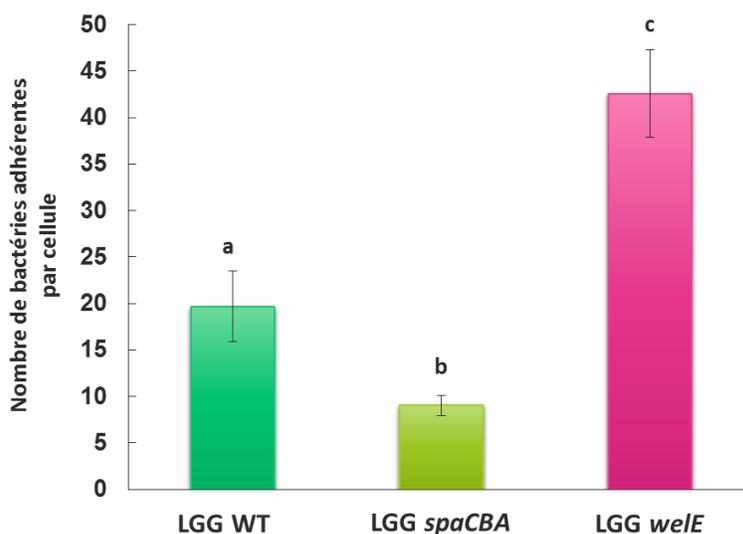


Figure 74 : Adhésion de LGG sauvage et ses mutants de surface aux cellules épithéliales de l'intestin Caco-2. La présence de lettres différentes au-dessus des barres de l'histogramme signifie que les différences observées sont significativement différentes ($p < 0,05$)

Les mutants de surface utilisés pour cette étude sont les mutants *spaCBA* et *welE*. Les tests d'adhésion montrent que l'adhésion de LGG est significativement diminuée pour le mutant *spaCBA* par rapport à la souche sauvage. En effet le nombre de bactéries adhérentes par cellule pour la souche *spaCBA* est de $9,1 \pm 1,1$, alors que pour la souche sauvage il est de $19,7 \pm 3,8$. A l'inverse, pour le mutant *welE*, l'adhésion de LGG est significativement améliorée par rapport à la souche sauvage. Le nombre de bactéries adhérentes par cellule pour la souche *welE* augmente à $42,6 \pm 4,7$. Les résultats observés ici sont en adéquation avec ceux retrouvés par Lebeer *et al.* (2012a). Lorsque le pilus SpaCBA est absent de la surface de LGG (mutant *spaCBA*), l'adhésion est diminuée. Lorsque le pilus SpaCBA est découvert et plus exposé (mutant *welE*), l'adhésion est

améliorée. Ces résultats confirment, *in vitro*, le rôle clé du pilus SpaCBA dans l'adhésion de LGG aux cellules épithéliales de l'intestin.

Précédemment, il a été montré que le pilus SpaCBA était impliqué dans l'adhésion de LGG avec les protéines laitières comme la β -LG ou encore la MFGM. Le pilus SpaCBA est donc impliqué à la fois dans l'adhésion de LGG avec la matrice laitière et dans l'adhésion avec les cellules épithéliales de l'intestin. La question qui se pose est la suivante : est-ce que l'adhésion de LGG à la matrice laitière peut interférer avec l'adhésion de LGG au niveau des cellules intestinales ? En effet, est-ce que les sites de fixation des pili aux cellules intestinales sont occupés par la matrice laitière une fois que LGG atteint l'intestin ? Pour répondre à cette question, l'impact de l'ajout de MFGM sur l'adhésion de LGG aux cellules épithéliales de l'intestin Caco-2 a été étudié.

2. Impact de l'ajout de MFGM sur l'adhésion de LGG aux cellules Caco-2

La MFGM a été choisie pour deux raisons. Tout d'abord, les protéines de la MFGM sont capables de résister à la digestion gastrique et donc d'atteindre l'intestin intactes (Le *et al.*, 2012). En effet, Le *et al.* (2012) ont montré que les protéines de la MFGM, et notamment les protéines glycosylées comme MUC1, CD36 et PAS6/7, résistent très bien à l'action des protéases gastriques. Ensuite, l'étude de l'adhésion révèle que LGG présente de fortes interactions adhésives avec la MFGM. La MFGM est donc une bonne candidate pour tester nos hypothèses. Ceci est un prérequis indispensable pour étudier l'impact de l'ajout de MFGM sur l'adhésion de LGG aux cellules intestinales, car la MFGM peut interférer dans l'adhésion de LGG aux cellules intestinales seulement si elle arrive intacte dans l'intestin.

Tout d'abord, un test de toxicité a été effectué pour vérifier que l'ajout de MFGM sur les cellules n'avait pas d'impact négatif sur la viabilité des cellules. Pour cela un test au MTT a été réalisé et a permis de voir l'impact de l'ajout de MFGM sur la viabilité cellulaire (**Figure 75**). L'ajout de MFGM, à une concentration de 0,5 ou 5 mg/ml et pendant 2 h de contact, n'altère pas la viabilité des cellules Caco-2. Au contraire, le métabolisme cellulaire est significativement amélioré avec

Résultats et discussions

l'ajout de MFGM. La MFGM peut donc être utilisée pour étudier l'impact de l'ajout de matrice laitière sur l'adhésion de LGG aux cellules Caco-2.

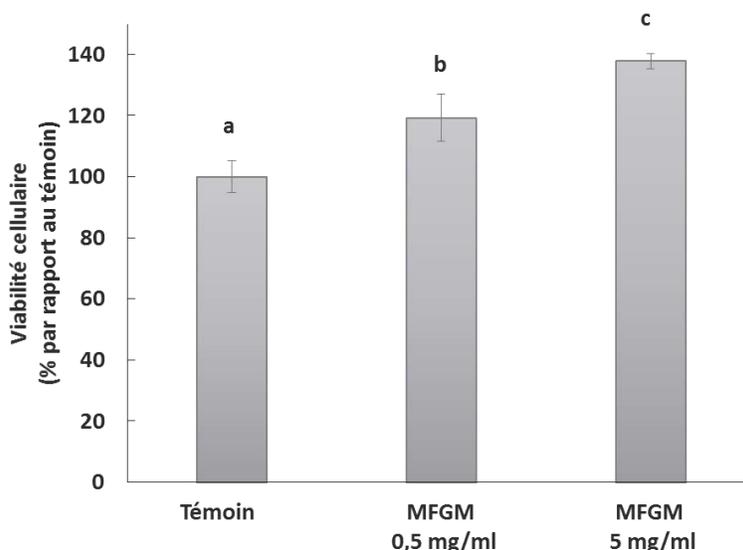


Figure 75 : Effet de la MFGM sur la viabilité des cellules Caco-2. La présence de lettres différentes au-dessus des barres de l'histogramme signifie que les différences observées sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Les résultats de l'impact de l'ajout de MFGM sur l'adhésion de LGG aux cellules intestinales sont présentés en **Figure 76**. Les bactéries ont été pré-incubées ou non avec la MFGM avant d'être mises au contact des cellules Caco-2. En absence de MFGM, les mêmes résultats que précédemment ont été obtenus, ce qui montre d'une part la bonne reproductibilité des expériences et d'autre part cela confirme encore une fois le rôle du pilus SpaCBA dans l'adhésion de LGG aux cellules Caco-2. La présence de MFGM modifie significativement le comportement adhésif de LGG vis-à-vis des cellules intestinales Caco-2 (**Figure 76**). Pour les souches WT et *welE*, la présence de MFGM diminue leur capacité d'adhésion aux cellules. Le nombre de bactéries adhérentes par cellule est respectivement de $19,4 \pm 2,9$ et $29,2 \pm 3,1$ pour les souches WT et *welE* en absence de MFGM. Ce nombre diminue respectivement à $8,5 \pm 0,2$ et $8,9 \pm 1,2$ pour les souches WT et *welE* en présence de MFGM. En revanche, pour la souche *spaCBA*, l'adhésion de LGG aux cellules Caco-2 est inchangée en présence de MFGM. Le nombre de bactéries adhérentes par cellule pour la souche *spaCBA* est respectivement de $8,4 \pm 0,5$ et $8,1 \pm 1,6$ en absence et en présence de MFGM.

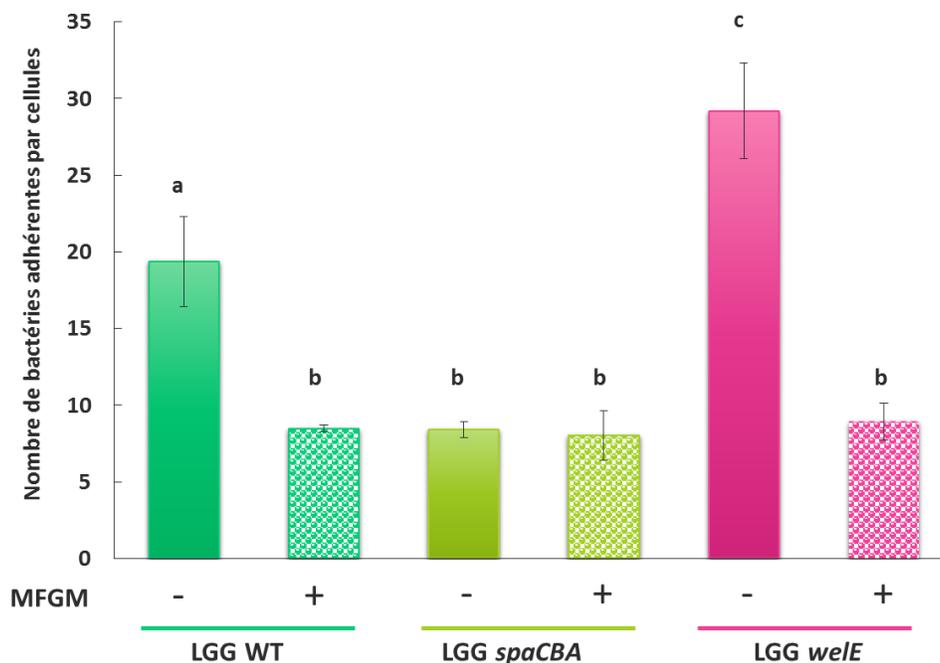


Figure 76 : Impact de l'ajout de MFGM sur l'adhésion de LGG sauvage et de ses mutants (*spaCBA* et *welE*) aux cellules épithéliales de l'intestin Caco-2. La présence de lettres différentes au-dessus des barres de l'histogramme signifie que les différences observées sont significativement différentes, ($p < 0,05$).

La présence de MFGM modifie uniquement l'adhésion des souches WT et *welE*. Ces deux souches expriment des pili SpaCBA au niveau de leur surface. Précédemment, il a été montré que la MFGM interagissait spécifiquement avec ces deux souches et notamment par l'intermédiaire du pilus SpaCBA. Nous avons également montré que les pili SpaCBA étaient impliqués dans l'adhésion de LGG aux cellules intestinales Caco-2 (**Figure 74**). En interagissant avec les pili des souches WT et *welE*, la MFGM semble bloquer tous les sites d'adhésion des pili aux cellules intestinales, ce qui expliquerait la diminution de l'adhésion. En revanche, il a été montré précédemment que la MFGM n'interagissait pas avec la souche sans pili *spaCBA*, c'est pourquoi la MFGM n'influence pas son adhésion aux cellules intestinales. Les valeurs d'adhésion de la souche WT et de la souche *welE* en présence de MFGM sont également informatives. La présence de MFGM diminue les valeurs d'adhésion au niveau basal de celui qui est exprimé pour les souches sans pili. Etant donné que les sites d'adhésion des pili aux cellules sont bloqués par la MFGM, d'autres molécules de surface permettraient l'adhésion des souches WT et *welE* aux cellules. Ces molécules sont probablement les mêmes que celles de la souche *spaCBA*.

Résultats et discussions

L'efficacité des probiotiques en présence d'une matrice alimentaire est très peu documentée (Sanders & Marco, 2010; Marco & Tachon, 2013). Il est bien établi que la matrice laitière assure le maintien de la viabilité des bactéries dans les conditions gastriques de l'estomac grâce à leur effet tampon (Heidebach *et al.*, 2009a; Würth *et al.*, 2015). Par contre, seules quelques études ont été réalisées sur l'impact de la matrice laitière sur la fonctionnalité des bactéries au niveau de leur site d'action qui est l'intestin. Lee *et al.* (2015) démontrent l'effet positif du lait sur la fonctionnalité de *L. casei* BL23. L'ajout de *L. casei* BL23 dans du lait atténue le développement de colite. Une autre étude révèle que l'adhésion de LGG aux cellules épithéliales de l'intestin Caco-2 est renforcée après son incubation dans du yaourt, en comparaison avec de la crème glacée, et les propriétés d'adhésion des bactéries sont corrélées au temps de stockage dans le produit (Deepika *et al.*, 2011). Ainsi, les résultats de ce travail de thèse améliorent les connaissances de l'impact de la matrice laitière sur l'efficacité des bactéries. La consommation de LGG en présence de MFGM diminue significativement son adhésion aux cellules Caco-2. L'adhésion de la MFGM au pilus SpaCBA de LGG est responsable de cette inhibition. En effet, lorsque LGG atteint l'intestin en présence de MFGM, les sites d'adhésion des pili aux cellules intestinales sont déjà occupés par la MFGM. Cela empêche donc l'adhésion de LGG par les pili aux niveaux des cellules intestinales. Cependant, l'adhésion de LGG aux cellules n'est pas réduite complètement car il semblerait, d'après les résultats d'adhésion (**Figure 76**), que d'autres molécules de surface de LGG permettent son adhésion aux cellules intestinales. Le maintien d'une faible adhésion pourrait permettre à LGG de conserver son pouvoir probiotique.

3. Conclusion

La capacité des constituants du lait et plus particulièrement de la MFGM à inhiber l'attachement de LGG aux cellules épithéliales de l'intestin a été démontré. En utilisant deux techniques complémentaires (biophysique et cellulaire), un mécanisme est proposé pour expliquer l'impact de la présence de constituants du lait sur l'adhésion de LGG aux cellules de l'intestin (**Figure 77**). Des molécules de surface comme les pili sont impliqués dans des phénomènes d'adhésion à la fois avec les constituants du lait (comme la β -LG et la MFGM) et les cellules épithéliales de l'intestin. Lorsque la bactérie atteint l'intestin en présence d'une matrice laitière (sous une forme native

comme c'est le cas pour les glycoprotéines de la MFGM), les sites d'adhésion des pili aux cellules intestinales sont déjà occupés par la matrice laitière. Ainsi, l'adhésion des bactéries au niveau de l'intestin peut être inhibée ou limitée. Comme beaucoup de bactéries sont incorporées dans des produits laitiers, des recherches plus approfondies sont nécessaires pour vérifier que la fonctionnalité des bactéries n'est pas affectée par la présence de constituants laitiers. Par contre, la compréhension des mécanismes d'adhésion peut être importante pour formuler de nouveaux produits nutraceutiques pour inhiber, dans ce cas, l'adhésion des bactéries pathogènes aux cellules intestinales.

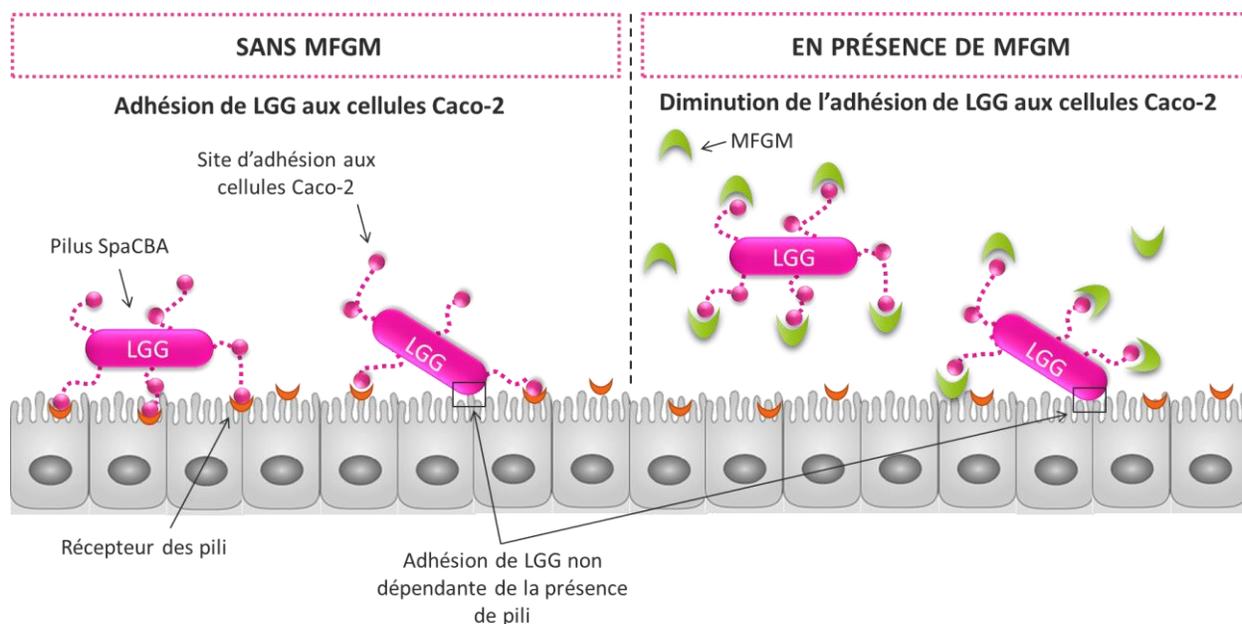


Figure 77 : Compétition entre l'adhésion de LGG à la MFGM et l'adhésion de LGG aux cellules épithéliales de l'intestin Caco-2

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. Conclusions

L'objectif général de ce travail était d'étudier l'influence de l'ajout d'ingrédients fonctionnels laitiers sur l'encapsulation de LGG. Ce travail de thèse a permis de répondre aux 4 objectifs définis au début du manuscrit :

- (1) Identifier les ingrédients laitiers capables d'adhérer avec LGG et les acteurs moléculaires mis en jeu.**
- (2) Comprendre l'impact de la formulation de la matrice sur la protection de LGG au niveau gastrique et sa libération au niveau de l'intestin.**
- (3) Rendre le procédé d'encapsulation industrialisable par atomisation et développer des poudres avec de nouvelles fonctionnalités.**
- (4) Vérifier l'impact de la présence d'ingrédients fonctionnels laitiers sur l'adhésion de LGG aux cellules intestinales Caco-2.**

La **Figure 78** sur la prochaine double page permet de résumer et de mettre en relation les connaissances acquises lors de ce travail de thèse.

PROCÉDÉ UTILISÉ POUR ENCAPSULER LGG (Chapitre 3, partie 3)

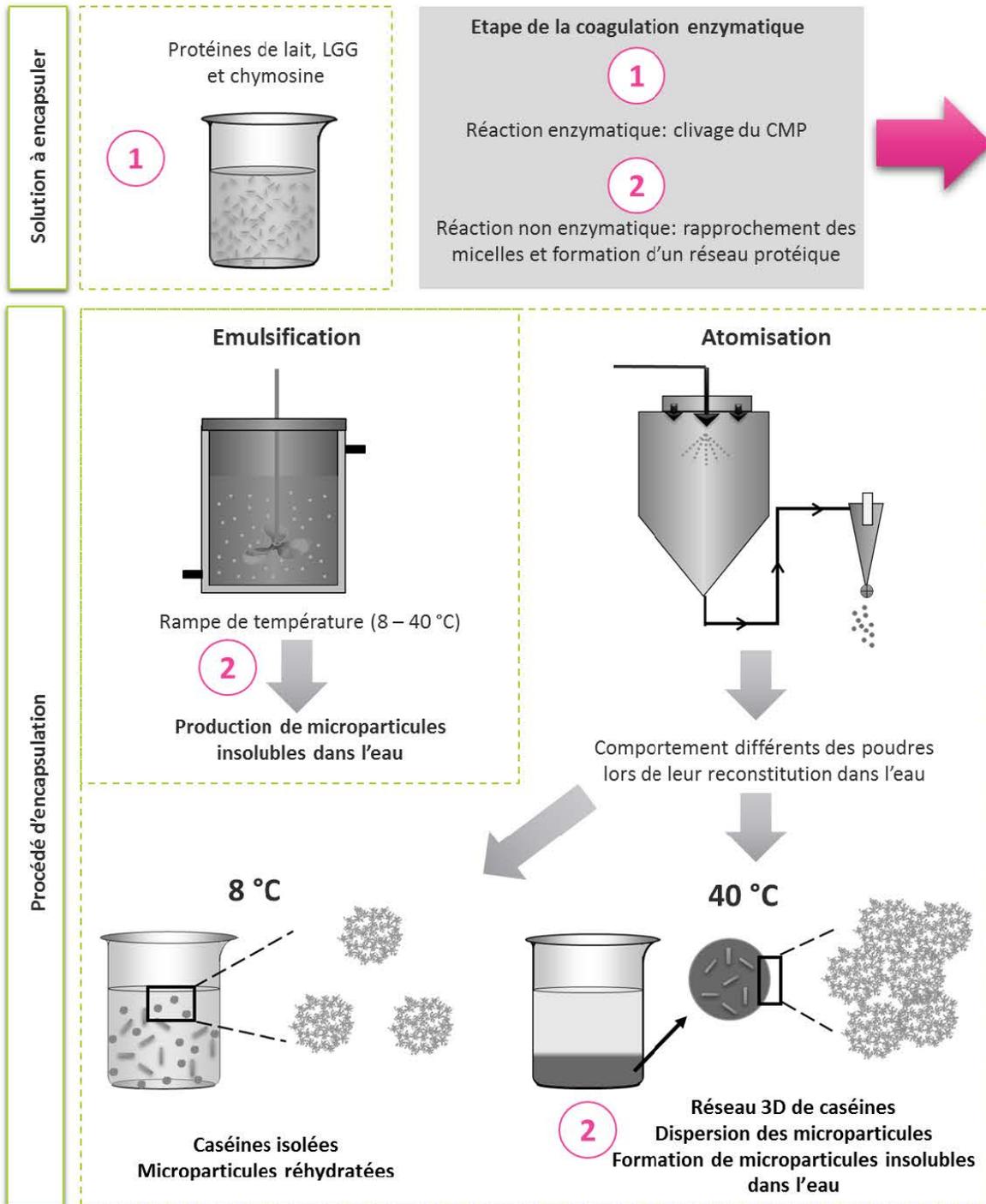
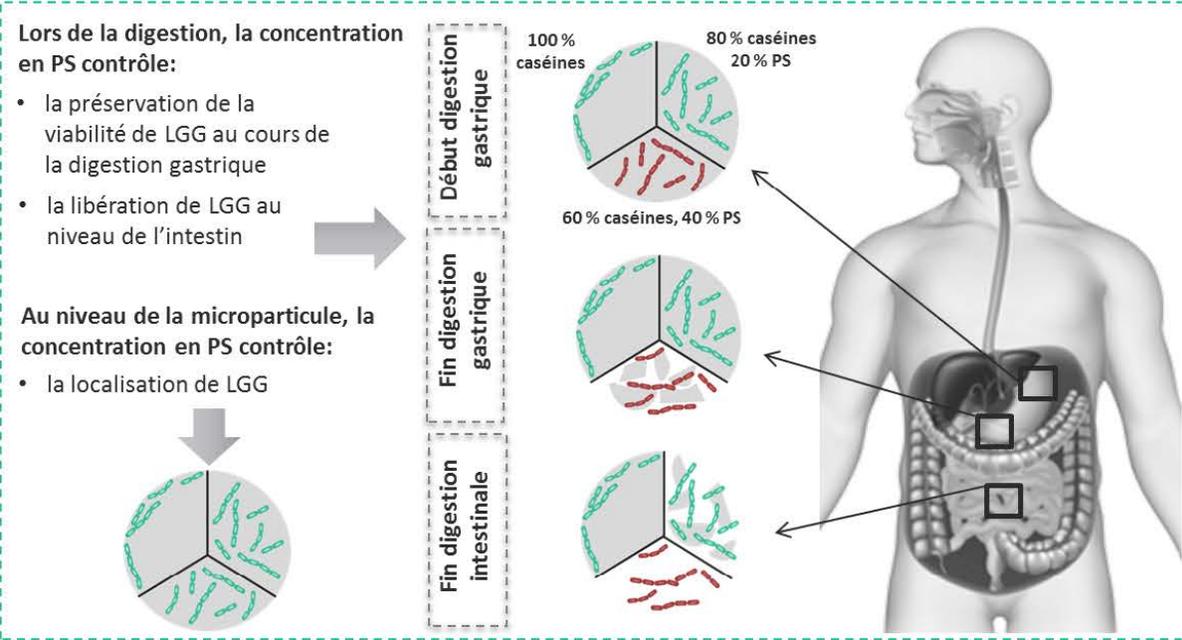


Figure 78 : Résumé des connaissances acquises lors de ce travail de thèse

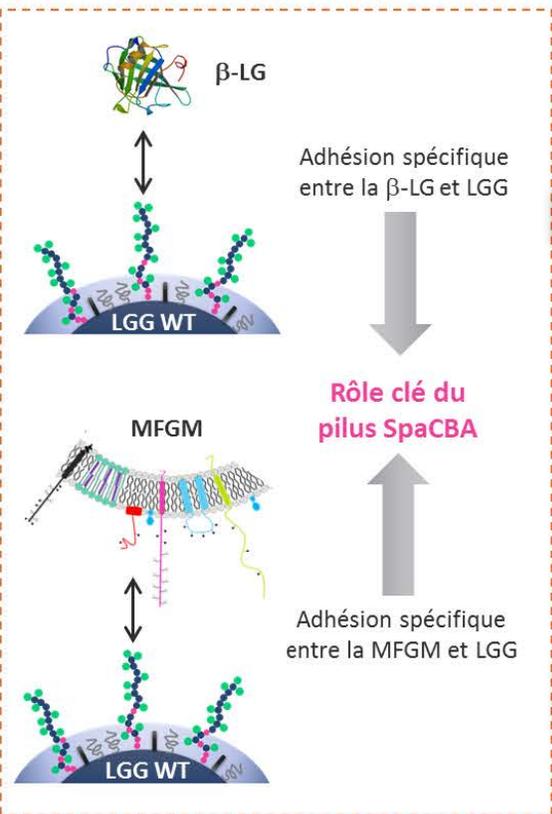
IMPACT DE L'AJOUT DE PS DANS LA MATRICE D'ENCAPSULATION (Chapitre 3, partie 2)



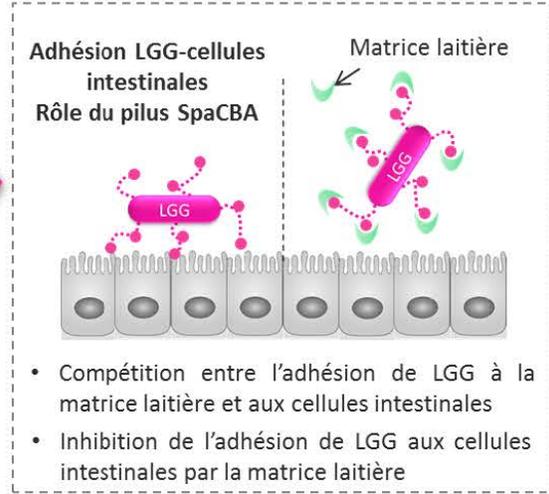
(Chapitre 3, partie 1)

(Chapitre 3, partie 4)

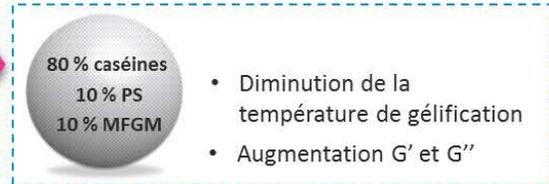
ADHESION DE LGG À LA MATRICE LAITIÈRE



IMPACT DE LA MATRICE LAITIÈRE SUR L'ADHÉSION DE LGG AUX CELLULES INTESTINALES



IMPACT DE L'AJOUT DE MFGM DANS LA MATRICE (Chapitre 3, partie 2)



1.1. Encapsulation de LGG

Un procédé par émulsification mis au point lors d'un précédent travail de thèse (Jennifer BURGAIN) a été utilisé pour produire des microparticules contenant LGG. Les microparticules issues de ce procédé ont été utilisées pour comprendre l'impact de l'ajout de différents ingrédients fonctionnels laitiers sur les propriétés structurales des microparticules, sur la protection de LGG au niveau gastrique et sur la libération de LGG au niveau de l'intestin.

Le procédé d'encapsulation par émulsification a été décliné en un procédé de séchage par atomisation dans le but de rendre ce procédé industrialisable. Les conditions de séchage permettent d'obtenir un bon taux de survie des bactéries après l'étape de séchage et la production d'une poudre avec une teneur en eau assez faible pour garantir sa stabilité au cours du stockage. Ce procédé a permis de développer des poudres présentant de nouveaux comportements lors de la reconstitution. En fonction de la température de l'eau, les poudres sont capables de se réhydrater (dans de l'eau à 8 °C) ou de se disperser (dans de l'eau à 40 °C). Ces nouvelles fonctionnalités sont le résultat de l'action de la chymosine avant le séchage par pulvérisation, qui a été découplé de la formation de gel. La dispersion de la poudre à 40 °C a l'avantage de produire des microparticules contenant LGG, stables en milieu aqueux.

1.2. Impact de l'ajout de PS dans la matrice d'encapsulation

L'impact de l'ajout de PS dans la matrice d'encapsulation sur la protection et la libération de LGG au cours de la digestion gastro-intestinale a été étudié dans ce travail de thèse. La concentration en PS impacte l'intégrité de la matrice pendant la digestion et la survie des bactéries jusqu'à ce qu'elles atteignent l'intestin. En travaillant sur le ratio caséines/PS, il est possible de trouver une matrice capable de préserver la viabilité des bactéries lors de la digestion gastrique et intestinale et de libérer les bactéries vivantes au niveau de l'intestin. Il se trouve que la matrice favorable pour atteindre ces objectifs est composée de 80 % de caséines et de 20 % de protéines solubles.

Les PS impactent également la localisation des bactéries dans les microparticules en favorisant leur localisation à l'intérieur. Cette localisation préférentielle peut s'expliquer grâce à l'étude de l'adhésion entre LGG et les différents constituants du lait. LGG est capable d'adhérer

spécifiquement avec la β -LG et non avec les caséines, l' α -LA et la BSA. Les courbes de retrait enregistrées lors des mesures effectuées par AFM (pointe fonctionnalisée avec de la β -LG et mica fonctionnalisé avec LGG) présentent des signatures spécifiques de l'étirement de pili. L'utilisation de mutants de surface de LGG corrobore le rôle clé du pilus SpaCBA dans l'interaction de LGG WT avec la β -LG. L'adhésion entre LGG et la β -LG peut expliquer la localisation des bactéries à l'intérieur de la matrice en présence de PS.

1.3. Impact de l'ajout de MFGM dans la matrice d'encapsulation

L'étude de l'adhésion entre LGG et les différents constituants du lait démontre l'adhésion spécifique de LGG et de la MFGM. Le rôle du pilus SpaCBA est également mis en évidence.

L'ajout de MFGM impactent les propriétés du gel formé par coagulation enzymatique suite à l'action de la chymosine. L'objectif de ce travail de thèse était de trouver la formulation la plus favorable pour obtenir un gel rapidement (avec une température de gélification la moins importante possible), ferme et dense (avec des valeurs de G' et G'' les plus importantes possibles). L'utilisation d'un plan de mélange a permis de démontrer que la matrice la plus favorable pour former un gel ferme et dense et le plus rapidement possible était composée de 80 % de caséines, 10 % de PS et 10 % de MFGM. La MFGM est connue pour avoir de nombreux effets bénéfiques sur la santé et il a été démontré précédemment qu'elle est capable d'adhérer à LGG. De plus l'ajout de MFGM dans la matrice semble améliorer les propriétés du gel formé. La MFGM semble donc être un ingrédient prometteur pour l'encapsulation de LGG.

1.4. Impact de l'ajout d'ingrédients fonctionnels laitiers sur l'adhésion de LGG aux cellules intestinales

Le rôle du pilus SpaCBA dans l'adhésion de LGG aux cellules épithéliales a tout d'abord été confirmé dans ce travail. Ensuite, il a été démontré que la présence de MFGM impactait l'adhésion de LGG aux cellules intestinales. En présence de MFGM, la capacité d'adhésion de LGG aux cellules intestinales diminue drastiquement. En utilisant deux techniques complémentaires

Conclusions et perspectives

(biophysique et cellulaire) et plusieurs mutants de surface de LGG, un mécanisme a été proposé pour expliquer l'impact de la présence de MFGM sur l'adhésion de LGG aux cellules de l'intestin. Des molécules de surface comme les pili sont impliquées dans des phénomènes d'adhésion à la fois avec les constituants du lait (comme la β -LG et la MFGM) et les cellules épithéliales de l'intestin. Lorsque la bactérie atteint l'intestin en présence d'une matrice laitière (sous une forme native comme c'est le cas pour les glycoprotéines de la MFGM), les sites d'adhésion des pili aux cellules intestinales sont déjà occupés par la matrice laitière. Ainsi, l'adhésion de LGG aux cellules intestinales est inhibée.

2. Perspectives

De nombreuses perspectives peuvent être faites suite à ce travail et certaines d'entre elles vont être décrites par la suite.

- **Perspective 1 : Confirmer le rôle de la sous-unité SpaC du pilus SpaCBA dans l'adhésion de LGG à la β -LG et la MFGM.**

Les résultats de ce travail de thèse démontrent le rôle clé du pilus SpaCBA dans l'adhésion de LGG à la β -LG et à la MFGM. Une hypothèse a été faite sur l'implication de la sous-unité SpaC du pilus dans ces adhésions. Pour confirmer cette hypothèse, l'utilisation de la SMFS pourrait être intéressante. Cette technique permettrait de fonctionnaliser une pointe AFM avec une molécule unique de SpaC afin d'étudier son adhésion avec la β -LG ou encore avec la MFGM.

- **Perspective 2 : Comprendre l'impact de la composition de surface de LGG dans leur localisation dans la microparticule**

L'étude de l'adhésion entre LGG et les différents constituants de la matrice laitière montre que LGG est capable d'adhérer spécifiquement avec les PS grâce à la présence de pili SpaCBA à sa surface. L'ajout de PS dans la matrice d'encapsulation favorise la localisation des bactéries à l'intérieur des microparticules probablement grâce à leur adhésion. La composition de la matrice

est donc importante pour la localisation des bactéries, mais qu'en est-il de la composition de surface des bactéries ?

Des études préliminaires ont été réalisées pour comprendre l'impact de la composition de surface de LGG sur leur localisation dans la microparticule (**Figure 79**). Pour cela LGG *spaCBA* a été encapsulé par émulsification dans une matrice composée de 80 % de caséines et 20 % de PS. La localisation des bactéries a été observée par CLSM dans les microparticules fraîches. En absence de pili, les bactéries ont tendance à s'agglomérer dans la microparticule et ne sont plus réparties de manière homogène, comme c'était le cas pour LGG WT. Le pilus SpaCBA semble donc important dans la localisation de LGG dans la microparticule.

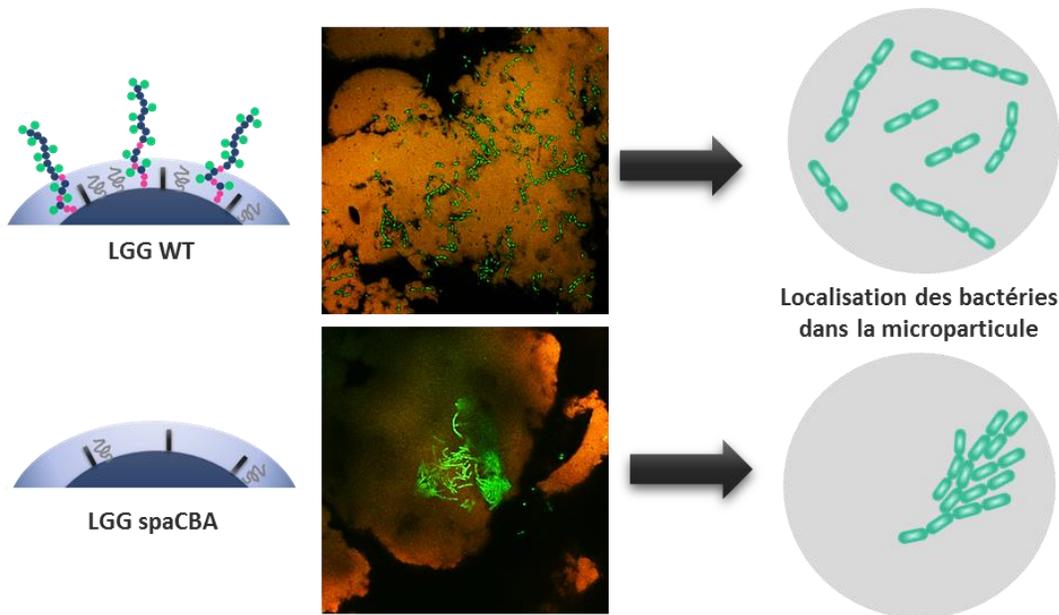


Figure 79 : Impact de la présence de pili SpaCBA dans la localisation de LGG dans la microparticule

Par la suite, l'étude de différents mutants de surface de LGG serait intéressante pour comprendre l'impact de chaque composé de surface de LGG sur sa localisation dans la microparticule. La localisation et l'organisation des bactéries dans la microparticule peuvent affecter leur survie au cours de la digestion gastro-intestinale mais aussi au cours de sa libération au niveau de l'intestin. Il serait donc également pertinent d'étudier l'impact de la localisation sur sa protection au cours de la digestion et sa libération dans l'intestin.

Conclusions et perspectives

- **Perspective 3 : Ajout de MFGM dans la matrice lors de l'encapsulation de LGG par séchage par atomisation**

Le plan de mélange utilisé dans ce travail de thèse a permis de mettre en évidence une matrice idéale pour former un gel protéique ferme et résistant. Cette matrice est composée de 80 % de caséines, 10 % de PS et 10 % de MFGM. Il serait intéressant d'utiliser cette matrice pour encapsuler LGG par séchage par atomisation afin d'étudier l'influence de l'ajout de MFGM sur les propriétés physicochimiques et les propriétés de réhydratation des poudres produites.

Un essai d'encapsulation de LGG avec cette matrice a été effectué en utilisant le procédé de séchage par atomisation mis au point au cours de ce travail. La matrice composée de MFGM permet d'obtenir un bon taux de survie des bactéries après l'étape de séchage et la production d'une poudre avec une teneur en eau assez faible. Le comportement des poudres lors de leur reconstitution à différentes températures a été observé par CLSM (**Figure 80**). Les poudres sont capables de se réhydrater dans de l'eau à 8 °C et de former des microparticules dans de l'eau à 40 °C.

Il serait intéressant par la suite, d'étudier le comportement de ces microparticules dispersé à 40 °C lors de la digestion gastro-intestinale, afin de voir si elles sont capables de protéger LGG lors de la digestion gastriques et de libérer LGG vivantes et fonctionnelles au niveau de l'intestin.

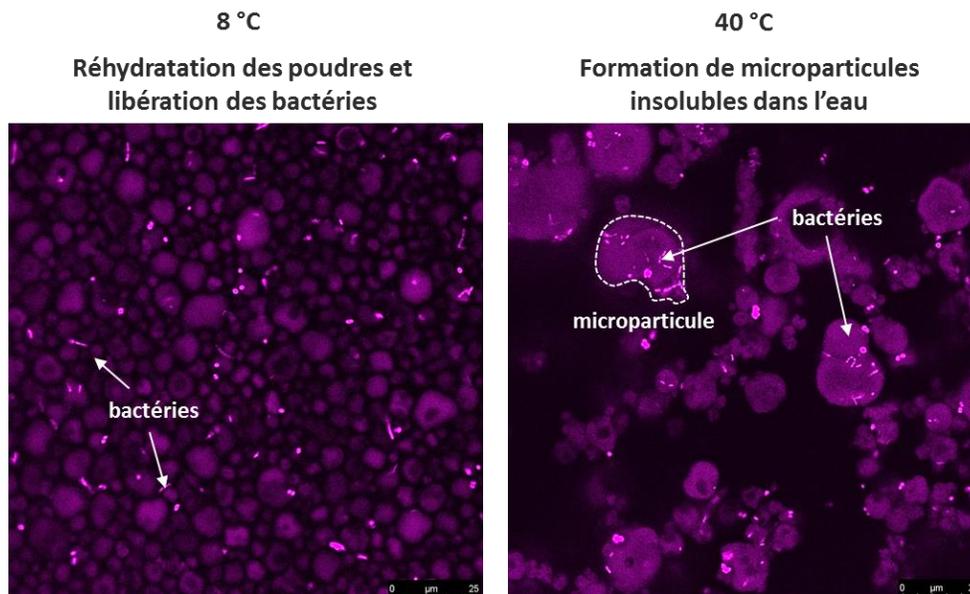


Figure 80 : Comportement des poudres produites par atomisation et reconstituées dans de l'eau à différentes températures observé par CLSM

- **Perspective 4 : Etudier l'adhésion de LGG aux cellules intestinales HT29-MTX et HT29-CL.16E sécrétrices de mucus**

Les études d'adhésion de LGG aux cellules épithéliales de l'intestin Caco-2 révèlent le rôle important du pilus SpaCBA dans cette adhésion. Chez l'homme, les cellules épithéliales de l'intestin sécrètent du mucus au niveau de leur surface. Or les cellules Caco-2 ne possèdent pas cette propriété. Il serait donc intéressant d'utiliser des cellules intestinales sécrétrices de mucus pour reproduire au mieux les conditions intestinales de l'homme. Pour cela les cellules HT29-MTX, sécrétrices principalement de mucine stomacale, ou les cellules HT29-CL.16E, sécrétrices principalement de mucine intestinales pourraient être utilisées.

RÉFÉRENCES

- Abe, F., Miyauchi, H., Uchijima, A., Yaeshima, T. & Iwatsuki, K. (2009) Effects of storage temperature and water activity on the survival of bifidobacteria in powder form. *International Journal of Dairy Technology*, **62**, 234–239.
- AFNOR. (1994) Amidon, fécules et produits dérivés - Dosage de l'azote selon la méthode de Kjeldahl - Méthode titrimétrique. (n° NF EN ISO 3188)
- Alegria, A., Garcia-Llatas, G. & Cilla, A. (2015) Static Digestion Models: General Introduction. Pp. 3–12 in: *The Impact of Food Bioactives on Health* (K. Verhoeckx, P. Cotter, I. Lopez-Exposito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka & H. Wichers, editors). Springer International Publishing.
- Amine, K.M., Champagne, C.P., Raymond, Y., St-Gelais, D., Britten, M., Fustier, P., Salmieri, S. & Lacroix, M. (2014) Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage. *Food Control*, **37**, 193–199.
- An, Y.H. & Friedman, R.J. (1998) Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterial Surfaces. *J.Biomed.Mater Res.(Appl.Biomater.)*, **43**, 338–348.
- 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.
- Anandharamakrishnan, C. (2017) *Handbook of Drying for Dairy Products*. P. in.: Wiley Blackwell, 336 pp.
- Ananta, E., Volkert, M. & Knorr, D. (2005) Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, **15**, 399–409.
- Andre, G., Kulakauskas, S., Chapot-Chartier, M.-P., Navet, B., Deghorain, M., Bernard, E., Hols, P. & Dufrêne, Y.F. (2010) Imaging the nanoscale organization of peptidoglycan in living *Lactococcus lactis* cells. *Nature Communications*, **1**, 27.
- Andre, G., Deghorain, M., Bron, P.A., van Swam, I., Kleerebezem, M., Hols, P. & Dufrêne, Y.F. (2011) Fluorescence and Atomic Force Microscopy Imaging of Wall Teichoic Acids in *Lactobacillus plantarum*. *ACS Chemical Biology*, **6**, 366–376.
- Arena, M.P., Capozzi, V., Spano, G. & Fiocco, D. (2017) The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 2641–2657.
- Arqués, J.L., Rodrigues, E., Langa, S., Landete, J. & Medina, M. (2015) Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products and Gut: Effect on Pathogens. *BioMed Research International*, **2015**, e584183.

Références

- Ashraf, R. & Shah, N.P. (2014) Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **54**, 938–956.
- Auty, M.A., Gardiner, G.E., McBrearty, S.J., O’Sullivan, E.O., Mulvihill, D.M., Collins, J.K., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. & Ross, R.P. (2001) Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 420–425.
- Baars, A., Oosting, A., Engels, E., Kegler, D., Kodde, A., Schipper, L., Verkade, H.J. & van der Beek, E.M. (2016) Milk fat globule membrane coating of large lipid droplets in the diet of young mice prevents body fat accumulation in adulthood. *The British Journal of Nutrition*, **115**, 1930–1937.
- Bacherio, D., Uson III, S. & Jimenez-Flores, R. (2007) Lipid binding characterization of lactic acid bacteria in dairy products. Toronto, Canada.
- Baharav, E., Mor, F., Halpern, M. & Weinberger, A. (2004) Lactobacillus GG bacteria ameliorate arthritis in Lewis rats. *The Journal of Nutrition*, **134**, 1964–1969.
- Bansil, R. & Turner, B.S. (2006) Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **11**, 164–170.
- Barbé, F., Ménard, O., Le Gouar, Y., Buffière, C., Famelart, M.-H., Laroche, B., Le Feunteun, S., Dupont, D. & Rémond, D. (2013) The heat treatment and the gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids. *Food Chemistry*, **136**, 1203–1212. ASSET 2011.
- Beaussart, A., Rolain, T., Duchene, M.C., El-Kirat-Chatel, S., Andre, G., Hols, P. & Dufrene, Y.F. (2013) Binding Mechanism of the Peptidoglycan Hydrolase Acm2: Low Affinity, Broad Specificity. *Biophysical Journal*, **105**, 620–629.
- Ben Messaoud, G., Sánchez-González, L., Probst, L. & Desobry, S. (2016) Influence of internal composition on physicochemical properties of alginate aqueous-core capsules. *Journal of Colloid and Interface Science*, **469**, 120–128.
- Benyacoub, J., Blum-Sperisen, S., Bosco, M.N., Bovetto, L.J.R., Bureau-Frantz, I., Donnet-Hughes, A., Schiffrin, E. & Favre, L. (2011) Infant formula with probiotics and milk fat globule membrane components. WO2011069987A1.
- Berer, K., Schubart, A., Williams, K.R. & Linington, C. (2005) Pathological consequences of molecular mimicry between myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) and butyrophilin (BTN) in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Immunology*, **116**, 42–42.
- Bergonzelli, G.E., Granato, D., Pridmore, R.D., Marvin-Guy, L.F., Donnicola, D. & Corthésy-Theulaz, I.E. (2006) GroEL of Lactobacillus johnsonii La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen Helicobacter pylori. *Infection and Immunity*, **74**, 425–434.

- Binnendijk, K.H. & Rijkers, G.T. (2013) What is a health benefit? An evaluation of EFSA opinions on health benefits with reference to probiotics. *Beneficial Microbes*, **4**, 223–230.
- Blanchette, L., Roy, D., Bélanger, G. & Gauthier, S.F. (1996) Production of Cottage Cheese Using Dressing Fermented by Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, **79**, 8–15.
- Bouchoux, A., Gésan-Guiziou, G., Pérez, J. & Cabane, B. (2010) How to Squeeze a Sponge: Casein Micelles under Osmotic Stress, a SAXS Study. *Biophysical Journal*, **99**, 3754–3762.
- Brisson, G., Payken, H.F., Sharpe, J.P. & Jimenez-Flores, R. (2010) Characterization of *Lactobacillus reuteri* interaction with milk fat globule membrane components in dairy products. *J Agric Food Chem*, **58**, 5612–9.
- Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Claes, I.J.J., Lebeer, S. & Kiekens, F. (2016) Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, **505**, 303–318.
- Brownlow, S., Morais Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C. & Sawyer, L. (1997) Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution--still an enigmatic lipocalin. *Structure (London, England: 1993)*, **5**, 481–495.
- Bu, P., Narayanan, S., Dalrymple, D., Cheng, X. & Serajuddin, A.T.M. (2016) Cytotoxicity assessment of lipid-based self-emulsifying drug delivery system with Caco-2 cell model: Cremophor EL as the surfactant. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **91**, 162–171.
- Buck, B.L., Altermann, E., Svingerud, T. & Klaenhammer, T.R. (2005) Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 8344–8351.
- Bugarski, B., Li, Q., Goosen, M.F.A., Poncelet, D., Neufeld, R.J. & Vunjak, G. (1994) Electrostatic droplet generation: Mechanism of polymer droplet formation. *AIChE Journal*, **40**, 1026–1031.
- Burgain, J. (2013) Microencapsulation de bactéries probiotiques dans des matrices laitières : études des mécanismes de formation par une approche multi-échelle. Université de Lorraine.
- 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.
- Burgain, J., Gaiani, C., Cailliez-Grimal, C., Jeandel, C. & Scher, J. (2013a) Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in microparticles: Influence of casein to whey protein ratio on bacterial survival during digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **19**, 233–242.
- Burgain, J., Gaiani, C., Francius, G., Revol-Junelles, A.M., Cailliez-Grimal, C., Lebeer, S., Tytgat, H.L.P., Vanderleyden, J. & Scher, J. (2013b) In vitro interactions between probiotic

Références

- bacteria and milk proteins probed by atomic force microscopy. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, **104**, 153–162.
- Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A.M., Cailliez-Grimal, C. & Gaiani, C. (2014a) Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science*, **213**, 21–35.
- Burgain, J., Gaiani, C., Jeandel, C., Ghoul, M. & Scher, J. (2014b) Method for encapsulating bioactive molecules in dairy matrices and microparticles obtained. EP2807932A1.
- Burgain, J., Scher, J., Lebeer, S., Vanderleyden, J., Cailliez-Grimal, C., Corgneau, M., Francius, G. & Gaiani, C. (2014c) Significance of bacterial surface molecules interactions with milk proteins to enhance microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Hydrocolloids*, **41**, 60–70.
- Burgain, J., Corgneau, M., Scher, J. & Gaiani, C. (2015a) Encapsulation of Probiotics in Milk Protein Microcapsules. Pp. 391–406 in: *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications* (L.M.C. Sagis, editor). Academic Press.
- Burgain, J., Scher, J., Lebeer, S., Vanderleyden, J., Corgneau, M., Guerin, J., Caillet, C., Duval, J.F.L., Francius, G. & Gaiani, C. (2015b) Impacts of pH-mediated EPS structure on probiotic bacterial pili–whey proteins interactions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **134**, 332–338.
- Burgain, J., Scher, J. & Gaiani, C. (2016) Microencapsulation de bactéries probiotiques. *Techniques de l'ingénieur*.
- Buruk Sahin, Y., Aktar Demirtaş, E. & Burnak, N. (2016) Mixture design: A review of recent applications in the food industry. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, **22**, 297–304.
- Campana, R., van Hemert, S. & Baffone, W. (2017) Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, **9**, 12.
- Carlson, A., Hill, C.G. & Olson, N.F. (1987) Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation. *Biotechnology and Bioengineering*, **29**, 582–589.
- Çelebioğlu, H.Y., Gudjónsdóttir, M., Meier, S., Duus, J.Ø., Lee, S. & Chronakis, I.S. (2015) Spectroscopic studies of the interactions between β -lactoglobulin and bovine submaxillary mucin. *Food Hydrocolloids*, **50**, 203–210.
- Chapot-Chartier, M.-P. & Kulakauskas, S. (2014) Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, **13**, S9.

- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. & Collins, J.K. (1998) Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 759–768.
- Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D. & Khutoryanskiy, V.V. (2012) Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, **162**, 56–67.
- 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. *J Appl Microbiol*, **96**, 1024–39.
- Corr, S.C., Hill, C. & Gahan, C.G.M. (2009) Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Advances in Food and Nutrition Research*, **56**, 1–15.
- Corredig, M. & Dalgleish, D.G. (1997) Isolates from Industrial Buttermilk: Emulsifying Properties of Materials Derived from the Milk Fat Globule Membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 4595–4600.
- Corredig, M. & Dalgleish, D.G. (1998) Characterization of the interface of an oil-in-water emulsion stabilized by milk fat globule membrane material. *Journal of Dairy Research*, **65**, 465–477.
- Corredig, M., Roesch, R.R. & Dalgleish, D.G. (2003) Production of a Novel Ingredient from Buttermilk. *Journal of Dairy Science*, **86**, 2744–2750.
- Dalgleish, D.G. (2011) On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft Matter*, **7**, 2265–2272.
- Dalgleish, D.G., Spagnuolo, P.A. & Douglas Goff, H. (2004) A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, **14**, 1025–1031.
- De Prisco, A. & Mauriello, G. (2016) Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science & Technology*, **48**, 27–39.
- Deepika, G., Rastall, R.A. & Charalampopoulos, D. (2011) Effect of food models and low-temperature storage on the adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* GG to Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 8661–8666.
- DeJong, G. a. h. & Koppelman, S. j. (2002) Transglutaminase Catalyzed Reactions: Impact on Food Applications. *Journal of Food Science*, **67**, 2798–2806.
- Demmer, E., Van Loan, M.D., Rivera, N., Rogers, T.S., Gertz, E.R., German, J.B., Smilowitz, J.T. & Zivkovic, A.M. (2016) Addition of a dairy fraction rich in milk fat globule membrane to a high-saturated fat meal reduces the postprandial insulinaemic and inflammatory response in overweight and obese adults. *Journal of Nutritional Science*, **5**, e14.

Références

- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T.T., Messens, K. & Van Camp, J. (2008) Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, **18**, 436–457. Netherlands Association for the Advancement of Dairy Science 1908-2008.
- Ding, W.K. & Shah, N.P. (2008) Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple Juices. *International Food Research Journal*, **15**, 219–232.
- Doherty, S.B., Wang, L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. & Brodkorb, A. (2010) Use of viability staining in combination with flow cytometry for rapid viability assessment of *Lactobacillus rhamnosus* GG in complex protein matrices. *Journal of Microbiological Methods*, **82**, 301–310.
- Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. & Brodkorb, A. (2011) Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids*, **25**, 1604–1617.
- Doherty, S.B., Auty, M.A., Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. & Brodkorb, A. (2012) Survival of entrapped *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein micro-beads during simulated ex vivo gastro-intestinal transit. *International Dairy Journal*, **22**, 31–43.
- Dominguez-Ramirez, L., Del Moral-Ramirez, E., Cortes-Hernandez, P., Garcia-Garibay, M. & Jimenez-Guzman, J. (2013) beta-lactoglobulin's conformational requirements for ligand binding at the calyx and the dimer interphase: a flexible docking study. *PLoS One*, **8**, e79530.
- Doron, S., Snyderman, D.R. & Gorbach, S.L. (2005) *Lactobacillus* GG: Bacteriology and clinical applications. *Gastroenterology Clinics of North America*, **34**, 483–498.
- Douillard, F.P., Ribbera, A., Järvinen, H.M., Kant, R., Pietilä, T.E., Randazzo, C., Paulin, L., Laine, P.K., Caggia, C., von Ossowski, I., Reunanen, J., Satokari, R., Salminen, S., Palva, A. & de Vos, W.M. (2013) Comparative Genomic and Functional Analysis of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* Strains Marketed as Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 1923–1933.
- Dupont, D. & Mackie, A.R. (2015) Static and dynamic in vitro digestion models to study protein stability in the gastrointestinal tract. *Drug Discovery Today: Disease Models*, **17–18**, 23–27. In vivo and in vitro models of food allergy.
- Dupres, V., Alsteens, D., Andre, G., Verbelen, C. & Dufrene, Y.F. (2009) Fishing single molecules on live cells. *Nano Today*, **4**, 262–268.
- Edwards, P.J.B. & Jameson, G.B. (2014) Structure and Stability of Whey Proteins. Pp. 201–242 in: *Milk Proteins (Second Edition)*. Food Science and Technology, Academic Press, San Diego.

- EFSA. (2010) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, **8**.
- El Mafadi, S. & Poncelet, D. (2007) L'enrobage en lit fluidisé pour la production de microcapsules. Pp. 131–147 in: *Microencapsulation. Des Sciences Aux Technologies*. Lavoisier.
- Elías-Argote, X., Laubscher, A. & Jiménez-Flores, R. (2013) Dairy Ingredients Containing Milk Fat Globule Membrane: Description, Composition, and Industrial Potential. Pp. 71–98 in: *Advances in Dairy Ingredients* (G.W. Smithers & ry A. Augustin, editors). Wiley-Blackwell.
- El-Loly, M. (2011) Composition, Properties and Nutritional Aspects of Milk Fat Globule Membrane - a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **61**, 7–32.
- Etzold, S., MacKenzie, D.A., Jeffers, F., Walshaw, J., Roos, S., Hemmings, A.M. & Juge, N. (2014) Structural and molecular insights into novel surface-exposed mucus adhesins from *Lactobacillus reuteri* human strains. *Molecular Microbiology*, **92**, 543–556.
- European Commission. (2006) Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods.
- Evers, J.M. (2004) The milkfat globule membrane—compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. *International Dairy Journal*, **14**, 661–674.
- Evers, J.M., Haverkamp, R.G., Holroyd, S.E., Jameson, G.B., Mackenzie, D.D.S. & McCarthy, O.J. (2008) Heterogeneity of milk fat globule membrane structure and composition as observed using fluorescence microscopy techniques. *International Dairy Journal*, **18**, 1081–1089.
- FAO/WHO. (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
- Farhang, B., Kakuda, Y. & Corredig, M. (2012) Encapsulation of ascorbic acid in liposomes prepared with milk fat globule membrane-derived phospholipids. *Dairy Science & Technology*, **92**, 353–366.
- Fitzpatrick, J.J., van Lauwe, A., Coursol, M., O'Brien, A., Fitzpatrick, K.L., Ji, J. & Miao, S. (2016) Investigation of the rehydration behaviour of food powders by comparing the behaviour of twelve powders with different properties. *Powder Technology*, **297**, 340–348.
- Foegeding, E.A. (2006) Food Biophysics of Protein Gels: A Challenge of Nano and Macroscopic Proportions. *Food Biophysics*, **1**, 41–50.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497–509.

Références

- Fong, B.Y., Norris, C.S. & MacGibbon, A.K.H. (2007) Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *International Dairy Journal*, **17**, 275–288.
- Fong, F.L.Y., Shah, N.P., Kirjavainen, P. & El-Nezami, H. (2016) Mechanism of Action of Probiotic Bacteria on Intestinal and Systemic Immunities and Antigen-Presenting Cells. *International Reviews of Immunology*, **35**, 179–188.
- Fox, P.F. (2008) Milk: an overview. Pp. 1–54 in: *Milk Proteins* (A. Thompson, M. Boland & H. Singh, editors). Food Science and Technology, Academic Press, San Diego.
- Francius, G., Alsteens, D., Dupres, V., Lebeer, S., De Keersmaecker, S., Vanderleyden, J., Gruber, H.J. & Dufrêne, Y.F. (2009) Stretching polysaccharides on live cells using single molecule force spectroscopy. *Nature Protocols*, **4**, 939–946.
- Gaiani, C., Schuck, P., Scher, J., Desobry, S. & Banon, S. (2007) Dairy Powder Rehydration: Influence of Protein State, Incorporation Mode, and Agglomeration. *Journal of Dairy Science*, **90**, 570–581.
- Gaiani, C., Boyanova, P., Hussain, R., Murrieta Pazos, I., Karam, M.C., Burgain, J. & Scher, J. (2011) Morphological descriptors and colour as a tool to better understand rehydration properties of dairy powders. *International Dairy Journal*, **21**, 462–469.
- Gallier, S., Vocking, K., Post, J.A., Van De Heijning, B., Acton, D., Van Der Beek, E.M. & Van Baalen, T. (2015) A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **136**, 329–339.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. & Saurel, R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 1107–1121.
- Giroux, H.J., Lanouette, G. & Britten, M. (2015) Effect of whey protein aggregates of various sizes on the formation and properties of rennet-induced milk gels. *Food Hydrocolloids*, **45**, 272–278.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Smacchi, E., Zocchetti, A. & Angelis, M.D. (1998) Production of Crescenza Cheese by Incorporation of Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, **81**, 37–47.
- Goldin, B.R., Gualtieri, L.J. & Moore, R.P. (1996) The effect of Lactobacillus GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutrition and Cancer*, **25**, 197–204.
- Gorbach, S.L. (1996) The discovery of Lactobacillus GG. *Nutrition Today*, **31**, 2S–4S.
- Gorewit, R.C. & Spitsberg, V.L. (Cornell U. (1998) Anti-cancer properties of proteins in the milk fat globule membranes in whey. International Dairy Federation.

- Gosselink, M.P., Schouten, W.R., van Lieshout, L.M.C., Hop, W.C.J., Laman, J.D. & Ruseler-van Embden, J.G.H. (2004) Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Diseases of the Colon and Rectum*, **47**, 876–884.
- Goupy, J. & Creighton, L. (2013) *Introduction aux plans d'expériences avec applications*. P. in.: 4th edition. Dunod.
- Granato, D., Bergonzelli, G.E., Pridmore, R.D., Marvin, L., Rouvet, M. & Corthésy-Theulaz, I.E. (2004) Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infection and Immunity*, **72**, 2160–2169.
- Grossiord, J.L. & Quemada, D. (2012) Des concepts aux outils. Pp. 9–31 in: *Comprendre la rhéologie: De la circulation du sang à la prise du béton*. EDP Sciences.
- Guerin, J., Bacharouche, J., Burgain, J., Lebeer, S., Francius, G., Borges, F., Scher, J. & Gaiani, C. (2016) Pili of *Lactobacillus rhamnosus* GG mediate interaction with β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, **58**, 35–41.
- Gülseren, İ., Guri, A. & Corredig, M. (2012) Encapsulation of Tea Polyphenols in Nanoliposomes Prepared with Milk Phospholipids and Their Effect on the Viability of HT-29 Human Carcinoma Cells. *Food Digestion*, **3**, 36–45.
- Gunning, A.P., Kirby, A.R., Fuell, C., Pin, C., Tailford, L.E. & Juge, N. (2013) Mining the “glycocode”--exploring the spatial distribution of glycans in gastrointestinal mucin using force spectroscopy. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **27**, 2342–2354.
- Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Dalgleish, D. & Singh, H. (2016) Impact of colloidal structure of gastric digesta on in-vitro intestinal digestion of whey protein emulsion gels. *Food Hydrocolloids*, **54, Part B**, 255–265.
- Gupta, P., Andrew, H., Kirschner, B.S. & Guandalini, S. (2000) Is lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **31**, 453–457.
- Hansen, L.T., Allan-Wojtas, P.M., Jin, Y.-L. & Paulson, A.T. (2002) Survival of Ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, **19**, 35–45.
- Haramizu, S., Mori, T., Yano, M., Ota, N., Hashizume, K., Otsuka, A., Hase, T. & Shimotoyodome, A. (2014) Habitual exercise plus dietary supplementation with milk fat globule membrane improves muscle function deficits via neuromuscular development in senescence-accelerated mice. *SpringerPlus*, **3**, 339.
- Harrison, R. (2006) Milk xanthine oxidase: Properties and physiological roles. *International Dairy Journal*, **16**, 546–554. First IDF Symposium on Indigenous Enzymes in Milk First IDF Symposium on Indigenous Enzymes in Milk.

Références

- Hatakka, K., Martio, J., Korpela, M., Herranen, M., Poussa, T., Laasanen, T., Saxelin, M., Vapaatalo, H., Moilanen, E. & Korpela, R. (2003) Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis--a pilot study. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, **32**, 211–215.
- Heid, H.W. & Keenan, T.W. (2005) Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *European Journal of Cell Biology*, **84**, 245–258.
- Heidebach, T., Först, P. & Kulozik, U. (2009a) Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, **23**, 1670–1677.
- Heidebach, T., Först, P. & Kulozik, U. (2009b) Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International dairy journal*, **19**, 77–84.
- Heidebach, T., Först, P. & Kulozik, U. (2010) Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering*, **98**, 309–316.
- van Hemert, S., Meijerink, M., Molenaar, D., Bron, P.A., de Vos, P., Kleerebezem, M., Wells, J.M. & Marco, M.L. (2010) Identification of *Lactobacillus plantarum* genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Microbiology*, **10**, 293.
- Hermansson, M. (1999) The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **14**, 105–119.
- Hernell, O., Timby, N., Domellöf, M. & Lönnerdal, B. (2016) Clinical Benefits of Milk Fat Globule Membranes for Infants and Children. *The Journal of Pediatrics*, **173**, **Supplement**, S60–S65. Emerging Roles of Bioactive Components in Pediatric Nutrition.
- Hickey, C.D., Sheehan, J.J., Wilkinson, M.G. & Auty, M.A.E. (2015a) Growth and location of bacterial colonies within dairy foods using microscopy techniques: a review. *Food Microbiology*, **6**, 99.
- Hickey, C.D., Auty, M.A.E., Wilkinson, M.G. & Sheehan, J.J. (2015b) The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localisation and their interactions during ripening: A review. *Trends in Food Science & Technology*, **41**, 135–148.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C. & Sanders, M.E. (2014) Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **11**, 506–514.
- Holt, C. (1992) Structure and Stability of Bovine Casein Micelles. *Advances in Protein Chemistry*, **43**, 63–151.

- Holz Müller, W. & Kulozik, U. (2016) Isolation of milk fat globule membrane (MFGM) material by coagulation and diafiltration of buttermilk. *International Dairy Journal*, **63**, 88–91.
- Holz Müller, W., Gmach, O., Griebel, A. & Kulozik, U. (2016a) Casein precipitation by acid and rennet coagulation of buttermilk: Impact of pH and temperature on the isolation of milk fat globule membrane proteins. *International Dairy Journal*, **63**, 115–123.
- Holz Müller, W., Müller, M., Himbert, D. & Kulozik, U. (2016b) Impact of cream washing on fat globules and milk fat globule membrane proteins. *International Dairy Journal*, **59**, 52–61.
- Horne, D.S. (1998) Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products. *International Dairy Journal*, **8**, 171–177.
- Huang, S., Méjean, S., Rabah, H., Dolivet, A., Le Loir, Y., Chen, X.D., Jan, G., Jeantet, R. & Schuck, P. (2017a) Double use of concentrated sweet whey for growth and spray drying of probiotics: Towards maximal viability in pilot scale spray dryer. *Journal of Food Engineering*, **196**, 11–17.
- Huang, S., Vignolles, M.-L., Chen, X.D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P. & Jeantet, R. (2017b) Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, **63**, 1–17.
- Jantzen, M., Gopel, A. & Beermann, C. (2013) Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. *J Appl Microbiol*, **115**, 1029–36.
- Jensen, H., Roos, S., Jonsson, H., Rud, I., Grimmer, S., van Pijkeren, J.-P., Britton, R.A. & Axelsson, L. (2014) Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucus-binding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus in vitro. *Microbiology (Reading, England)*, **160**, 671–681.
- Ji, J., Fitzpatrick, J., Cronin, K., Maguire, P., Zhang, H. & Miao, S. (2016) Rehydration behaviours of high protein dairy powders: The influence of agglomeration on wettability, dispersibility and solubility. *Food Hydrocolloids*, **58**, 194–203.
- Jiménez-Flores, R. & Brisson, G. (2008) The milk fat globule membrane as an ingredient: why, how, when? *Dairy Science & Technology*, **88**, 5–18.
- Jin, H.-H., Lu, Q. & Jiang, J.-G. (2016) Curcumin liposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids and soybean lecithin. *Journal of Dairy Science*, **99**, 1780–1790.
- Juge, N. (2012) Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in Microbiology*, **20**, 30–39.
- Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, R., Vesterlund, S., Hendrickx, A.P., Lebeer, S., De Keersmaecker, S.C., Vanderleyden, J., Hamalainen, T., Laukkanen, S., Salovuori, N., Ritari, J., Alatalo, E., Korpela, R., Mattila-Sandholm, T., Lassig, A., Hatakka, K., Kinnunen, K.T., Karjalainen, H., Saxelin, M., Laakso, K., Surakka, A., Palva, A., Salusjarvi, T., Auvinen, P. & de Vos, W.M. (2009)

Références

- Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 17193–8.
- Kanno, C., Shimomura, Y. & Takano, E. (1991) Physicochemical Properties of Milk Fat Emulsions Stabilized with Bovine Milk Fat Globule Membrane. *Journal of Food Science*, 1219–1223.
- Khem, S., Bansal, V., Small, D.M. & May, B.K. (2016a) Comparative influence of pH and heat on whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum* A17 during spray drying. *Food Hydrocolloids*, **54**, Part A, 162–169.
- Khem, S., Small, D.M. & May, B.K. (2016b) The behaviour of whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry*, **190**, 717–723.
- Kim, H.-H.Y. & Baianu, I.C. (1991) Novel liposome microencapsulation techniques for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, **2**, 55–61.
- Kinoshita, H., Uchida, H., Kawai, Y., Kawasaki, T., Wakahara, N., Matsuo, H., Watanabe, M., Kitazawa, H., Ohnuma, S., Miura, K., Horii, A. & Saito, T. (2008) Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *Journal of Applied Microbiology*, **104**, 1667–1674.
- Kline, K.A., Falker, S., Dahlberg, S., Normark, S. & Henriques-Normark, B. (2009) Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe*, **5**, 580–592.
- Kontopidis, G., Holt, C. & Sawyer, L. (2002) The ligand-binding site of bovine beta-lactoglobulin: evidence for a function? *J Mol Biol*, **318**, 1043–55.
- Kontopidis, G., Holt, C. & Sawyer, L. (2004) Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science*, **87**, 785–796.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. & Deeth, H. (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, **13**, 3–13.
- de Kruif, C.G., Huppertz, T., Urban, V.S. & Petukhov, A.V. (2012) Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, **171–172**, 36–52.
- Kurth, L. & Rogers, P.J. (1984) Transglutaminase Catalyzed Cross-Linking of Myosin to Soya Protein, Casein and Gluten. *Journal of Food Science*, **49**, 573–576.
- Kvistgaard, A.S., Pallesen, L.T., Arias, C.F., López, S., Petersen, T.E., Heegaard, C.W. & Rasmussen, J.T. (2004) Inhibitory Effects of Human and Bovine Milk Constituents on Rotavirus Infections. *Journal of Dairy Science*, **87**, 4088–4096.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Laličić-Petronijević, J., Popov-Raljić, J., Obradović, D., Radulović, Z., Paunović, D., Petrušić, M. & Pezo, L. (2015) Viability of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and

- Bifidobacterium lactis HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days. *Journal of Functional Foods*, **15**, 541–550.
- Laloy, E., Vuillemand, J.-C., El Soda, M. & Simard, R.E. (1996) Influence of the fat content of Cheddar cheese on retention and localization of starters. *International Dairy Journal*, **6**, 729–740.
- Landersjö, C., Yang, Z., Huttunen, E. & Widmalm, G. (2002) Structural Studies of the Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103). *Biomacromolecules*, **3**, 880–884.
- Le, D.T., Tran, T.L., Duviau, M.P., Meyrand, M., Guerardel, Y., Castelain, M., Loubiere, P., Chapot-Chartier, M.P., Dague, E. & Mercier-Bonin, M. (2013) Unraveling the role of surface mucus-binding protein and pili in muco-adhesion of *Lactococcus lactis*. *PLoS One*, **8**, e79850.
- Le, T.T., Van Camp, J., Rombaut, R., van Leeckwyck, F. & Dewettinck, K. (2009) Effect of washing conditions on the recovery of milk fat globule membrane proteins during the isolation of milk fat globule membrane from milk. *Journal of Dairy Science*, **92**, 3592–3603.
- Le, T.T., Van de Wiele, T., Do, T.N.H., Debyser, G., Struijs, K., Devreese, B., Dewettinck, K. & Van Camp, J. (2012) Stability of milk fat globule membrane proteins toward human enzymatic gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science*, **95**, 2307–2318.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Velez, M.P., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S.C.J. (2007) Impact of environmental and genetic factors on Biofilm formation by the Probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 6768–6775.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S.C.J. (2008) Genes and Molecules of *Lactobacilli* Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, **72**, 728–764.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrene, Y., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S.C. (2009) Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Appl Environ Microbiol*, **75**, 3554–3563.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S.C.J. (2010) Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 171–184.
- Lebeer, S., Claes, I.J.J., Verhoeven, T.L.A., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S.C.J. (2011) Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine. *Microbial Biotechnology*, **4**, 368–374.

Références

- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H.L., Verhoeven, T.L., Marien, E., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A., Vos, W.M., Keersmaecker, S.C. & Vanderleyden, J. (2012a) Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol*, **78**, 185–93.
- Lebeer, S., Claes, I.J., Balog, C.I., Schoofs, G., Verhoeven, T.L., Nys, K., von Ossowski, I., de Vos, W.M., Tytgat, H.L., Agostinis, P., Palva, A., Van Damme, E.J., Deelder, A.M., De Keersmaecker, S.C., Wuhler, M. & Vanderleyden, J. (2012b) The major secreted protein Msp1/p75 is O-glycosylated in *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microbial Cell Factories*, **11**, 15.
- Lee, B., Yin, X., Griffey, S.M. & Marco, M.L. (2015) Attenuation of Colitis by *Lactobacillus casei* BL23 Is Dependent on the Dairy Delivery Matrix. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**, 6425–6435.
- Lee, G.U., Chrisey, L.A. & Colton, R.J. (1994) Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science (New York, N.Y.)*, **266**, 771–773.
- Lévy, R. & Maaloum, M. (2002) Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods. *Nanotechnology*, **13**, 33–37.
- Lim, B.-K., Mahendran, R., Lee, Y.-K. & Bay, B.-H. (2002) Chemopreventive effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of a subcutaneously implanted bladder cancer cell line in the mouse. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, **93**, 36–41.
- Liu, H., Gong, J., Chabot, D., Miller, S.S., Cui, S.W., Ma, J., Zhong, F. & Wang, Q. (2015) Protection of heat-sensitive probiotic bacteria during spray-drying by sodium caseinate stabilized fat particles. *Food Hydrocolloids*, **51**, 459–467.
- Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C. & Singh, H. (2013) Stability during in vitro digestion of lactoferrin-loaded liposomes prepared from milk fat globule membrane-derived phospholipids. *Journal of Dairy Science*, **96**, 2061–2070.
- Livney, Y.D. (2010) Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **15**, 73–83.
- Lopez, C., Maillard, M.-B., Briard-Bion, V., Camier, B. & Hannon, J.A. (2006a) Lipolysis during ripening of Emmental cheese considering organization of fat and preferential localization of bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 5855–5867.
- Lopez, C., Maillard, M.-B., Briard-Bion, V., Camier, B. & Hannon, J.A. (2006b) Lipolysis during Ripening of Emmental Cheese Considering Organization of Fat and Preferential Localization of Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 5855–5867.
- Lopez, C., Madec, M.-N. & Jimenez-Flores, R. (2010) Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chemistry*, **120**, 22–33.

- Lucey, J.A. (2008) Milk protein gels. Pp. 449–481 in: *Milk Proteins* (A. Thompson, M. Boland & H. Singh, editors). Food Science and Technology, Academic Press, San Diego.
- Ly, M.H., Aguedo, M., Goudot, S., Le, M.L., Cayot, P., Teixeira, J.A., Le, T.M., Belin, J.-M. & Waché, Y. (2008) Interactions between bacterial surfaces and milk proteins, impact on food emulsions stability. *Food Hydrocolloids*, **22**, 742–751.
- Maciel, G.M., Chaves, K.S., Grosso, C.R.F. & Gigante, M.L. (2014) Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. *Journal of Dairy Science*, **97**, 1991–1998.
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S. & Hollingsworth, M.A. (2003) Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*, **52**, 827–833.
- Maherani, B., Arab-Tehrany, E., R. Mozafari, M., Gaiani, C. & Linder, M. (2011) Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanoscience*, **7**, 436–452.
- Majorek, K.A., Porebski, P.J., Dayal, A., Zimmerman, M.D., Jablonska, K., Stewart, A.J., Chruszcz, M. & Minor, W. (2012) Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, **52**, 174–182.
- Manojlović, V., Nedović, V.A., Kailasapathy, K. & Zuidam, N.J. (2010) Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. Pp. 269–302 in: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (N.J. Zuidam & V. Nedovic, editors). Springer New York.
- Marco, M.L. & Tachon, S. (2013) Environmental factors influencing the efficacy of probiotic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, **24**, 207–213. Food biotechnology • Plant biotechnology.
- Marco, M.L., de Vries, M.C., Wels, M., Molenaar, D., Mangell, P., Ahrne, S., de Vos, W.M., Vaughan, E.E. & Kleerebezem, M. (2010) Convergence in probiotic *Lactobacillus* gut-adaptive responses in humans and mice. *The ISME Journal*, **4**, 1481–1484.
- Marszalek, P.E., Oberhauser, A.F., Pang, Y.-P. & Fernandez, J.M. (1998) Polysaccharide elasticity governed by chair–boat transitions of the glucopyranose ring. *Nature*, **396**, 661–664.
- Martin, H.M., Hancock, J.T., Salisbury, V. & Harrison, R. (2004) Role of Xanthine Oxidoreductase as an Antimicrobial Agent. *Infection and Immunity*, **72**, 4933–4939.
- Martín, M.J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M.A. & Morales, M.E. (2015) Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **27**, 15–25.
- Mather, I.H. (2000) A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *Journal of Dairy Science*, **83**, 203–247.

Références

- McClements, D.J. (2012) 1 - Requirements for food ingredient and nutraceutical delivery systems. Pp. 3–18 in: *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Woodhead Publishing.
- McMahon, D.J. & Oommen, B.S. (2008) Supramolecular Structure of the Casein Micelle. *Journal of Dairy Science*, **91**, 1709–1721.
- Mimouni, A., Deeth, H.C., Whittaker, A.K., Gidley, M.J. & Bhandari, B.R. (2010) Investigation of the microstructure of milk protein concentrate powders during rehydration: alterations during storage. *Journal of Dairy Science*, **93**, 463–472.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W. & Brodkorb, A. (2014) A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, **5**, 1113–1124.
- Miyoshi, Y., Okada, S., Uchimura, T. & Satoh, E. (2006) A mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **70**, 1622–1628.
- Monaco, H.L., Zanotti, G., Spadon, P., Bolognesi, M., Sawyer, L. & Eliopoulos, E.E. (1987) Crystal structure of the trigonal form of bovine beta-lactoglobulin and of its complex with retinol at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol*, **197**, 695–706.
- Morin, P., Pouliot, Y. & Britten, M. (2008) Effect of buttermilk made from creams with different heat treatment histories on properties of rennet gels and model cheeses. *Journal of Dairy Science*, **91**, 871–882.
- Mozafari, M.R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G.G., Cui, J., Pardakhty, A. & Yurdugul, S. (2008) Encapsulation of Food Ingredients Using Nanoliposome Technology. *International Journal of Food Properties*, **11**, 833–844.
- Newburg, D.S., Peterson, J.A., Ruiz-Palacios, G.M., Matson, D.O., Morrow, A.L., Shults, J., Guerrero, M. de L., Chaturvedi, P., Newburg, S.O., Scallan, C.D., Taylor, M.R., Ceriani, R.L. & Pickering, L.K. (1998) Role of human-milk lactadherin in protectoin against symptomatic rotavirus infection. *The Lancet*, **351**, 1160–1164.
- Nishiyama, K., Sugiyama, M. & Mukai, T. (2016) Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. *Microorganisms*, **4**.
- Oberg, C., McManus, W. & McMahon, D. (1993) Microstructure of Mozzarella Cheese During Manufacture. *Food Structure*, **12**.
- Ofek, I., Hasty, D.L. & Doyle, R.J. (2003) Basic Concepts in Bacterial Adhesion. Pp. 1–18 in: *Bacterial Adhesion to ANimal Cells and Tissues*. Hardcover.

- von Ossowski, I., Reunanen, J., Satokari, R., Vesterlund, S., Kankainen, M., Huhtinen, H., Tynkkynen, S., Salminen, S., de Vos, W.M. & Palva, A. (2010) Mucosal adhesion properties of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCBA and SpaFED pilin subunits. *Appl Environ Microbiol*, **76**, 2049–57.
- von Ossowski, I., Satokari, R., Reunanen, J., Lebeer, S., De Keersmaecker, S.C.J., Vanderleyden, J., de Vos, W.M. & Palva, A. (2011) Functional characterization of a mucus-specific LPXTG surface adhesin from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 4465–4472.
- Ota, N., Soga, S., Hase, T. & Shimotoyodome, A. (2015) Daily consumption of milk fat globule membrane plus habitual exercise improves physical performance in healthy middle-aged adults. *SpringerPlus*, **4**, 120.
- Parker, P., Sando, L., Pearson, R., Kongsuwan, K., Tellam, R.L. & Smith, S. (2009) Bovine Muc1 inhibits binding of enteric bacteria to Caco-2 cells. *Glycoconjugate Journal*, **27**, 89–97.
- Patton, S., Gendler, S.J. & Spicer, A.P. (1995) The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1241**, 407–423.
- Peighambaroust, S.H., Golshan Tafti, A. & Hesari, J. (2011) Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*, **22**, 215–224.
- Perea Velez, M., Verhoeven, T.L., Draing, C., Von Aulock, S., Pfitzenmaier, M., Geyer, A., Lambrichts, I., Grangette, C., Pot, B., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S.C. (2007) Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 3595–604.
- Perea Vélez, M., Petrova, M.I., Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Claes, I., Lambrichts, I., Tynkkynen, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S.C.J. (2010) Characterization of MabA, a modulator of *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion and biofilm formation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **59**, 386–398.
- Perreault, V., Turcotte, O., Morin, P., Pouliot, Y. & Britten, M. (2016) Combined effect of denatured whey protein concentrate level and fat level in milk on rennet gel properties. *International Dairy Journal*, **55**, 1–9.
- Petit, J., Herbig, A.-L., Moreau, A. & Delaplace, G. (2011) Influence of calcium on β -lactoglobulin denaturation kinetics: Implications in unfolding and aggregation mechanisms. *Journal of Dairy Science*, **94**, 5794–5810.
- Petit, J., Méjean, S., Accart, P., Galet, L., Schuck, P., Le Floch-Fouéré, C., Delaplace, G. & Jeantet, R. (2015) A dimensional analysis approach for modelling the size of droplets formed by bi-fluid atomisation. *Journal of Food Engineering*, **149**, 237–247.

Références

- 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.
- Pike, A.C., Brew, K. & Acharya, K.R. (1996) Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine alpha-lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase. *Structure (London, England: 1993)*, **4**, 691–703.
- Pinto, S.S., Fritzen-Freire, C.B., Benedetti, S., Murakami, F.S., Petrus, J.C.C., Prudêncio, E.S. & Amboni, R.D.M.C. (2015) Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect Bifidobacterium-BB-12 microencapsulated by spray drying. *Food Research International*, **67**, 400–408.
- Polak-Berecka, M., Waśko, A., Paduch, R., Skrzypek, T. & Sroka-Bartnicka, A. (2014) The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **106**, 751–762.
- Pretzer, G., Snel, J., Molenaar, D., Wiersma, A., Bron, P.A., Lambert, J., de Vos, W.M., van der Meer, R., Smits, M.A. & Kleerebezem, M. (2005) Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, **187**, 6128–6136.
- Rao, R.K. & Samak, G. (2013) Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications. *Current Nutrition and Food Science*, **9**, 99–107.
- Reddy, I.M. & Kinsella, J.E. (1990) Interaction of α -Lactoglobulin with K-Casein in Micelles As Assessed by Chymosin Hydrolysis: Effect of Temperature, Heating Time, α -Lactoglobulin Concentration, and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**, 50–58.
- Reddy, I.M., Kella, N.K.D. & Kinsella, J.E. (1988) Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**, 737–741.
- Reid, A.A., Vuilleumard, J.C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E. & Champagne, C.P. (2005) Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca^{2+} -induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. *Journal of Microencapsulation*, **22**, 603–619.
- Reid, A.A., Champagne, C. p., Gardner, N., Fustier, P. & Vuilleumard, J. c. (2007) Survival in Food Systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 Microentrapped in Whey Protein Gel Particles. *Journal of Food Science*, **72**, M031–M037.
- Reineccius, G.A. (University of M. (1995) Liposomes for controlled release in the food industry.
- Reunanen, J., von Ossowski, I., Hendrickx, A.P., Palva, A. & de Vos, W.M. (2012) Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol*, **78**, 2337–44.

- Rhodes, D.A., Reith, W. & Trowsdale, J. (2016) Regulation of Immunity by Butyrophilins. *Annual Review of Immunology*, **34**, 151–172.
- Riccio, P. (2004) The proteins of the milk fat globule membrane in the balance. *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 458–461.
- Roesch, R.R., Rincon, A. & Corredig, M. (2004) Emulsifying Properties of Fractions Prepared from Commercial Buttermilk by Microfiltration. *Journal of Dairy Science*, **87**, 4080–4087.
- Rombaut, R., Dejonckheere, V. & Dewettinck, K. (2007) Filtration of Milk Fat Globule Membrane Fragments from Acid Buttermilk Cheese Whey. *Journal of Dairy Science*, **90**, 1662–1673.
- Roos, S. & Jonsson, H. (2002) A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology (Reading, England)*, **148**, 433–442.
- Ross, S.A., Lane, J.A., Kilcoyne, M., Joshi, L. & Hickey, R.M. (2016) Defatted bovine milk fat globule membrane inhibits association of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with human HT-29 cells. *International Dairy Journal*, **59**, 36–43.
- Rushdy, A.A. & Gomaa, E.Z. (2013) Antimicrobial compounds produced by probiotic *Lactobacillus brevis* isolated from dairy products. *Annals of Microbiology*, **63**, 81–90.
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H.-L., Sigvart-Mattila, P. & Mättö, J. (2006) Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, **16**, 1477–1482.
- Sachdeva, S. & Buchheim, W. (1997) Recovery of phospholipids from buttermilk using membrane processing. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, **49**, 47–68.
- Sadek, C., Li, H., Schuck, P., Fallourd, Y., Pradeau, N., Floch-Fouéré, C.L. & Jeantet, R. (2014) To What Extent Do Whey and Casein Micelle Proteins Influence the Morphology and Properties of the Resulting Powder? *Drying Technology*, **32**, 1540–1551.
- Sánchez, B., Ruiz, L., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P. & Margolles, A. (2012) Toward improving technological and functional properties of probiotics in foods. *Trends in Food Science & Technology*, **26**, 56–63.
- Sánchez-Juanes, F., Alonso, J.M., Zancada, L. & Hueso, P. (2009) Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*, **19**, 273–278.
- Sanders, M.E. & Marco, M.L. (2010) Food formats for effective delivery of probiotics. *Annual Review of Food Science and Technology*, **1**, 65–85.
- Sando, L., Pearson, R., Gray, C., Parker, P., Hawken, R., Thomson, P.C., Meadows, J.R.S., Kongsuwan, K., Smith, S. & Tellam, R.L. (2009) Bovine Muc1 is a highly polymorphic

Références

- gene encoding an extensively glycosylated mucin that binds bacteria. *Journal of Dairy Science*, **92**, 5276–5291.
- Sarao, L.K. & Arora, M. (2017) Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **57**, 344–371.
- Schell, D. & Beermann, C. (2014) Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival. *Food Research International*, **62**, 308–314.
- Schmidt, D.G. (1982) Association of caseins and casein micelle structure. *Developments in dairy chemistry*.
- Schuck, P., Jeantet, R. & Dolivet, A. (2012a) *Analytical Methods for Food and Dairy Powders*. P. in.: John Wiley & Sons, 253 pp.
- Schuck, P., Dolivet, A. & Jeantet, R. (2012b) *Les poudres laitières et alimentaires : Techniques d'analyse*. P. in.: Lavoisier Editions, 224 p. pp.
- Segers, M.E. & Lebeer, S. (2014) Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. *Microb Cell Fact*, **13 Suppl 1**, S7.
- Shah, N.P. (2000) Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, **83**, 894–907.
- Shah, N.P., Lankaputhra, W.E.V., Britz, M.L. & Kyle, W.S.A. (1995) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, **5**, 515–521.
- Sharma, A., Jana, A.H. & Chavan, R.S. (2012) Functionality of Milk Powders and Milk-Based Powders for End Use Applications—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **11**, 518–528.
- Shimizu, M., Yamauchi, K. & Kanno, C. (Tokyo U. (Japan) D. of A.C. (1980) Effect of proteolic of milk fat globule membrane proteins on stability of the globules. *Milchwissenschaft (Germany, F.R.)*.
- Singh, H. (2006) The milk fat globule membrane—A biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **11**, 154–163.
- Singh, H., Ye, A. & Ferrua, M.J. (2015) Aspects of food structures in the digestive tract. *Current Opinion in Food Science*, **3**, 85–93. Sensory Sciences and Consumer Perception • Food Physics and Material Science.
- Smoczyński, M., Staniewski, B. & Kielczewska, K. (2012) Composition and Structure of the Bovine Milk Fat Globule Membrane—Some Nutritional and Technological Implications. *Food Reviews International*, **28**, 188–202.

- Spitsberg, V.L. & Gorewit, R.C. (2002) Isolation, Purification and Characterization of Fatty-Acid-Binding Protein from Milk Fat Globule Membrane: Effect of Bovine Growth Hormone Treatment. *Pakistan Journal of Nutrition*.
- Stefflerl, A., Schubart, A., Storch², M., Amini, A., Mather, I., Lassmann, H. & Linington, C. (2000) Butyrophilin, a milk protein, modulates the encephalitogenic T cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **165**, 2859–2865.
- 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.
- Tavares, G.M., Croguennec, T., Carvalho, A.F. & Bouhallab, S. (2014) Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. *Trends in Food Science & Technology*, **37**, 5–20.
- Thompson, A.K. & Singh, H. (2006) Preparation of Liposomes from Milk Fat Globule Membrane Phospholipids Using a Microfluidizer. *Journal of Dairy Science*, **89**, 410–419.
- Thompson, A.K., Haisman, D. & Singh, H. (2006) Physical stability of liposomes prepared from milk fat globule membrane and soya phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 6390–6397.
- Thompson, A.K., Couchoud, A. & Singh, H. (2009) Comparison of hydrophobic and hydrophilic encapsulation using liposomes prepared from milk fat globule-derived phospholipids and soya phospholipids. *Dairy Science & Technology*, **89**, 99–113.
- Thuenemann, E.C. (2015) Dynamic Digestion Models: General Introduction. Pp. 33–36 in: *The Impact of Food Bioactives on Health* (K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka & H. Wichers, editors). Springer International Publishing.
- Timby, N., Lönnerdal, B., Hernell, O. & Domellöf, M. (2014a) Cardiovascular risk markers until 12 mo of age in infants fed a formula supplemented with bovine milk fat globule membranes. *Pediatric Research*, **76**, 394–400.
- Timby, N., Domellöf, E., Hernell, O., Lönnerdal, B. & Domellöf, M. (2014b) Neurodevelopment, nutrition, and growth until 12 mo of age in infants fed a low-energy, low-protein formula supplemented with bovine milk fat globule membranes: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **99**, 860–868.
- Timby, N., Hernell, O., Vaarala, O., Melin, M., Lönnerdal, B. & Domellöf, M. (2015) Infections in Infants Fed Formula Supplemented With Bovine M...: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*.

Références

- Tripathi, M.K. & Giri, S.K. (2014) Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, **9**, 225–241.
- Tripathi, P., Dupres, V., Beaussart, A., Lebeer, S., Claes, I.J.J., Vanderleyden, J. & Dufrene, Y.F. (2012a) Deciphering the Nanometer-Scale Organization and Assembly of *Lactobacillus rhamnosus* GG Pili Using Atomic Force Microscopy. *Langmuir*, **28**, 2211–2216.
- Tripathi, P., Beaussart, A., Andre, G., Rolain, T., Lebeer, S., Vanderleyden, J., Hols, P. & Dufrene, Y.F. (2012b) Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria. *Micron*, **43**, 1323–1330.
- Tripathi, P., Beaussart, A., Alsteens, D., Dupres, V., Claes, I., von Ossowski, I., de Vos, W.M., Palva, A., Lebeer, S., Vanderleyden, J. & Dufrene, Y.F. (2013) Adhesion and Nanomechanics of Pili from the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *ACS Nano*, **7**, 3685–3697.
- Tunick, M.H., Mackey, K.L., Shieh, J.J., Smith, P.W., Cooke, P. & Malin, E.L. (1993) Rheology and microstructure of low-fat Mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, **3**, 649–662.
- Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C. & Salminen, S.J. (2000) Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *International Journal of Food Microbiology*, 75–81.
- Tytgat, H.L.P., Douillard, F.P., Reunanen, J., Rasinkangas, P., Hendrickx, A.P.A., Laine, P.K., Paulin, L., Satokari, R. & de Vos, W.M. (2016a) *Lactobacillus rhamnosus* GG Outcompetes *Enterococcus faecium* via Mucus-Binding Pili: Evidence for a Novel and Heterospecific Probiotic Mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, **82**, 5756–5762.
- Tytgat, H.L.P., van Teijlingen, N.H., Sullan, R.M.A., Douillard, F.P., Rasinkangas, P., Messing, M., Reunanen, J., Satokari, R., Vanderleyden, J., Dufrene, Y.F., Geijtenbeek, T.B.H., de Vos, W.M. & Lebeer, S. (2016b) Probiotic Gut Microbiota Isolate Interacts with Dendritic Cells via Glycosylated Heterotrimeric Pili. *PloS One*, **11**, e0151824.
- Van Bokhorst-van de Veen, H., Swam, I. van, Wels, M., Bron, P.A. & Kleerebezem, M. (2012) Congruent Strain Specific Intestinal Persistence of *Lactobacillus plantarum* in an Intestine-Mimicking In Vitro System and in Human Volunteers. *PLOS ONE*, **7**, e44588.
- Vandamme, T., Poncelet, D. & Subra-Paternault, P. (2007) *Microencapsulation : des sciences aux technologies*. P. in.: Lavoisier, 379 pp.
- Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C. & Blecker, C. (2010) Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *BASE*, **14**, 485–500.
- Vargas García, C.E., Petrova, M., Claes, I.J.J., De Boeck, I., Verhoeven, T.L.A., Dilissen, E., von Ossowski, I., Palva, A., Bullens, D.M., Vanderleyden, J. & Lebeer, S. (2015) Piliation of *Lactobacillus rhamnosus* GG promotes adhesion, phagocytosis, and cytokine modulation in macrophages. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**, 2050–2062.

- Vasbinder, A.J., Rollema, H.S. & de Kruif, C.G. (2003) Impaired rennetability of heated milk; study of enzymatic hydrolysis and gelation kinetics. *Journal of Dairy Science*, **86**, 1548–1555.
- Vesterlund, S., Salminen, K. & Salminen, S. (2012) Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *International Journal of Food Microbiology*, **157**, 319–321.
- Vojdani, A., Campbell, A.W., Anyanwu, E., Kashanian, A., Bock, K. & Vojdani, E. (2002) Antibodies to neuron-specific antigens in children with autism: possible cross-reaction with encephalitogenic proteins from milk, *Chlamydia pneumoniae* and *Streptococcus* group A. *Journal of Neuroimmunology*, **129**, 168–177.
- de Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M. & Sikkema, J. (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, **20**, 292–302. US/Ireland Functional Foods Conference Dietary Optimization of Gut Function and the Microbiota.
- Walstra, P. (1990) On the Stability of Casein Micelles¹. *Journal of Dairy Science*, **73**, 1965–1979.
- Wan, L.Y.M., Chen, Z.J., Shah, N.P. & El-Nezami, H. (2016) Modulation of Intestinal Epithelial Defense Responses by Probiotic Bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **56**, 2628–2641.
- Watanabe, M., Kinoshita, H., Huang, I.-N., Eguchi, K., Tsurumi, T., Kawai, Y., Kitazawa, H., Kimura, K., Taketomo, N., Kikuchi, D., Sase, T., Miura, K., Ogawa, H., Shibata, C., Horii, A. & Saito, T. (2012) An Adhesin-Like Protein, Lam29, from *Lactobacillus mucosae* ME-340 Binds to Histone H3 and Blood Group Antigens in Human Colonic Mucus. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **76**, 1655–1660.
- Würth, R., Hörmannspurger, G., Wilke, J., Foerst, P., Haller, D. & Kulozik, U. (2015) Protective effect of milk protein based microencapsulation on bacterial survival in simulated gastric juice versus the murine gastrointestinal system. *Journal of Functional Foods*, **15**, 116–125.
- Ye, A., Singh, H., Taylor, M.W. & Anema, S. (2002) Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*, **12**, 393–402. Papers from the Australia - New Zealand Milk Proteins Workshop, 2001.
- Ye, A., Cui, J., Dalgleish, D. & Singh, H. (2016) Formation of a structured clot during the gastric digestion of milk: Impact on the rate of protein hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, **52**, 478–486.
- Ying, D.Y., Phoon, M.C., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Burgar, I. & Augustin, M.A. (2010) Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. *Journal of Food Science*, **75**, E588–E595.

Références

- Zavaleta, N., Kvistgaard, A.S., Graverholt, G., Respicio, G., Guija, H., Valencia, N. & Lönnerdal, B. (2011) Efficacy of an MFGM-enriched complementary food in diarrhea, anemia, and micronutrient status in infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **53**, 561–568.
- Zhang, W. & Zhang, X. (2003) Single molecule mechanochemistry of macromolecules. *Progress in Polymer Science*, **28**, 1271–1295.
- Zuidam, N.J. & Shimoni, E. (2010) Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. Pp. 3–29 in: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (N.J. Zuidam & V. Nedovic, editors). Springer New York.

Résumé

Ce travail de thèse a permis d'étudier l'influence de l'ajout d'ingrédients fonctionnels laitiers sur l'encapsulation de *L. rhamnosus* GG (LGG). Deux ingrédients laitiers (β -lactoglobuline et membrane des globules gras du lait - MFGM) ont été identifiés comme étant capables d'adhérer fortement à LGG par l'intermédiaire de ses pili. Le rôle clé de ces adhésions dans la localisation spatiale des bactéries dans la matrice laitière a été mis en évidence, ainsi que le rôle des constituants de la matrice dans sa structuration. Cela a permis de sélectionner, *in vitro*, une matrice d'encapsulation capable de protéger de manière efficace les bactéries des conditions gastriques et de libérer les bactéries vivantes au niveau de l'intestin. En parallèle, la MFGM dans l'encapsulation des bactéries s'est révélée prometteuse. Ce travail a également démontré l'importance primordiale du choix de la matrice d'encapsulation. En effet, une compétition entre l'adhésion de LGG aux cellules intestinales et l'adhésion de LGG à certains composants de la matrice laitière a été démontrée. Les deux phénomènes impliquent probablement les mêmes mécanismes : adhésion aux pili glycosylés de LGG. Pour terminer, un procédé de séchage par atomisation a été développé pour encapsuler LGG. Il permet une bonne survie des bactéries après séchage et la production de microparticules présentant des propriétés fonctionnelles innovantes liées à la température du milieu de réhydratation.

Mots clés : *L. rhamnosus* GG, protéines laitières, MFGM, interaction, AFM, encapsulation.

Abstract

The aim of this work was to understand how functional dairy components influence *L. rhamnosus* GG (LGG) encapsulation. First, two dairy components (β -lactoglobulin and milk fat globule membrane - MFGM) able to strongly adhere to LGG through their pili are identified. The key role of these adhesions on bacteria spatial location in the matrix is highlighted, as well as the role of matrix dairy components in their structuration. This allowed to select, *in vitro*, a matrix able to protect bacteria in gastric conditions and to release them viable in the intestine. Simultaneously, the use of MFGM in bacteria encapsulation has proven to be promising. This work demonstrated the importance of the matrix choice in the encapsulation procedure. Results demonstrated that adhesion between LGG and dairy matrix may compete with adhesion of LGG to epithelial intestinal cell. The two phenomena likely involve the same mechanisms: adhesion to glycosylated pili of LGG. To finish, a spray drying encapsulation process is developed to encapsulate bacteria. It leads to a high bacteria survival after drying and the production of microparticles with innovative properties depending on rehydration temperature.

Keywords: *L. rhamnosus* GG, milk proteins, MFGM, interaction, AFM, encapsulation.