



Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz

Bruno Ebel

► To cite this version:

Bruno Ebel. Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz. Autre. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS069 . tel-00967552

HAL Id: tel-00967552

<https://theses.hal.science/tel-00967552>

Submitted on 29 Mar 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Institut
national
supérieur
des sciences agronomiques
de l'alimentation et de l'environnement



Université de Bourgogne – AgroSup Dijon

Ecole Doctorale Environnement - Santé

THESE

Pour obtenir le titre de **Docteur de l'Université de Bourgogne**

Discipline : Sciences de l'Alimentation - Spécialité : Microbiologie

Par Bruno EBEL

Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz.

Soutenue le 28 Septembre 2012

Devant la commission d'examen :

Pr. M. FICK	Université de Lorraine	Rapporteur
Pr. P. SCHMITT	Université d'Avignon	Rapporteur
Pr. R. CACHON	AgroSup, Dijon	Directeur de thèse
Pr. P. GERVAIS	AgroSup, Dijon	Co-directeur de thèse
Pr. M.C. CHAGNON	AgroSup, Dijon	Examineur
Dr. C. GRANGETTE	Institut Pasteur, Lille	Examineur
Mme P. RAMOS	Senoble, Jouy	Invité
M. P. MOLIMARD	Merck MF, Dijon	Invité



Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé à l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, au sein de l'équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, à la Plateforme de Pré-développement en Biotechnologies (PPB), sous la direction du Professeur Rémy Cachon et du Professeur Patrick Gervais.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Schmitt et le Professeur Fick d'avoir accepté la lourde tâche d'être mes rapporteurs de thèse. Je remercie également le Professeur Marie-Christine Chagnon, le Docteur Corinne Grangette ainsi que Patricia Ramos et Pascal Molimard d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Patrick Gervais, directeur de l'UMR PAM, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse. Merci plus particulièrement pour avoir encadré mon travail, pour votre disponibilité et pour tous vos précieux conseils.

Je remercie tout particulièrement le Professeur Rémy Cachon. Merci d'avoir accepté d'encadrer mon travail, pour toutes nos discussions et tous tes précieux conseils sur ce travail. Merci également pour ta sympathie, ta disponibilité et ta gentillesse.

Merci au groupe Senoble, au Fond Unique Interministériel et à l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie pour le financement de cette thèse.

Je tiens également à remercier Marion Pillault et Patrick Falconnier du groupe Senoble. Je remercie plus particulièrement Patricia Ramos, Responsable Scientifique Senoble, pour son encadrement, sa gentillesse, ses commentaires et ses précieux conseils sur ce travail.

Merci à Stéphanie Courau et à Pascal Molimard du groupe Merck MF pour vos conseils lors des réunions de projet FUI.

Je remercie aussi tous les chercheurs extérieurs au laboratoire avec lesquels j'ai collaboré, de près ou de loin, au cours de cette thèse :

- Marie-Christine Chagnon, Isabelle Severin et Coralie Dumont (Equipe de Toxicologie Alimentaire, AgroSup Dijon) : merci de m'avoir formé à la culture cellulaire et notamment aux tests des comètes, merci d'avoir accepté mes bactéries dans votre laboratoire, merci pour vos précieux conseils.
- Philippe Langella, Luis Bermudez et Jean-Marc Chatel (INRA MICALIS) : merci pour vos conseils, votre disponibilité et votre regard sur mon travail. Je remercie également mes collègues de Jouy-en-Josas, Noura et Florian, pour leur aide précieuse et leur gentillesse.
- Stéphane Grégoire : merci pour ton aide précieuse sur l'analyse des lipides.

Merci à mes stagiaires, Adil et Charline avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Cette thèse est aussi leur travail et je les en remercie profondément.

Merci également aux personnels de la PPB, plus particulièrement Joëlle De Coninck et Alain Durand. Joëlle, merci pour ta gentillesse, pour nos discussions sur le redox, pour ta disponibilité et pour tes précieux conseils. Alain, un grand merci de m'avoir accueilli comme tu l'as fait à la PPB, pour tous tes conseils (et pas qu'en matière de sciences, grâce à toi j'ai découvert nombreuses bonnes tables bourguignonnes) et ton extrême gentillesse. Je n'oublie pas de remercier Anne-Laure, Aurélie, Benjamin, Guillaume, Romain, Samira et Stéphanie de la PPB. Merci pour votre aide, votre communication et pour l'ambiance sympathique que vous avez su créer. Un merci tout particulier à la « Redox Team », Célia, Charline, Damien et Florence. Pour votre collaboration mais surtout pour m'avoir accueilli dans votre bureau de temps à autre pour discuter d'autres choses que de sciences, merci à vous. J'ai également une pensée pour Mathieu.

Je tiens également à adresser un grand remerciement à tout le personnel de l'équipe PMB comprenant l'ensemble des maîtres de conférences et professeurs. En particulier, merci à Eric, Jean-Marie et Stéphane. Je n'oublie bien évidemment pas Sylvie pour sa disponibilité et sa gentillesse. Laurent, je te remercie pour m'avoir initié au monde de la recherche il y a de cela quelques années maintenant. Merci pour ta gentillesse, tes précieux conseils et tes encouragements tout au long de ces années.

Je remercie également Emmanuelle, Hélène et Christine pour leur disponibilité, leur gentillesse et pour leur prise en charge efficace de toutes les tâches administratives.

Merci également à mes collègues de l'équipe PMB et notamment Cyril, Hue, Julia, Yann, et Marcia. Comment ne pas remercier Alain, Alexandre, Guillaume et Sébastien pour tous les moments passés ensemble au laboratoire, mais également hors laboratoire.

Je tiens à remercier ma famille et tout particulièrement mes parents pour m'avoir continuellement soutenu et m'avoir laissé le choix de faire ce qui me plaisait.

Enfin, mes remerciements vont bien entendu à Pauline qui m'a accompagnée tout au long de cette aventure. Merci pour ta présence et ton soutien au quotidien. Ces trois années (et quelques mois) de thèse n'auraient pas été pareilles sans toi. Bon courage pour ta thèse, tu tiens le bon bout !

En espérant n'avoir oublié personne.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	2
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	9
1. Les Bactéries Probiotiques.....	9
1.1. Historique et définition.....	9
1.2. L'écosystème gastro-intestinal	10
1.2.1. Anatomie du système digestif.....	10
1.2.2. Description générale du système digestif	10
1.2.3. Implantation du microbiote intestinal	11
1.2.4. Le microbiote intestinal	14
1.2.5. Interaction entre l'hôte et son microbiote	16
1.3. Allégation santé des bactéries probiotiques	18
1.4. Pouvoir antioxydant et antimutagène des bactéries probiotiques	19
1.4.1. Définition du stress oxydant	19
1.4.2. Mesure du pouvoir antioxydant	23
1.4.3. Effets santé des probiotiques sur le stress oxydant.....	26
1.5. Les bifidobactéries comme bactéries probiotiques.....	31
1.5.1. Définitions et caractéristiques générales des bifidobactéries.....	31
1.5.2. Morphologie et physiologie des bifidobactéries	33
1.5.3. Métabolisme	33
1.6. Critères de sélection des souches probiotiques.....	35
2. Bifidobactéries et Tolérance aux Stress	38
2.1. Tolérance au stress acide	38
2.1.1. Physiologie du pH	38
2.1.2. Réponse ATR des bifidobactéries	39
2.1.3. Résistance au stress acide	40
2.2. Tolérance au stress biliaire	42
2.2.1. Physiologie de la bile.....	42
2.2.2. Activité antimicrobienne de la bile.....	44
2.2.3. Aspects moléculaires de la réponse au stress biliaire	45
2.3. Tolérance au stress oxydant	47
2.3.1. Effet de l'oxygène et des ROS sur les bactéries probiotiques	47
2.3.2. Réponse des bactéries probiotiques au stress oxydant.....	48
2.3.3. Cas particulier des bifidobactéries.....	52
2.3.4. Implication des thiols exofaciaux dans la défense anti-radicalaire.....	53
3. Le Potentiel Redox.....	57
3.1. Oxydoréduction et système biologique	57
3.1.1. Définition et mesure	57
3.1.2. Impact du E_h sur la physiologie microbienne	66

3.1.3.	Impact de la cellule microbienne sur le E_h	68
3.2.	Le E_h dans les produits agro-alimentaires	69
3.2.1.	Utilisation du E_h en IAA.....	69
3.2.2.	Intérêt des gaz en IAA	71
3.2.3.	Modulation du E_h dans les produits laitiers	72
3.2.4.	Impact du E_h sur la qualité des produits laitiers fermentés	78
4.	Conservation et Intégration des Bifidobactéries dans un Produit Laitier.....	82
4.1.	Micro-encapsulation.....	83
4.2.	Emballage actif.....	83
4.3.	Méthodes physiques	84
4.4.	Ajout de molécules actives.....	84
4.5.	Activité microbienne	85
4.6.	Electroréduction	86
4.7.	Utilisation des gaz	86
CONCLUSION ET AXES DE LA THESE.....		88
MATERIEL & METHODES.....		92
1.	Matériel Biologique	92
1.1.	Souches bactériennes et techniques d'ensemencement	92
1.1.1.	Souches utilisées pour le crible probiotique	92
1.1.2.	Souche utilisée pour les expériences sous redox modifié et méthode de culture.....	93
1.2.	Culture dans des tubes de Hungate.....	93
1.3.	Culture en flacons Schott modifiés.....	94
1.4.	Dénombrement en milieu gélosé	95
2.	Fabrication des Laits Fermentés	95
3.	Caractérisation des Capacités Réductrices de <i>B. bifidum</i>	96
3.1.	Mesure du pH et du E_h	96
3.2.	Mesure de l'oxygène dissous	96
3.3.	Acquisition des données.....	97
3.4.	Suivi des paramètres cinétiques	98
3.5.	Filtration et ajout de NEM.....	98
4.	Effet des Ambiances Gazeuses de Culture sur les Propriétés Redox de <i>B. bifidum</i>	99
4.1.	Quantification des groupements thiols	99
4.1.1.	Observation microscopique des groupements thiols exofaciaux	99
4.1.2.	Dosage des groupements thiols exofaciaux et totaux	100
4.2.	Mesure du pouvoir réducteur par l'utilisation de sels de tétrazolium.....	101
4.3.	Mesure de la résistance à un stress oxydant	102
5.	Analyse des Acides Gras et des Propriétés de Surface	102
5.1.	Analyses des acides gras	102
5.1.1.	Extraction des lipides et préparations des esters méthyliques d'acides gras.....	102
5.1.2.	Analyse en chromatographie gazeuse des esters méthyliques d'acides gras	103

5.2.	Analyse de la fluidité membranaire.....	103
5.3.	Adhésion aux solvants.....	104
5.4.	Mesure de l'auto-agrégation.....	105
5.5.	Adhésion aux cellules épithéliales	105
5.5.1.	Culture cellulaire	105
5.5.2.	Adhésion <i>in vitro</i> aux cellules Caco-2.....	105
6.	Application des Stress Représentatif du Procédé de Fabrication et du Tractus Gastro-Intestinal.....	106
6.1.	Application des stress représentatifs du tractus gastro-intestinal	106
6.2.	Applications des stress représentatifs du procédé	107
6.3.	Protocole de marquage	107
6.4.	Analyse en cytométrie en flux.....	108
7.	Mesure de la Fonctionnalité.....	109
7.1.	Mesure des activités SOD et catalase.....	109
7.2.	Mesure du TAA.....	109
7.3.	Mesure du potentiel anti-radicalaire global.....	110
7.4.	Mesure du pouvoir anti-mutagène.....	110
7.4.1.	Co-incubation avec le 4NQO	110
7.4.2.	Test des comètes.....	111
8.	Traitement Statistique des Données.....	113
	RESULTATS.....	116
1.	Mise en Place d'un Crible Permettant de Sélectionner des Bactéries Probiotiques Résistantes et Fonctionnelles	116
1.1.	Screening viabilité - vitalité	116
1.1.1.	Simulation du passage dans l'estomac	118
1.1.2.	Simulation du passage dans le côlon	119
1.1.3.	Effet des sels biliaires.....	120
1.1.4.	Effet d'un cycle congélation / décongélation	120
1.1.5.	Effet d'un stress oxydant	121
1.2.	Screening du pouvoir antioxydant.....	124
1.2.1.	Dosages biochimiques de l'activité antioxydante des bactéries	124
1.2.2.	Mesure de l'activité antioxydante des bactéries sur cellules animales ou humaines	126
2.	Effet du Potentiel Redox sur la Viabilité de <i>B. bifidum</i> dans un Produit Laitier Fermenté.....	131
2.1.	Paramètres cinétiques de <i>B. bifidum</i> et impact de son intégration dans un produit laitier fermenté	131
2.1.1.	Paramètres cinétiques de <i>B. bifidum</i>	131
2.1.2.	Intégration de <i>B. bifidum</i> dans un produit laitier fermenté	135
2.2.	Impact des gaz sur la survie de <i>B. bifidum</i>	138
2.2.1.	Evolution du E _{h7}	138
2.2.2.	Evolution du pH	139
2.2.3.	Survie des bactéries lactiques dans les laits fermentés	140

2.2.4.	Effet du conditionnement redox sur la résistance de <i>B. bifidum</i> aux stress	143
3.	Effet de l'Environnement Redox sur les Propriétés de <i>B. bifidum</i>	146
3.1.	Effet des gaz sur la fonctionnalité de <i>B. bifidum</i>	146
3.1.1.	Propriété de surface et adhésion cellulaire	146
3.1.2.	Pouvoir réducteur	148
3.1.3.	Pouvoir antioxydant.....	150
3.1.4.	Pouvoir antimutagène	152
3.2.	Impact des gaz sur la structure cellulaire de <i>B. bifidum</i>	155
3.2.1.	Composition lipidique	155
3.2.2.	Thiols exofaciaux	157
	DISCUSSION GENERALE	164
	CONCLUSION – PERSPECTIVES	181
	BIBLIOGRAPHIE	186

Liste des symboles et des abréviations

4NQO	4-nitroquinoline-N-oxide
8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxy-guanosine
α	Coefficient de Nernst
AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropane)
ABTS	sel d'ammonium de l'acide 2,2' azinobis (3 éthylbenzothiazoline 6 sulfonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ahp	Alkyl hydroxypéroxyde reductase
ANOVA	Analyse de la variance
ATCC	American type culture collection
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Acid tolerance response
BCAA	Branched-chain amino acids
BSH	Bile salt hydrolase
BT	Blue tetrazolium
cFDA	Carboxyfluoresceine diacétate
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CO ₂	Dioxyde de carbone
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DO	Densité Optique
Δp	Force proton-motrice
DTNB	5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid
DTT	Dithiothréitol
E^0 ou E_h^0	Potentiel redox standard dans les conditions normales à pH 7 (V)
E^0 ou E_h^0	Potentiel redox standard dans les conditions normales (V)
EFSA	European Food Safety Authority – Autorité européenne de sécurité des aliments
E_h	Potentiel d'oxydoréduction (V)
E_{h7}	Potentiel d'oxydoréduction à pH 7 (V)
E_m	Potentiel redox mesuré par rapport à l'électrode de référence (V)
E_r	Potentiel de l'électrode de référence exprimé par rapport à l'électrode à hydrogène (V)
F	Constante de Faraday (C/mol)
F6PPK	Fructose-6-phosphate phosphoketolase
FAO	Food and Agriculture Organization – Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
FIAF	Fasting induced adipocyte factor
FpG	Formamidopyrimidine DNA-glycosylase
FRAP	Ferric reducing antioxidant potential
Gela-TV	Milieu Gélosé à base de lait entier UHT et TV

GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H ₂	Hydrogène
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HO°	Radical hydroxyle
HT50	temps de demi-hémolyse
ICR	Indicateur coloré redox
IP	Iodure de propidium
L°	Lipide radicalaire
LDL	Lipoprotéine
LH	Lipide insaturé
LMP	Low melting point
LOO°	Lipide radicalaire peroxydé
M17	Milieu liquide Streptocoques
MAP	Modified atmosphere packaging
MATS	Microbial adhesion to solvent
MDA	Malondialdéhyde
mMRS	Man, Rogosa, Sharpe + cystéine
MMS	Méthanesulfonate de méthyle
MRS	Man, Rogosa, Sharpe
MTT	3-(4',5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,4-diphenyltetrazolium bromide
N ₂	Azote
NAC	N-acetyl-1-cysteine
NEM	N-ethylmaleimide
NMP	Normal melting point
NO	Oxyde nitrique
O ₂	Oxgène
O ₂ ° ⁻	Anion superoxyde
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONU	Organisation des Nations Unies
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCOOH	Phosphatidylcholine hydroperoxyde
PET	Polyéthylène téréphtalate
pH	Potentiel hydrogène
R	Constante des gaz parfaits
R°	Espèce radicalaire
ROS	Reactive oxygen species – dérivés actifs de l'oxygène
SCGE	Single cell gel electrophoresis

SNK	Student-Newman-Keuls
SOD	Superoxyde dismutase
ST	Milieu gélosé Streptocoques
SVF	Serum de veau foetal
T	Température absolue (K)
TAA	Total antioxydant activity
TAC	Total antioxydant capacity
TAS	Total antioxydant statut
TEAC	Trolox-equivalent antioxidant capacity
T _{gel}	Temps mis pour atteindre pH 4,7
TGI	Tractus gastro-intestinal
TNB ⁻	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
TRAP	Total reactive antioxidant potential
Trx	Thioredoxine
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
TV	Tétrazolium violet
UFC	Unité formant colonies

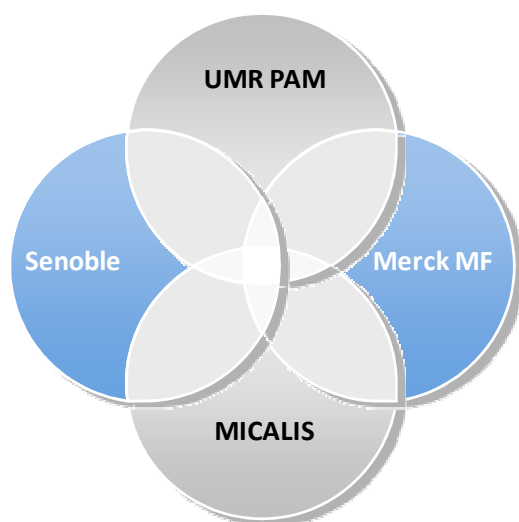
INTRODUCTION

AVANT PROPOS

Cette thèse fait partie d'un projet « Probiotique » visant à la production de nouvelles générations de produits alimentaires (lait fermenté ou complément alimentaire) contenant des bactéries probiotiques ayant des effets d'immunomodulation et/ou antioxydants.

Le projet Probiotique implique deux partenaires académiques (l'équipe PMB de l'UMR PAM d'AgroSup Dijon / Université de Bourgogne et l'équipe ProbiHôte de l'Institut MICALIS de l'INRA de Jouy-en-Josas) et deux partenaires industriels (Senoble et Merck Médication Familiale). Ce projet a été déposé par le pôle de compétitivité VITAGORA et a été financé par le Fond Unique Interministériel (FUI).

Ce projet a financé deux thèses CIFRE, une thèse académique et un poste d'ingénieur de recherche sur une durée de 36 mois. La liste des participants au projet est présentée dans le diagramme ci-dessous.



UMR PAM
Gervais Patrick – Cachon Rémy – Beney Laurent Ebel Bruno – Lemetais Guillaume
Senoble
Falconnier Patrick – Ramos Patricia – Pillault Marion
MICALIS
Langella Philippe – Bermudez Luis – Chatel Jean Marc Chain Florian – Kechaou Noura
Merck MF
Courau Stéphanie – Molimard Pascal

INTRODUCTION

Les produits laitiers fermentés sont connus pour être de bons vecteurs de probiotiques notamment en raison de leur large consommation. Il a ainsi été suggéré que la prise quotidienne de probiotiques doit être comprise entre 10^8 et 10^9 unités formant colonie (UFC) pour avoir un effet. Cependant, des études conduites sur plusieurs produits laitiers provenant du commerce montrent une perte de viabilité des probiotiques au moment de leur consommation. Pour mettre au point des produits laitiers probiotiques aux effets démontrés chez l'homme garantissant aux consommateurs une satisfaction totale en terme de bénéfices santé, d'innocuité, de qualité et de praticité d'utilisation, il est donc indispensable de conserver voire de renforcer la viabilité et la fonctionnalité des souches durant toutes les étapes de fabrication et de stockage des produits. Hors, les procédés de préparation et de fabrication perturbent significativement la fonction probiotique et donc l'efficacité des produits finis commercialisés.

D'un point de vue technologique et afin d'être considérées comme de potentiels probiotiques, les souches sélectionnées doivent montrer une capacité à survivre dans des milieux à forte concentration en bile et en oxygène et à faibles valeurs de pH, à détenir des propriétés particulières de colonisation *in vitro*, et à être capables d'interagir avec l'hôte. Or les microorganismes probiotiques subissent des perturbations importantes durant le procédé de fabrication (décongélation, fermentation, stockage) et durant le transit gastro-intestinal (pH, bile, fluctuation de l'environnement redox). Ces étapes peuvent avoir un impact sur la fonctionnalité et l'état physiologique des probiotiques. L'état actuel des connaissances ne permet pas de connaître précisément l'impact réel de toutes les altérations subies par les probiotiques ainsi que les mécanismes de réponse des bactéries soumises à ces différents types de perturbations.

Afin de renforcer la viabilité et donc la fonctionnalité des souches probiotiques, de nombreuses stratégies ont été mises en place pour protéger ces bactéries de l'effet délétère de l'oxygène et des dérivés actifs de l'oxygène (ROS ou Reactive Oxygen Species). En effet, ce stress, rencontré tout au long du procédé de production et lors de l'ingestion des probiotiques, est considéré comme étant un paramètre majeur dans la survie de ces microorganismes. Ainsi, l'utilisation de molécules chimiques (cystéine ou vitamine C), des traitements préalables du

lait (électroréduction, modification du barème temps/température de la pasteurisation, utilisation de gaz), l'utilisation de souches fortement consommatrices d'oxygène, la micro-encapsulation ou encore l'utilisation de matériaux d'emballage moins perméables à l'oxygène sont le plus souvent cités dans la littérature. Cependant, la plupart de ces techniques ont un effet limité dans le temps, et parfois même un effet négatif sur les qualités organoleptiques du produit fini. L'utilisation de gaz dans le but de modifier le potentiel d'oxydoréduction est quant à elle très peu étudiée bien que n'entraînant aucun impact sur le produit fini.

Le premier objectif de ce travail de thèse est de mettre en place de nouveaux outils permettant de cribler des bactéries probiotiques sur des critères de résistance aux stress mais aussi de fonctionnalité. Le second objectif de ce travail est d'approfondir la compréhension du rôle du potentiel d'oxydoréduction (E_h) sur une bactérie anaérobie stricte, *Bifidobacterium bifidum*, mais également du rôle de *B. bifidum* sur le redox du milieu. La compréhension de ces mécanismes devrait permettre d'améliorer l'efficacité probiotique des souches, d'un point de vue de leur résistance aux stress mais également de leur fonctionnalité. Les cribles mis en places lors de la première partie pourront ainsi servir à montrer l'influence du paramètre E_h sur le caractère probiotique d'une souche.

Ce mémoire de thèse débute par une étude bibliographique qui établit l'état des connaissances sur les bactéries probiotiques. Une brève description du tractus gastro-intestinal et des interactions hôte-bactéries est présentée après avoir donné la définition des probiotiques et de leurs effets santé. Ensuite, la résistance de ces souches, et plus particulièrement des bifidobactéries aux stress acide, biliaire et oxydant est décrite, d'un point de vue physiologique mais également moléculaire. Puis le potentiel d'oxydoréduction en milieu biologique et l'activité réductrice des microorganismes sont abordés. Une définition du potentiel d'oxydoréduction, les méthodes employées pour mesurer ce paramètre en milieu biologique et les différentes méthodes ou facteurs capables de moduler ce dernier sont présentées. Le rôle du potentiel d'oxydoréduction, son impact sur la qualité des produits laitiers fermentés ainsi que l'implication des bactéries lactiques dans la modulation de ce paramètre au cours de la fabrication de ces produits sont également décrits. Enfin, la dernière partie aborde les différentes méthodes pour protéger les bactéries probiotiques dans un produit laitier fermenté.

Le second chapitre du mémoire rassemble les matériels et méthodes utilisés pour exécuter les travaux de recherches.

Le troisième chapitre présente l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. La première partie concerne la mise en place d'un crible de sélection *in vitro* de bactéries probiotiques résistantes et fonctionnelles. La seconde partie présente une méthode pour maintenir la viabilité d'une souche probiotique modèle, *Bifidobacterium bifidum*, dans un produit laitier fermenté. Cette méthode est basée sur la modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz. Enfin, la dernière partie étudie l'effet de la modification du potentiel redox sur la résistance aux stress et sur la fonctionnalité de *B. bifidum* en milieu modèle (MRS) afin de se soustraire de l'effet du milieu et des deux autres souches du yaourt. Les modifications biochimiques du microorganisme induites par le bullage de gaz et permettant d'expliquer la meilleure viabilité de la souche observée au cours du stockage des laits fermentés, ainsi que sa meilleure fonctionnalité sont également abordées dans cette dernière partie.

Enfin, une discussion de l'ensemble des résultats présentés dans ce mémoire fera l'objet du quatrième et dernier chapitre.

Liste des publications et communications

Ce travail a donné lieu à 3 publications acceptées et 2 soumises à publication, un chapitre d'ouvrage, 4 communications orales et 5 communications affichées.

Publications acceptées :

Michelon, D., Abraham, S., Ebel, B., Coninck, J. D., Husson, F., Feron, G., Gervais, P. & Cachon, R. 2010. Contribution of exofacial thiol groups in the reducing activity of *Lactococcus ssp. lactis*. *FEBS Journal*, 277, 2282-2290.

Ebel, B., Martin, F., Le, L. D. T., Gervais, P. & Cachon, R. 2011. Use of gases to improve survival of *Bifidobacterium bifidum* by modifying redox potential in fermented milk. *Journal of Dairy Science*, 94, 2185-2191.

Ebel, B., Lemetais, G., Beney, L., Cachon, R., Sokol, H., Langella, P. & Gervais, P. 2012. Impact of probiotics on risk factors for cardiovascular diseases. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. DOI:10.1080/10408398.2011.579361.

Articles en soumission (journaux internationaux à comité de lecture)

Cachon, R., Ebel, B., Martin, F., Michelon, D., Beuvier, E., Gervais, P. & De Coninck J. Innovative strategies based on redox potential and lactic acid bacteria for improving processes of the food fermentation industry. Soumis à *Trends in Food Science and Technology*.

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

Chapitre d'ouvrage

Martin, F., Ebel, B., Gervais, P., Cayot, N. & Cachon, R. Redox potential: Monitoring, and role in development in development of aroma compounds, rheological properties and survival of oxygen sensitive strains during the manufacture of fermented dairy products. In *Lactic Acid Bacteria*. InTech Publisher. ISBN 980-953-307-278-9.

Communications orales

Ebel, B., Alloneau, C., Ramos, P., Gervais, P. & Cachon, R. Modification de l'environnement redox : impact sur l'intégration de *Bifidobacterium bifidum* dans un produit laitier fermenté. 2011. Forum des Jeunes Chercheurs. Dijon, France.

Ebel, B., Michelon, D., Tachon, S., Deconinck, J., Feron, G., Yvon, M., Gervais, P. & Cachon, R. Méthode rapide de discrimination des bactéries lactiques suivant leurs capacités réductrices. 2012. Club des Bactéries Lactiques. Clermont-Ferrand, France.

Chain, F., Kechaou, N., Ebel, B., Lemetais, G., Beney, L., Cachon, R., Gervais, P., Chatel, J.M., Langella, P. & Bermudez, L.G. Identification de nouvelles souches probiotiques aux effets antioxydants. Club des Bactéries Lactiques. Clermont-Ferrand, France.

Ebel, B., Allonneau, C., Martin, F., Gervais, P. & Cachon, R. Augmentation de la viabilité de *Bifidobacterium bifidum* dans un produit laitier en modifiant le potentiel d'oxydoréduction par les gaz. 2012. Workshop « Interactions des microorganismes avec leurs environnements : circulation, adaptation ». Dijon, France.

Communications affichées (posters)

Ebel, B., Ramos, P., Gervais, P. & Cachon, R. Optimisation de l'intégration d'une bactérie probiotique dans un produit laitier fermenté. 2010. Forum des Jeunes Chercheurs. Besançon, France.

Chain, F., Ebel, B., Kechaou, N., Lemetais, G., Beney, L., Cachon, R., Gervais, P., Chatel, J.M., Langella, P. & Bermudez, L.G. High throughput screening method to isolate novel antioxidant probiotic strains. 2011. Microbiota and Mucosal Immunology: The Interface in Health and Disease. San Francisco, USA.

Ebel, B., Martin, F., Ramos, P., Gervais, P. & Cachon, R. Impact de l'environnement redox sur la survie d'une souche probiotique dans un produit laitier fermenté lors du stockage. 2011. Congrès Vitagora Goût Nutrition Santé. Dijon, France.

Ebel, B., Allonneau, C., Martin, F., Gervais, P. & Cachon, R. Modifying redox potential by gases could improve survival of *Bifidobacterium bifidum* in fermented milk. 2012. Microbial Stress: From Molecules to Systems. Belgirate, Italy.

Ebel, B., Allonneau, C., Martin, F., Gervais, P. & Cachon, R. An innovative process that uses neutral or reducing gas to improve the survival of *Bifidobacterium bifidum* in fermented milk. 2012. International ICFMH Symposium, FoodMicro. Istanbul, Turkey.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les Bactéries Probiotiques

1.1. Historique et définition

La notion de probiotiques a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff en 1907 (Metchnikoff, 1907). Ce prix Nobel suggérait que la bonne santé et la longévité des paysans bulgares étaient dues à leur consommation de produits laitiers fermentés. Pour lui, la consommation de *Lactobacillus* influençait positivement la microflore intestinale, diminuait la « putréfaction » et les activités toxiques microbiennes. Il a ainsi proposé l'ingestion de bactéries lactiques pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie. Le terme probiotique a été introduit pour la première fois par Lilly et Stillwell en 1965 (Lilly and Stillwell, 1965) pour décrire les substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes. En 1991, Fuller redéfinit les probiotiques comme étant des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale (Fuller, 1991). Aujourd'hui, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) (Rapport FAO/OMS, 2002), les probiotiques sont des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte ». Ce sont des acteurs incontournables de développement et d'innovation dans les domaines des industries alimentaires et médicales. Ces microorganismes, généralement des bactéries, influencent la santé humaine et animale et protègent par exemple de certaines infections intestinales, participent à la digestion et influencent le système immunitaire. Leur consommation régulière permet de contribuer à l'action des 600 espèces bactériennes (représentant environ 10^{14} bactéries) présentes dans l'intestin humain où, par exemple, elles participent à la digestion et à la stimulation du système immunitaire. Leur inclusion dans les aliments ou les compléments alimentaires est en constante progression depuis une dizaine d'années. De nombreux aspects du mode d'action et de l'effet de ces microorganismes sur l'être humain ainsi que de leur interaction avec l'aliment sont cependant inconnus à l'heure actuelle et limitent leur utilisation industrielle.

1.2. L'écosystème gastro-intestinal

1.2.1. Anatomie du système digestif

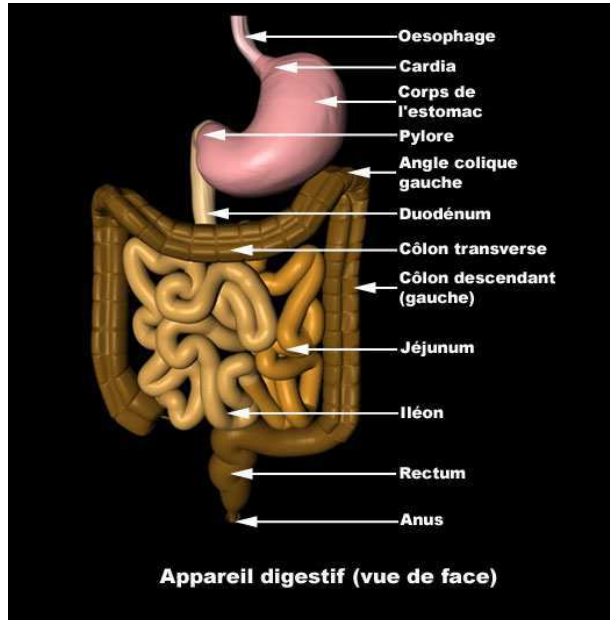
Les éléments constitutifs du tube digestif sont les suivants :

- L'œsophage qui se termine par le cardia
- L'estomac, qui inclut l'antre et le canal du pylore
- Les intestins :
 - L'intestin grêle (6-8 m), comprenant :
 - o Le duodénum
 - o Le jéjunum
 - o L'iléon qui rejoint le cæcum à la jonction iléo-cæcale
 - Le gros intestin ou côlon (1,5 m), constitué de 3 parties :
 - o Le cæcum. L'appendice est un organe rudimentaire, reliquat de l'évolution, attaché au cæcum.
 - o Le côlon qui comprend :
 - Le côlon ascendant
 - Le côlon transversal
 - Le côlon descendant et sigmoïde
 - o Le rectum qui se termine par l'anus.

1.2.2. Description générale du système digestif

Le tractus gastro-intestinal est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes. Sa muqueuse étant estimée à 200-300 m², il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement. L'écosystème gastro-intestinal est généré par une alliance stable entre 1) l'épithélium gastro-intestinal, 2) le système immunitaire et 3) une importante flore microbienne. Si l'un des trois composants de l'écosystème est défaillant, des pathologies peuvent survenir. Les interactions entre les microorganismes et l'hôte peuvent être de trois types : symbiose, commensalisme ou pathogénicité. L'hôte est protégé contre la microflore intestinale pathogène par les barrières chimiques et physiques formées par

l'épithélium gastro-intestinal (Bäckhed *et al.*, 2004; Amrouche, 2005). La Figure 1 montre les principaux compartiments constituant le tractus gastro-intestinal de l'homme.



Œsophage : mucus, péristaltisme. Seuls les microorganismes provenant des aliments ou de la cavité orale sont présents.

Estomac : pH acide ($\text{pH} < 2$), O_2 , enzymes, mucus.

Microflore : 10^4 UFC/g : *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*.

Duodénum : sécrétions pancréatiques et biliaires, mucus, faible O_2 . Microflore : 10^3 - 10^4 UFC/g : *Bacteroides*, *Candida albicans*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*.

Jéjunum : sécrétions pancréatiques et biliaires, mucus, péristaltisme. Microflore : 10^5 - 10^7 UFC/g : *Bacteroides*, *Candida albicans*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*.

Iléon : Anaérobiose, sels biliaires, enzymes. Microflore : 10^7 - 10^8 UFC/g : *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella*.

Colon : Anaérobiose ($E_h = -200$ à -300 mV), motricité, enzymes bactériennes, acides gras volatiles, ammoniacque,... Microflore : 10^{10} - 10^{11} UFC/g : *Bacteroides*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*.

Figure 1 : Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'homme et leurs microflores. D'après (Ouweland and Vesterlund, 2003).

1.2.3. Implantation du microbiote intestinal

Tout contact entre le corps humain et un microorganisme qu'il vienne d'un aliment, de l'environnement, d'un autre humain ou d'animaux, peut en principe conduire à la colonisation. Le fœtus des mammifères évolue *in utero* dans un environnement stérile et la colonisation microbienne débute durant le processus de la naissance. En l'absence des mécanismes immunitaires sophistiqués de l'adulte, le tube digestif du nouveau-né est un environnement particulièrement permissif où les niveaux de population atteignent rapidement 10^{11} bactéries par gramme de selles. La colonisation suit néanmoins un schéma relativement organisé, sous la dépendance de facteurs exogènes (exposition aux microorganismes d'origine maternelle (fécale, vaginale et cutanée) et environnementale, mais aussi l'alimentation et parfois l'antibiothérapie) et endogènes.

Quelques études indiquent que le lait maternel pourrait être le vecteur de microorganismes de la mère vers l'enfant. Ainsi, même collecté aseptiquement, le lait de femme n'est pas stérile (Warner, 2003). Les bactéries qu'il contient peuvent être transmises à l'enfant via l'allaitement. Deux équipes de chercheurs ont étudié l'influence de l'allaitement maternel dans la mise en place de la flore microbienne intestinale du nouveau né (Perez *et al.*, 2007). Elles ont montré que des bactéries ayant pour origine l'intestin de la mère transitent par le lait. La mère transmet donc des éléments qui vont contribuer à la colonisation de l'intestin de son enfant et auront un impact sur la mise en place de son immunité.

Les bactéries anaérobies qui dominent le microbiote intestinal de l'adulte font parties des premiers microbes rencontrés lors d'une naissance par voie basse. Elles ne se développeront cependant en dominance dans l'intestin que lorsque les aérobies strictes et les anaérobies facultatives auront consommé l'oxygène présent. Ce premier relais d'espèces s'opère durant les heures qui suivent la naissance. Des relations antagonistes gouvernent ensuite progressivement le relais d'espèces en dominance conduisant vers l'âge de deux ans à un microbiote stable sur la plan fonctionnel (Figure 2).

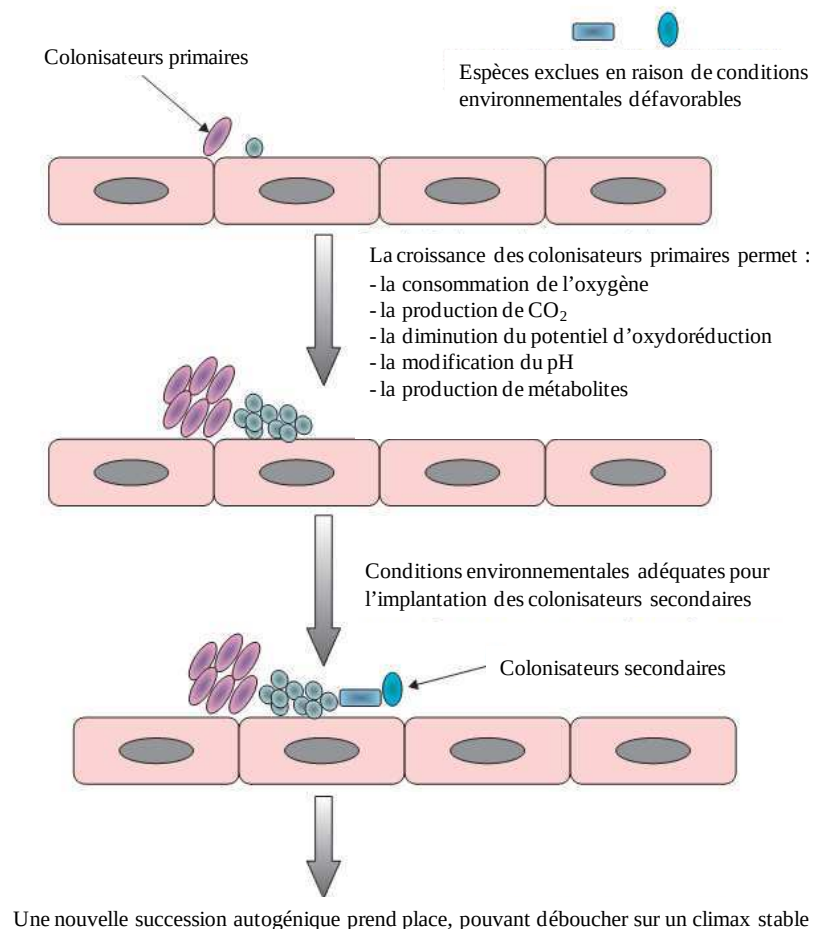


Figure 2 : Implantation du microbiote intestinal. D'après (Wilson, 2008).

Les bactéries anaérobies strictes dominent les bactéries anaérobies facultatives dans le côlon distal et les selles par un facteur 1000 environ. L'hygiène qui entoure la naissance et les premiers moments de la vie conditionne fortement la dynamique de colonisation. Il apparaît aujourd'hui clairement que la colonisation par des espèces commensales habituelles comme *E. coli* est retardée dans des pays industrialisés par rapport au passé (de quelques jours à 6 mois) et par rapport au pays en voie de développement, apparemment du fait des conditions d'hygiène appliquées aujourd'hui (Nowrouzian *et al.*, 2003; Adlerberth *et al.*, 2006). Des bactéries habituellement associées à la peau (*Staphylococcus* spp.) apparaissent alors dans la flore précoce (Lindberg *et al.*, 2004).

Certaines inconnues demeurent cependant dans le domaine de la colonisation :

- Il est très probable que le tube digestif offre une fenêtre de permissivité à la colonisation durant laquelle les microorganismes rencontrés pourraient devenir une composante du microbiote dominant de l'adulte, mais ce concept n'a pas été fermement validé et la durée pendant laquelle l'écosystème resterait permissif reste indéterminée.
- Une étude ayant porté sur trois couples de jumeaux monozygotes a montré qu'à l'âge de 25 ans, ceux-ci avaient un microbiote intestinal similaire (Vaughan *et al.*, 1999). Ceci suggère que le génotype de l'hôte pourrait jouer un rôle déterminant dans la mise en place du microbiote intestinal, mais le poids respectif de l'écologie microbienne et du génotype n'a pas encore été évalué de façon définitive.
- Le lieu de naissance peut de nombreuses façons influencer la colonisation microbienne de l'intestin chez l'enfant. Par exemple, il existe notamment un gradient Nord-Sud tel que le microbiote fécal des enfants à 6 semaines de vie est plus fortement colonisé par *Bifidobacterium* dans les pays du Nord (Suède, Ecosse), alors que le genre *Bacteroides* domine plus précocement une flore plus diversifiée dans les pays du Sud (Italie, Espagne).
- Le sevrage a également un impact majeur sur la dynamique de développement du microbiote intestinal. C'est un moment de perturbation majeure jusqu'à ce que le microbiote s'adapte à la dégradation des fibres alimentaires. L'impact respectif des grands modes de sevrage appliqués sur la planète aujourd'hui n'a pas été exploré de façon systématique.

1.2.4. Le microbiote intestinal

Selon la définition de Isolauri *et al.*, la flore intestinale normale est une collection complexe et en équilibre de microorganismes qui habitent normalement le tractus gastro-intestinal et remplissant un rôle dans la nutrition, la physiologie et le contrôle du système immunitaire de l'hôte (Isolauri *et al.*, 2002). Après une colonisation complète, la microflore intestinale est considérée comme un organe acquis après la naissance. Il est constitué d'une grande diversité d'espèces microbiennes assurant différentes fonctions pour l'hôte. La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée à près de 10^{13} - 10^{14} cellules microbiennes représentant 400 à 600 espèces et sous espèces (Bäckhed *et al.*, 2004). Cette microflore représente environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain. La prévalence des bactéries dans le tractus gastro-intestinal dépend des conditions régnant dans le compartiment du tractus. Deux catégories de bactéries ont été identifiées : les bactéries autochtones ou indigènes se trouvant dans des niches particulières, et les bactéries allochtones ou transitoires (comme les probiotiques) rencontrées dans d'autres habitats du tractus (Bäckhed *et al.*, 2004). La majorité des bactéries pathogènes sont allochtones et vivent normalement en harmonie avec l'hôte, excepté lorsque l'équilibre du système est rompu.

Du point de vue microbiologique, comme le montre la [Figure 1](#), l'environnement gastro-intestinal comprend trois régions principales qui offrent des conditions très différentes pour la survie des différents microorganismes. Dans le premier compartiment, l'estomac, la prolifération microbienne est fortement réduite par la présence d'oxygène apporté par la déglutition (46 mmHg ou 29% de la teneur en oxygène de l'air) ainsi que par la présence d'une forte acidité. De ce fait, l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acidotolérants et anaérobies facultatifs comme les lactobacilles, streptocoques, levures, etc. Dans le deuxième compartiment qui est le petit intestin, la microflore est constituée essentiellement de bactéries anaérobies facultatives tels que les lactobacilles, les streptocoques et les entérobactéries, et anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies. La teneur en oxygène du petit intestin est de 35 mmHg, correspondant à 4.6% d'oxygène dans l'air. Dans le dernier compartiment qui est le côlon, le transit digestif est plus lent et la flore microbienne est plus abondante, représentant 35 à 50% du volume du contenu du colon humain (Cummings *et al.*, 1989). La lumière du côlon est un environnement anaérobie avec un potentiel redox négatif (E_h de -200 à -300 mV). Au contraire, à la surface de la muqueuse on retrouve une teneur en oxygène assez forte en raison

des échanges gazeux avec les tissus sous-jacent. A cet endroit, la pression partielle en oxygène est approximativement comprise entre 29 et 39 mmHg soit 4 à 5% d'oxygène dans l'air (Wilson, 2008).

La microflore du colon est très complexe et dominée par les bactéries anaérobies strictes (*Bacteroides* spp., *Clostridium* spp, *Bifidobacterium* spp., *Atopobium* spp...). Tandis que les bactéries anaérobies facultatives sont moins nombreuses et représentées par les lactobacilles, les entérocoques, les streptocoques et les *Enterobacteriaceae*. Les levures (ex. *Candida albicans*) sont assez faiblement représentées. La charge microbienne dans les différents compartiments a été estimée à environ : 10^4 , 10^{3-4} , 10^{5-7} , 10^{7-8} et 10^{10-11} colonies formant unité (cfu)/g dans l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le colon respectivement (Ouwehand and Vesterlund, 2003). Les bifidobactéries et les lactobacilles, ainsi que plus rarement certains entérocoques, *E. coli*, streptocoques et bactéroïdes, se distinguent par leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, comme l'amélioration de la maturation et de l'intégrité de l'intestin, l'antagonisme contre les pathogènes et la modulation de la fonction immunitaire (Rastall, 2004). Les principaux composants de la flore du colon ainsi que leurs effets sur l'hôte sont présentés dans la Figure 3.

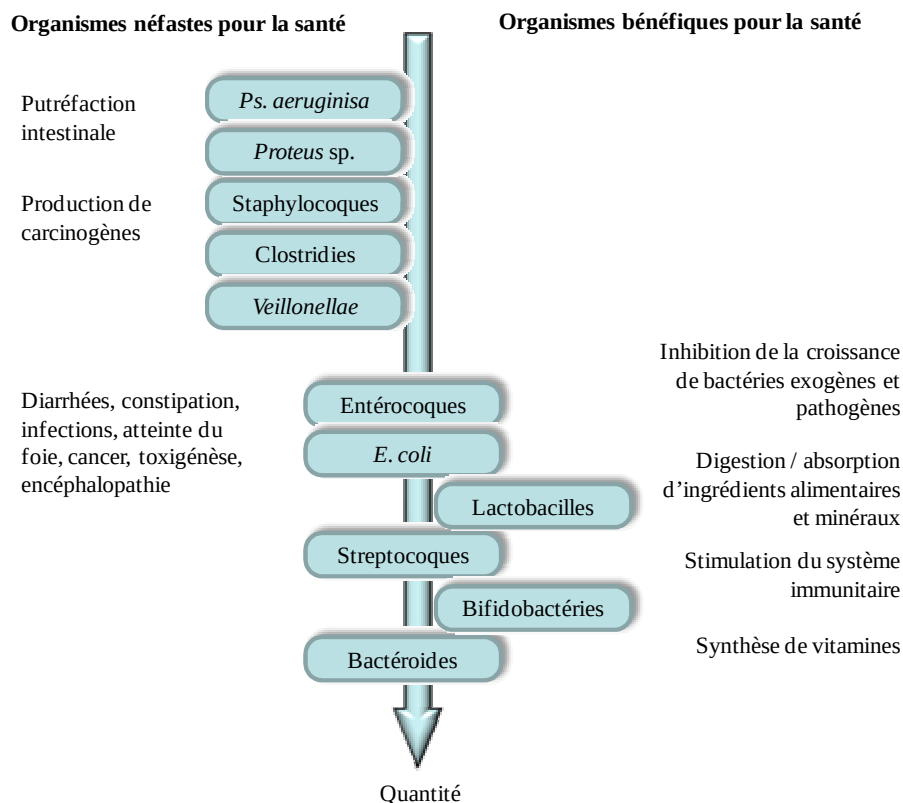


Figure 3 : Vue générale sur la microflore du colon humain. D'après (Gibson and Roberfroid, 1995).

Toutefois, il faut noter qu'une partie de la flore gastro-intestinale (fraction majoritaire) demeure non cultivable et moins explorée, et ce pour diverses raisons : méconnaissance des besoins de croissance de certaines bactéries, sélectivité des milieux utilisés, stress dû aux conditions de culture, nécessité d'anaérobiose stricte et difficulté de stimuler les interactions entre les bactéries et les autres microorganismes ou les cellules de l'hôte.

1.2.5. Interaction entre l'hôte et son microbiote

1.2.5.1. Comparaison entre les individus axéniques et non axéniques

Des différences ont été mises en évidence entre animaux axéniques (sans germes) et conventionnels : les animaux axéniques présentent une vascularisation de l'intestin plus faible, des activités enzymatiques réduites, ainsi qu'une couche de mucus plus importante, une susceptibilité aux infections augmentée ou encore un besoin calorique supérieur de 20 à 30% par rapport à des individus conventionnels (Shanahan, 2002) ([Tableau 1](#)).

Tableau 1 : Impact de la présence de microbes dans l'intestin. D'après (Mackie *et al.*, 1999).

Paramètres	Non Axénique	Axénique
Paroi intestinale	Epaisse	Fine
Renouvellement cellulaire	Rapide	Lente
Taille du cæcum	Normal	Plus développé
Oxygène	Faible	Elevée
Osmolarité	Normale	Réduite
Potentiel redox	Faible (<100 mV)	Elevé (>100 mV)
Métabolismes de sels biliaires	Déconjugaison / Réduction	Pas de déconjugaison / Pas de réduction
Cholestérol	Coprostanol	Pas de coprostanol
Gaz intestinaux	CO ₂ , H ₂ , CH ₄	Peu ou pas de gaz
Angiogénèse	Forte	Faible

L'importance du microbiote intestinal dans l'angiogénèse intestinale a également été mise en évidence (Stappenbeck *et al.*, 2002). Les réseaux de vaisseaux sanguins des villosités intestinales de souris adultes axéniques et conventionnelles ont été comparés, montrant que ce réseau est deux fois moins dense chez des souris axéniques.

Les mécanismes expliquant le besoin calorique plus important pour maintenir leur masse corporelle chez les axéniques ont été expliqués récemment. Le microbiote intestinal contribuerait à l'absorption par l'hôte de glucides et de lipides (Bäckhed *et al.*, 2005) et régulerait le stockage des graisses (Bäckhed *et al.*, 2004). Des souris axéniques présentent un volume de tissu adipeux réduit par rapport à des souris conventionnelles. La colonisation de ces souris axéniques avec un microbiote intestinal aboutit à une augmentation de 60% de la masse grasse et l'émergence d'une insulino-résistance en deux semaines malgré une réduction de la prise alimentaire de 30%. Les deux mécanismes mis en jeu ont été révélés par cette étude. D'une part, le microbiote intestinal augmente l'absorption de monosaccharides et induit ainsi une lipogenèse hépatique. D'autre part, l'inoculation du microbiote intestinal inhibe sélectivement la protéine Fiaf (Fasting-induced adipocyte factor), elle-même inhibitrice de la lipoprotéine lipase. La présence du microbiote intestinal aboutit donc à une activité lipoprotéine lipase plus élevée et ainsi à une augmentation du stockage de triglycérides dans les adipocytes (Bäckhed *et al.*, 2004). Il a également été observé que le microbiote intestinal des souris obèses présentait une proportion plus importante de Firmicutes associée à une plus faible population de Bacteroides (Ley *et al.*, 2005). Ces données suggèrent ainsi l'existence potentielle d'un lien entre la composition du microbiote intestinal et une pathologie d'importance croissante, l'obésité.

1.2.5.2. Rôle du microbiote intestinal

La flore intestinale joue plusieurs rôles essentiels. Tout d'abord elle conditionne la structure physiologique du tube digestif. En effet, l'absence de cette flore provoque une augmentation du volume du caecum, un amincissement de la paroi intestinale, une diminution des plaques de Peyer et un allongement des villosités de la muqueuse (Moroni, 2007).

Cette flore intestinale joue aussi un rôle nutritionnel important. De fait, même si la majorité des nutriments sont absorbés au niveau de l'intestin grêle, la capacité enzymatique de cette flore permet de métaboliser l'ensemble des nutriments toujours présent au niveau du côlon afin de les rendre assimilables pour l'organisme. La flore intestinale peut donc métaboliser les glucides (en particulier les glucides complexes non métabolisés par l'intestin grêle), les protéines, les lipides et les minéraux. Ce métabolisme rend certains nutriments disponibles pour l'organisme mais conduit également à la production de métabolites importants comme les acides gras volatils. Elle permet aussi la déconjugaison des sels biliaires, la dégradation du

cholestérol et la production de nutriments essentiels comme les vitamines B₉ et K (Moroni, 2007).

Enfin, la flore intestinale joue un rôle important dans la protection de l'hôte contre les infections. La flore intestinale est très stable et l'autorégulation y est très importante. Il existe une très grande résistance à l'implantation de nouvelles souches au niveau de la flore. Il est donc assez difficile de modifier cette flore intestinale compte tenu de l'effet barrière (Moroni, 2007). Une altération du microbiote intestinal peut ainsi conduire à des infections.

1.3. Allégation santé des bactéries probiotiques

La reconnaissance de l'importance de la microflore intestinale a généré un intérêt croissant dans l'utilisation de probiotiques pour maintenir ou améliorer la santé humaine. A titre d'exemple, les probiotiques peuvent avoir des effets avérés sur :

- Les diarrhées aiguës : une méta-analyse portant sur 39 études cliniques a montré que les probiotiques réduisent la durée moyenne de la diarrhée de 13 heures, réduisent l'échec du traitement de 38% et ont également un rôle préventif dans les diarrhées aiguës chez l'enfant (McFarland *et al.*, 2006).
- Les diarrhées associées aux antibiotiques : deux méta-analyses ont montré que les probiotiques, en particulier *Saccharomyces boulardii* et *Lactobacillus* GG, peuvent être utilisés dans la prévention des diarrhées associées aux antibiotiques (Cremonini *et al.*, 2002; D'Souza *et al.*, 2002).
- Les maladies inflammatoires de l'intestin (IBD) : les différentes études concernant les maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn, pochte) ne montrent pas d'effet significatif de la prise de probiotiques (Rolfe *et al.*, 2006; Mallon *et al.*, 2007). Cependant, le mélange VSL#3 semble efficace en diminuant le nombre de rechute en cas de pochte (Gionchetti *et al.*, 2003).
- Syndrome de l'intestin irritable (IBS) : plusieurs méta-analyses semblent montrer que les probiotiques agissent de façon bénéfique sur le syndrome de l'intestin irritable en diminuant la sévérité des symptômes (douleur abdominale, flatulence) (McFarland and Dublin, 2008; Nikfar *et al.*, 2008; Moayyedi *et al.*, 2010).
- Les diarrhées du voyageur : une méta-analyse portant sur douze études cliniques contrôlées et randomisées a montré l'efficacité des probiotiques sur la diarrhée du voyageur

(McFarland, 2007). En effet, sur les douze études, six ont montré une différence significative du groupe probiotique par rapport au contrôle et une étude a montré une tendance. Les 5 autres études ne montrent pas de différence significative entre les groupes.

- Les infections à *Helicobacter pylori* : une méta-analyse portant sur quatorze études cliniques randomisées a montré que les probiotiques augmentent le taux d'éradication et réduisent le risque d'effet secondaire liés au traitement contre *H. pylori* (Tong *et al.*, 2007). Cependant d'autres études ne rapportent pas d'effet bénéfiques des probiotiques (Wendakoon *et al.*, 2002; Szajewska *et al.*, 2009).
- Les allergies : bien qu'une revue systématique des études cliniques contrôlées et randomisées ait suggéré que les probiotiques pourraient avoir un effet bénéfique dans le traitement des rhinites allergiques ainsi que dans la réduction de la sévérité des symptômes (aucun effet n'est avéré sur le traitement de l'asthme) (Vliagoftis *et al.*, 2008), il n'y a pas assez d'études pour conclure sur l'utilisation des probiotiques en routine dans le traitement de l'allergie (Osborn and Sinn, 2007).
- L'intolérance au lactose : bien que différentes souches de probiotiques ont été utilisées de manière efficace dans l'alactasie, une revue de littérature a montré que les probiotiques ne réduisaient pas de manière significatives les signes et les symptômes de l'intolérance au lactose (Levri *et al.*, 2005).

Les probiotiques seraient également impliqués dans le traitement d'autres pathologies, mais le manque d'études cliniques en double aveugle contrôlées et randomisées ne permet pas de conclure quant à un effet significatif. Ils seraient ainsi impliqués par exemple dans la réduction du cholestérol, de l'hypertension, du diabète (pour revue, voir (Ebel *et al.*, 2012)). Enfin, les probiotiques pourraient également avoir un effet sur le statut antioxydant de l'hôte ainsi qu'un effet antimutagène.

1.4. Pouvoir antioxydant et antimutagène des bactéries probiotiques

1.4.1. Définition du stress oxydant

Le stress oxydant correspond à un état de déséquilibre pour la cellule entre la quantité de dérivés actifs de l'oxygène (ROS ou reactive oxygen species) présentes et ses systèmes de défenses. En condition physiologique, l'oxygène (O₂), élément indispensable à la vie, produit

en permanence des ROS. En effet, les chaînes respiratoires étant imparfaites, 2 à 5% de l'oxygène est converti en radicaux libres (Figure 4).

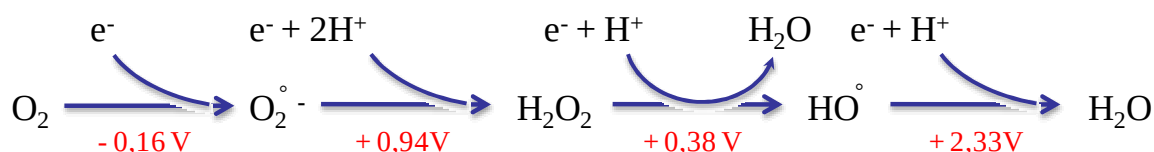


Figure 4 : Intermédiaires réduits de l'oxygène - Les quatre étapes de réduction mono-électronique de l'oxygène (Imlay, 2008).

Ces ROS peuvent intervenir dans les réactions suivantes (Tableau 2) :

Tableau 2 : Réactions chimiques impliquant les ROS.

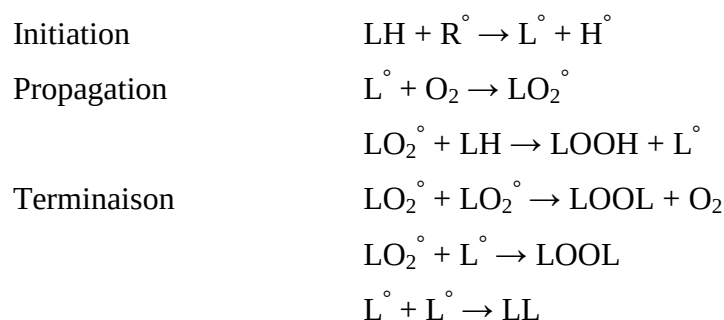
Réaction de dismutation spontanée	$2H^+ + 2O_2^{\bullet -} \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Réaction de Fenton	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + HO^- + Fe^{3+}$
Réaction catalysée par la myéloperoxydase	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + HO^-$
Réactions avec l'acide hypochloreux	$HOCl + O_2^{\bullet -} \rightarrow O_2 + Cl^- + HO^{\bullet}$ $HOCl + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + Cl^- + HO^{\bullet}$
Réaction catalysée par la NO synthase	$Arginine + 2O_2 + 2e^- \rightarrow citrulline + NO^{\bullet} + 2H_2O$
Réaction avec le monoxyde d'azote	$H_2O_2 + NO^{\bullet} \rightarrow NO_2 + H^+ + OH^-$ $O_2^{\bullet -} + NO^{\bullet} \rightarrow H^+ + ONOO^-$

Outre le métabolisme respiratoire, des facteurs exogènes peuvent conduire à la production de ROS dans la cellule : les métaux de transition comme le Fe^{2+} (intervenant dans la réaction de Fenton) (Park and Imlay, 2003) ou les quinones (Moody and Hassan, 1982). La radiolyse de l'eau, induite par un rayonnement ionisant, est une autre source de production de ROS. Enfin, les cellules phagocytaires produisent des ROS face aux agressions de bactéries pathogènes (on parle de poussée oxydative ou « oxidative burst »).

La réactivité des ROS diffère selon leur nature chimique : la charge négative de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) réduit son pouvoir oxydant sur les molécules riches en électrons et la stabilité de la liaison O-O baisse la réactivité du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les radicaux hydroxyles ($HO^{\bullet}$) enfin, sont des espèces extrêmement réactives capables d'oxyder toute molécule biologique avec des constantes de réaction limitées par leur seule vitesse de diffusion.

- Le peroxyde d'hydrogène *via* des mécanismes réactionnels inconnus est capable d'oxyder les groupements thiols libres des résidus cystéines de certaines enzymes, affectant leurs activités comme c'est le cas de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Imlay, 2002). L' H_2O_2 peut également provoquer des dommages membranaires notamment *via* la peroxydation des lipides polyinsaturés (Imlay, 2002; Miyoshi *et al.*, 2003). De toutes les réactions générées à partir de l' H_2O_2 , la plus toxique est bien celle conduisant à la formation du radical $\text{HO}^\bullet$ en présence de Fe^{2+} .
- L'anion superoxyde est un composé chargé négativement et peut donc s'accumuler dans le cytoplasme de la cellule. Il s'agit d'un composé peu oxydant ($\text{O}_2/\text{O}_2^\bullet$, $E^0 = -0.16 \text{ V}$) capable seulement d'oxyder des molécules avec des potentiels redox faibles (Imlay, 2002). Cependant, il peut s'attaquer à des composés comme les polyphénols et les catécholamines. La principale cible de l'ion superoxyde est le groupement fer-soufre de certaines protéines. L'oxydation d'un groupement fer-soufre déstabilise la structure $[\text{4Fe-4S}]^+$ des protéines ce qui provoque l'expulsion d'un atome de fer, inactivant l'activité de l'enzyme. La toxicité de $\text{O}_2^\bullet$ sur les macromolécules biologiques reste limitée. Cependant, la capacité qu'il possède de libérer des ions Fe^{2+} dans le milieu et le fait qu'il soit le précurseur de H_2O_2 augmente considérablement sa toxicité potentielle du fait de la réaction de Fenton qui conduit à la formation de $\text{HO}^\bullet$, espèce autrement plus toxique pour la cellule.
- Le radical hydroxyle est la forme la plus réactive des ROS, issue de la réaction entre l' H_2O_2 et un ion métallique tel que le fer ferreux (Fe^{2+}). Il s'agit d'un composé très instable réagissant avec l'ensemble des molécules organiques se trouvant à proximité, incluant acides gras, protéines et ADN (Imlay, 2002; Miyoshi *et al.*, 2003; Imlay, 2008). Le $\text{HO}^\bullet$ est en majorité généré au voisinage des acides nucléiques, il va donc réagir avec les bases nucléiques par addition de OH et avec les résidus osidiques par arrachement d'un atome d'hydrogène, conduisant à des lésions dans l'ADN (Imlay, 2003). Comme elle possède le plus faible potentiel redox, la guanine (G) est la cible privilégiée des radicaux oxygénés. Son oxydation en 8-oxoguanine (8-oxo-G) est la première étape de nombreuses modifications dans l'ADN (formation de résidus uracile ou de thymine glycol). La 8-oxoguanine est capable de s'appareiller avec l'adénosine (A) à la place de la cytosine (C), conduisant à la conversion des bases GC en AT lors de la replication de l'ADN et à l'apparition de mutations. Les lésions capables de bloquer la replication contribuent davantage à la létalité que les erreurs ou dégradation de bases, responsables, elles, du fort taux de mutagenèse spontanée générée lors

d'un stress oxydant (Farr and Kogoma, 1991). Le HO° va également entraîner une peroxydation lipidique qui se déroule en trois étapes (Figure 5).



LH : lipide insaturé

L° : lipide radicalaire

Figure 5 : Processus de peroxydation lipidique.

L'initiation consiste en l'arrachement d'un proton à un lipide insaturé (LH) par une espèce radicalaire R° (particulièrement le HO°), ce qui conduit à un lipide radicalaire (L°). La propagation est l'étape d'oxydation où le L° formé va réagir avec O_2 pour former un lipide radicalaire peroxydé (LOO°) qui est capable d'arracher un proton à un autre LH pour générer un L° d'où le mécanisme en chaîne de dégradation des acides gras membranaires conduisant à la formation d'hydroperoxydes (produits primaires de l'oxydation des acides gras insaturés). La terminaison est provoquée par la stabilisation des espèces radicalaires réagissant ensemble. Le clivage des liaisons carbonées par les radicaux lipidiques génère des acides gras acylés de taille réduite. Les produits secondaires formés sont principalement des aldéhydes, des hydrocarbures (alcane et alcène), mais aussi des époxydes et des acides dicarboxyliques. Ces groupements introduisent des charges supplémentaires dans la bicouche lipidique de la membrane. Cela provoque la déstructuration de la membrane et peut conduire à une perte de sa fonctionnalité notamment pour le transport des nutriments, l'activité ATPasique, ou la régulation de la balance osmotique (Farr and Kogoma, 1991). Les aldéhydes produits sont, à la différence des radicaux libres comme HO° , plutôt stables et diffusent à l'intérieur et hors de la cellule, pouvant ainsi réagir avec des cibles éloignées de leur site de formation. La plupart de ces aldéhydes présentent une forte réactivité vis-à-vis de biomolécules telles que les protéines, l'ADN et les phospholipides, ce qui contribue à la toxicité de la peroxydation lipidique. La peroxydation lipidique se produit seulement dans le cas où la cellule est incapable d'éliminer efficacement les précurseurs du HO° et en particulier H_2O_2 .

La présence de l'O₂ peut être très toxique pour les organismes vivants et la forte réactivité des ROS peut potentiellement conduire à des modifications dans les principaux constituants cellulaires menaçant l'intégrité et la viabilité de la cellule. La toxicité de l'O₂ ne se développe que si le stress oxydant dépasse la capacité des systèmes de défense cellulaire.

1.4.2. Mesure du pouvoir antioxydant

En 2011, l'EFSA a publié ses recommandations pour la sélection d'une molécule antioxydante. La démonstration d'un effet antioxydant doit ainsi être basé sur l'utilisation de plusieurs critères (EFSA Panel on dietetic products, 2011).

1.4.2.1. Mesures globales du pouvoir antioxydant

Les études sur l'homme doivent montrer un changement dans la capacité antioxydante globale du plasma. Les méthodes utilisables sont par exemple les méthodes TRAP (total reactive antioxidant potential), TEAC (trolox-equivalent antioxidant capacity), FRAP (ferric reducing antioxidant potential) ou ORAC (oxygen radical absorbance capacity). Cependant, il n'est pas clairement établi qu'un changement dans la capacité antioxydante globale du plasma puisse exercer un effet physiologique bénéfique chez l'hôte. Des changements dans l'induction enzymatique (la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase (GPx)) ou dans la limitation de la diminution du glutathion réduit (GSH) sont considérés comme étant physiologiquement bénéfiques pour l'hôte uniquement s'ils sont associés à des marqueurs montrant une protection des cellules ou des molécules contre le stress oxydant. Cela peut être une protection des lipides, des protéines ou de l'ADN.

1.4.2.2. Mesure de la protection des lipides

Les méthodes permettant de démontrer une protection des lipides face au stress oxydant consistent à mesurer des changements dans le taux urinaire de F_{2α}-isoprostanes par chromatographie gazeuse ou techniques immunologiques. La mesure de l'oxydation des LDL dans le sang peut également être réalisée par techniques immunologiques. La mesure des phosphatidylcholine hydroperoxydes (PCOOH) dans le sang ou dans les tissus par HPLC est également considérée comme étant un marqueur acceptable de l'oxydation lipidique. Enfin,

les autres méthodes comme la mesure du taux de malondialdéhyde (MDA) ou des diènes conjugués ne sont pas jugés comme pertinentes mais peuvent être associées aux méthodes décrites ci-dessus.

1.4.2.3. Mesure de la protection des protéines

La mesure directe de l'oxydation protéique peut être réalisée *in vivo* dans le plasma par la mesure des changements dans les acides aminés des protéines par HPLC-MS. La mesure des sous-produits issus de l'oxydation des protéines (par exemple les carbonyles) peut être utilisée en complément de la mesure directe de l'oxydation protéique.

1.4.2.4. Mesure de la protection de l'ADN

La mesure directe de l'oxydation de l'ADN peut être obtenue *in vivo* par l'utilisation d'un test des comètes modifié (utilisation de l'endonucléase III qui détecte spécifiquement les pyrimidines oxydés). Ce test n'étant que quantitatif, il faut donc utiliser un contrôle approprié. Le test des comètes traditionnel (SCGE) détecte les cassures de l'ADN et n'est pas spécifique de l'oxydation. L'analyse de la 8-oxoguanine dans le sang (lymphocytes) est également utilisée pour détecter l'effet du stress oxydant sur l'ADN.

1.4.2.5. Démonstration *in vitro* de l'effet antioxydant

In vitro la plupart de ces techniques ne peuvent être réalisées pour tester l'effet potentiel de souches probiotiques sur le pouvoir antioxydant. Ainsi, pour screener rapidement des souches probiotiques, la capacité à résister au stress oxydant et à piéger ou éliminer les ROS est également le plus souvent utilisée. Les méthodes globales sont également utilisées (ORAC, FRAP, SOD,...). De plus, la mesure du TAA (Total Antioxidant Activity), du TAS (Total Antioxidant Statut) et du statut redox est également souvent employée *in vitro*. Le TAA reflète l'état de la fraction lipidique dans les systèmes de défenses antioxydantes et le TAS celui de la fraction soluble. Le statut redox représente la ratio glutathion oxydé / glutathion réduit (GSSG/GSH). A ces techniques *in vitro*, il semble donc intéressant d'ajouter un modèle intermédiaire, faisant intervenir des cellules. A ce titre, le test KRL ou le test des comètes modifié peuvent être de bon modèles d'étude.

Le test KRL est un test biologique de mesure du potentiel global de défense antiradicalaire. Ainsi, il permet de mesurer la résistance globale du sang vis-à-vis de l'agression des radicaux libres. Il s'agit de soumettre un échantillon de sang ou une suspension d'hématies à une agression radicalaire linéaire et progressive dans des conditions strictement contrôlées et standardisées. Tous les systèmes enzymatiques et chimiques de l'échantillon se mobilisent pour protéger l'intégrité des cellules jusqu'à leurs lyses. La mesure de la diminution de l'absorbance permet de suivre la disparition progressive des cellules. La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des cellules sanguines (Figure 6) (Prost, 1992).

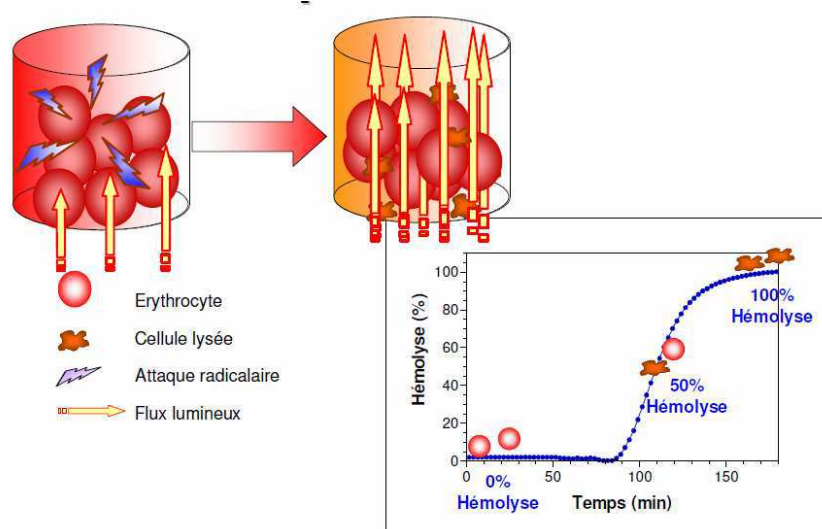


Figure 6 : Principe du test KRL (Prost, 1992).

Cette mesure du potentiel de défense antiradicalaire global tient compte de toute la complexité des systèmes de défenses mise en jeu par les cellules. Théoriquement, la résistance antiradicalaire érythrocytaire doit conduire à une courbe avec un temps de demi-lyse plus élevé avec des molécules antioxydantes comparativement à des témoins.

Le test des comètes est une technique d'électrophorèse sur gel d'agarose mise au point par Singh *et al.* (1988) permettant de détecter des fragmentations de l'ADN de cellules individualisées (Singh *et al.*, 1988). L'essai des comètes en conditions alcalines permet de détecter non seulement les cassures doubles brins (révélées en pH neutre) mais aussi les lésions simples brins et les sites alcali-labiles résultants d'une exposition à un agent prooxydant et/ou génotoxique, rendant ainsi l'essai plus sensible (Olive and Banath, 2006). Une version modifiée du test des comètes peut également être réalisée en présence de la

formamidopyrimidine DNA-glycosylase (FpG) pour détecter spécifiquement les dégâts à l'ADN liés au stress oxydant (Göttel, 2009). La FpG, d'origine bactérienne est une des enzymes responsables de la réparation de lésions à l'ADN. Elle possède des activités N-glycosylase et β -lyase capables de reconnaître et d'exciser les bases d'ADN apuriques converties en cassures détectables par le test des comètes réalisé en conditions alcalines. L'analyse différentielle des lames incubées en présence de FpG et de celles incubées en l'absence de FpG permet d'évaluer la présence de dommages oxydatifs qui ne sont habituellement pas quantifiables dans la version non modifiée de l'essai des comètes.

1.4.3. Effets santé des probiotiques sur le stress oxydant

Même si la production de ROS est utilisée par le système immunitaire comme moyen pour neutraliser les pathogènes (Torres *et al.*, 2006), le stress oxydant serait impliqué dans de nombreuses pathologies comme l'inflammation gastro-intestinale, l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, le diabète de type II et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Witztum, 1994; Suzuki *et al.*, 2007; Castellani *et al.*, 2008; Mikelsaar and Zilmer, 2009; Banday and Lokhandwala, 2011). Le syndrome métabolique, l'obésité et le développement d'un certain nombre de tumeurs ont également été reliés au stress oxydant (Vincent *et al.*, 2007). De nombreuses publications ont montré que la prise d'antioxydants peut diminuer l'impact du stress oxydant sur le corps humain (Lin and Yen, 1999). Des études plus récentes proposent l'utilisation de bactéries probiotiques pour diminuer le stress oxydant.

1.4.3.1. Etudes *in vitro*

Les souches probiotiques ont été étudiées pour leur capacité à diminuer le stress oxydant. *In vitro*, certains probiotiques peuvent réduire ce stress oxydant. C'est par exemple le cas pour *Lactobacillus fermentum* ME-3. Cette souche possède une SOD à manganèse, un haut niveau de TAA et de TAS, la capacité de diminuer le statut redox (GSSG/GSH) et de piéger des ROS et des métaux prooxydant (Kullisaar *et al.*, 2002; Songisepp *et al.*, 2004; Teemu *et al.*, 2008). Les lactobacilles et bifidobactéries possèdent également des capacités antioxydantes *in vitro* (Lin and Yen, 1999; Lin and Chang, 2000; Wang *et al.*, 2006). Ces souches sont notamment capables de diminuer la peroxydation lipidique et de piéger des radicaux libres et des

molécules génotoxiques (Verdenelli *et al.*, 2010). Le pouvoir réducteur des bactéries lactiques permet également de prédire des capacités antioxydantes intéressantes (Saide and Gilliland, 2005).

1.4.3.2. Etudes *in vivo*

De nombreuses études sur le pouvoir antioxydant des bactéries probiotiques ont été menées chez l'animal. Ainsi, une étude menée chez des rats carencés en vitamine E montre l'effet antioxydant d'extraits cellulaires de *Lactobacillus* spp. SBT 2028 sur le statut antioxydant (Kaizu *et al.*, 1993). Une première étude menée chez des souris a montré que l'ingestion de *L. fermentum* ME-3 pendant 15 jours (10^8 UFC/j) permet une diminution significative du taux de fer et de la peroxydation lipidique et une augmentation significative du TAA (Truusalu *et al.*, 2004). L'influence de la bactéries *L. fermentum* ME-3 a été testée chez des souris sur un modèle d'infection à *Salmonella* Typhimurium (Truusalu *et al.*, 2008). Ainsi, le taux d'éradication de *Salmonella* Typhimurium chez les souris traitées avec de l'ofloxacin et supplémentées avec la souche probiotique pendant 8 jours à une dose de 2.5×10^8 UFC/j est augmenté par rapport aux souris témoins, aux souris traitées uniquement avec l'antibiotique ou aux souris uniquement supplémentées en probiotique. De plus, le statut antioxydant est également amélioré (diminution significative de la peroxydation lipidique et du statut redox (GSSG/GSH)). Dans une autre étude, des rats ont été nourris pendant 14 jours avec deux souches différentes de *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* (A13 et B3 ; 1×10^{10} UFC/j) (Coşkun *et al.*, 2010). Le statut antioxydant des rats est amélioré par rapport à la population ne consommant aucune des deux souches probiotiques (augmentation significative du taux de GSH dans l'intestin grêle, pas de variation de la teneur en vitamine C). Parallèlement à cela, la peroxydation lipidique augmente de façon significative dans les groupes probiotiques ; ceci est dû à l'augmentation conjointe du taux de NO.

1.4.3.3. Etudes cliniques

N'apparaissent pas ici les études restreintes à l'effet des probiotiques sur le profil lipidique sanguin (Guo *et al.*, 2012). Les différentes études cliniques menées sur les probiotiques et le statut antioxydant de l'hôte sont résumées dans le [Tableau 3](#).

Tableau 3 : Effet des probiotiques sur le statut antioxydant de l'hôte. TAA : activité antioxydante totale ; TAS : statut antioxydant total ; GSSG/GSH : statut redox glutathion oxydé/glutathion réduit ; LDL_{ox} : lipoprotéines de basse densité oxydées ; 8-IP : 8-isoprostane ; MDA : malondialdéhyde ; DC : diène conjugué ; TAC : capacité antioxydante totale ; CAT : catalase ; SOD : superoxyde dismutase ; GPx : glutathion peroxydase ; BAP : potentiel antioxydant biologique ; ROM : métabolites des espèces réactives ; 8-oxo-G : 8-oxoguanine.

Références	Souche / Population / Durée	Effets	
(Kullisaar <i>et al.</i> , 2003)	<i>L. fermentum</i> ME-3 / n=21 / 21 j / produit laitier	↑ TAA, TAS ↓ GSSG/GSH, LDL _{ox} , 8-IP	Données significatives
(Songisepp <i>et al.</i> , 2005)	<i>L. fermentum</i> ME-3 / n=21 / 21 j / produit laitier	↑ TAA, TAS ↓ GSSG/GSH	Données significatives
(Songisepp <i>et al.</i> , 2005)	<i>L. fermentum</i> ME-3 / n=24 / 21 j / gélule	↑ TAA, TAS	Données significatives
(Fabian and Elmadfa, 2007)	<i>Lactobacillus casei</i> / n=33 / 4 semaines / produit laitier	↑ MDA, DC ↓ TAC, CAT	Données non significatives
(Chamari <i>et al.</i> , 2008)	<i>L. acidophilus</i> LA5 – <i>B. bifidum</i> BB12 / n=60 / 6 semaines / produit laitier	↑ CAT, SOD	Données significatives (catalase)
(Kaur <i>et al.</i> , 2008)	<i>L. fermentum</i> ME-3 / n=16 / 3 mois / produit laitier	↑ TAA ↓ GSSG/GSH, DC	Données significatives
(Hütt <i>et al.</i> , 2009)	<i>L. fermentum</i> ME-3 – <i>L. paracasei</i> 8700:2 – <i>B. longum</i> 46 / n=53 / 3 semaines / produit lyophilisé	↑ TAS ↓ GSSG/GSH	Données significatives
(Ejtahed <i>et al.</i> , 2011)	<i>L. acidophilus</i> LA5 – <i>B. bifidum</i> BB12 / n=64 / 6 semaines / produit laitier	↑ SOD, GPx, TAS ↓ MDA	Données significatives sauf pour le MDA
(Kullisaar <i>et al.</i> , 2011)	<i>L. fermentum</i> ME-3 / n=73 / 2 semaines / kéfir	↓ LDL _{ox} , DC, 8-IP	Données significatives
(Martarelli <i>et al.</i> , 2011)	<i>L. rhamnosus</i> IMC 501 – <i>L. paracasei</i> IMC / n=24 / 4 semaines / produit lyophilisé	↑ BAP ↓ ROM	Données significatives
(Asemi <i>et al.</i> , 2012)	<i>L. acidophilus</i> LA5 – <i>B. bifidum</i> BB12 / n=70 / 9 semaines / produit laitier	↑ GR ↑ TAC, GSH, GPx ↓ 8-oxo-G	Données non significatives sauf pour la GR

L'effet de la souche *Lactobacillus fermentum* ME-3 sur le stress oxydant a fait l'objet de plusieurs études cliniques. Une première étude a été menée en 2003 sur 21 volontaires sains consommant pendant 21 jours du lait de chèvre fermenté ou non avec *L. fermentum* ME-3 (3×10^{11} UFC/j) (Kullisaar *et al.*, 2003). Une augmentation significative du TAA et du TAS sanguin, une diminution significative du statut redox (GSSG/GSH), de l'oxydation des LDL et du taux de 8-isoprostane ont pu être mis en évidence avec la consommation de la souche probiotique. Une seconde étude clinique contrôlée contre placebo ouvert en 2005 porte sur 21 personnes consommant pendant 3 semaines du lait de chèvre fermenté ou non avec *L. fermentum* ME-3 ($6,3 \times 10^{11}$ UFC/j) (Songisepp *et al.*, 2005). La consommation du lait fermenté avec la bactérie probiotique permet d'augmenter de manière significative le statut TAA et TAS respectivement de 6% et 9% par rapport au contrôle. Cette étude a également été menée avec des gélules (saccharose et microcellulose) contenant ou non *L. fermentum* ME-3 (n=24, $1,6 \times 10^9$ UFC/jour, étude en double aveugle, contrôlée et randomisée). Une augmentation du TAA (4%) et du TAS (2,5%) a également été observée par rapport au groupe contrôle (Songisepp *et al.*, 2005). La matrice laitière semble donc également influencer sur le statut antioxydant de l'hôte. De plus, le statut redox (GSSG/GSH) ne diminue significativement que dans le groupe consommant le lait fermenté avec *L. fermentum* ME-3. Une étude a été menée en 2006 sur 16 patients souffrants de dermatite atopique modérée consommant pendant 3 mois du lait de chèvre fermenté contenant ou non la souche *L. fermentum* ME-3 (Kaur *et al.*, 2008). Une diminution significative de la quantité de diènes conjugués et du statut redox (GSSG/GSH) et une augmentation significative du TAA ont été observées dans le groupe probiotique par rapport au groupe contrôle. Enfin, une étude récente montre également le rôle de *L. fermentum* dans la diminution significative du stress oxydant postprandial (Kullisaar *et al.*, 2011). En effet, la consommation pendant 2 semaines d'un kefir contenant *L. fermentum* ME-3 (4×10^{10} UFC/j) diminue de façon significative le taux de LDL oxydé, de diène conjugué et de 8-isoprostane par rapport à la consommation d'un kefir sans souche probiotique.

D'autres études cliniques ont également été menées par des équipes différentes. Une première étude portant sur un yaourt contenant ou non une souche de *Lactobacillus casei* (n=33, 4 semaines, individus sains) montre un effet positif par rapport au niveau basal de la consommation du produit laitier sur le stress oxydant, mais cette fois-ci en l'augmentant (Fabian and Elmadfa, 2007). Cependant, aucune différence significative entre le groupes placebo et le groupe probiotique n'a été mise en évidence. Dans les deux groupes, le niveau

de TAC (Total antioxidant capacity) diminue significativement, tout comme la catalase ; le niveau de MDA et de diènes conjugués augmentent significativement. Une étude portant sur 60 femmes consommant pendant 6 semaines des yaourts conventionnels ou contenant *Lactobacillus acidophilus* La5 et *Bifidobacterium lactis* Bb12 ($1,2 \times 10^{10}$ UFC/j) a été menée en 2008 (Chamari *et al.*, 2008). Le taux de catalase est significativement plus important dans le groupe probiotique que dans le groupe contrôle. De plus, dans les deux groupes, le taux de SOD augmente également de manière significative avec la consommation du yaourt, les probiotiques n'ont pas d'effet supplémentaire. Une autre étude a été menée chez des patients souffrant de diabète de type 2 (Ejtahed *et al.*, 2011). Cette étude a été menée en double aveugle contre placebo, contrôlée et randomisée sur 64 personnes consommant pendant 6 semaines un yaourt contenant ou non les souches *Lactobacillus acidophilus* La5 ($>5 \times 10^8$ UFC/j) et *Bifidobacterium lactis* Bb12 ($>5 \times 10^8$ UFC/j). Le yaourt probiotique augmente significativement le taux de l'activité SOD, de l'activité glutathion peroxydase et du TAS par rapport au yaourt conventionnel. De plus la concentration sérique de MDA diminue dans les deux groupes, de manière non significative. Aucune différence au niveau de l'activité catalase n'a été mise en évidence.

Une autre étude a été menée sur 24 athlètes consommant ou non deux souches probiotiques sous forme de lyophilisat (*L. rhamnosus* IMC 501 et *L. paracasei* IMC 502; 10^9 UFC/j) pendant 4 semaines d'activité physique intense (Martarelli *et al.*, 2011). La consommation de ces deux souches permet de diminuer de manière significative le stress oxydant engendré par l'activité physique intense. En effet, dans le groupe probiotique, les métabolites des espèces réactives (ROM) diminuent de façon significative tandis que le potentiel antioxydant biologique (BAP) augmente de façon significative.

Enfin, une étude clinique contrôlée et randomisée a été menée sur 70 femmes enceintes consommant deux souches probiotiques incluses dans un yaourt (*Lactobacillus acidophilus* LA5 et *Bifidobacterium bifidum* BB12 ; 3×10^9 UFC/j). Cette étude a montré un effet bénéfique de la consommation du yaourt probiotique par rapport au yaourt contrôle sur le taux érythrocytaire de glutathion réductase (Asemi *et al.*, 2012). Cependant, bien que la consommation du yaourt ait un effet significatif sur le TAC, le taux de GSH plasmatique, le taux de glutathion peroxydase érythrocytaire et sur la 8-oxo-G sérique par rapport au niveau basal, aucune différence significative entre le lot probiotique et le lot contrôle n'a été mise en évidence.

De plus, une étude a concerné l'impact de la consommation d'un symbiotique sur le statut antioxydant de l'hôte. Cette étude, en double aveugle contre placebo, contrôlée et randomisée a été menée sur 53 volontaires sains consommant pendant 3 semaines un cocktail de 3 souches probiotiques lyophilisées (*L. fermentum* ME-3, *L. paracasei* 8700:2 et *B. longum* 46 ; 6×10^9 UFC/j) associées à un prébiotique (Raftilose) ou un placebo (maltodextrine) (Hütt *et al.*, 2009). Parmi les volontaires, certains sont colonisés par *H. pylori*. Chez ces derniers, la consommation du symbiotique diminue de façon significative le statut redox (GSSG/GSH) et augmente significativement le TAS par rapport au groupe placebo.

L'effet des bactéries probiotiques sur le statut antioxydant de l'hôte semble bénéfique. Cependant, les études cliniques devraient être menées systématiquement en double aveugle contre placebo, contrôlées et randomisées. La cohorte de patient est également très faible dans les différentes études et devrait donc être augmentée. Enfin, les marqueurs utilisés ainsi que les techniques employées pour démontrer l'efficacité des probiotiques ne sont plus suffisants aujourd'hui pour l'EFSA (EFSA Panel on dietetic products, 2011).

1.5. Les bifidobactéries comme bactéries probiotiques

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, les bifidobactéries sont souvent citées comme ayant de fortes capacités probiotiques. Cependant, l'utilisation industrielle de ces souches n'est pas aussi répandue que celles des lactobacilles. En effet, en 2009, l'analyse de 34 produits commerciaux a montré la présence de 16 bifidobactéries probiotiques contre 27 lactobacilles. De plus, parmi ces 16 bifidobactéries, 11 appartenaient à l'espèce *Bifidobacterium lactis*, connue pour ses propriétés de résistance aux stress (Muller *et al.*, 2009). De même, sur les 35 souches vendues par les fabricants de ferments probiotiques, seules 11 sont des bifidobactéries.

1.5.1. Définitions et caractéristiques générales des bifidobactéries

Les bifidobactéries ont été isolées et décrites pour la première fois par Henry Tissier à la fin du XIX^{ème} siècle (Tissier, 1900). Il a observé en abondance une bactérie en forme de Y dans les fèces d'enfants nourris au sein et absente chez ceux nourris au biberon. Cette bactérie, Gram positive, non sporulée, non productrice de gaz, non mobile, anaérobie et de

morphologie bifide a été dénommée *Bacillus bifidus*. Cependant, un microbiologiste Danois, Orla-Jensen, a proposé de classer *Bacillus bifidus* comme une espèce à part entière sous le nom de genre *Bifidobacterium* (Orla-Jensen, 1924). Pour lui, les bifidobactéries "constituent un genre séparé, formant probablement une connexion entre les bactéries lactiques et les bactéries propioniques". Néanmoins, il n'y a pas eu de consensus taxonomique clair pour ce nouveau genre et pendant une grande partie du 20^{ème} siècle, les bifidobactéries ont été classées comme membre du genre *Lactobacillus*, en raison de leur forme en bâtonnet et de leurs caractéristiques fermentaires. Cependant, l'accumulation d'études détaillant l'hybridation de l'ADN, le contenu en G+C et le métabolisme spécifique, a permis de ressusciter le genre *Bifidobacterium*. Les bifidobactéries forment un genre phylogénétiquement cohérent au sein de l'embranchement des *Actinobacteria* (Ventura *et al.*, 2004). Cet embranchement comprend également les *Corynebacteria*, les *Mycobacteria* et les *Streptomyces* (Embley and Stackebrandt, 1994). Les bifidobactéries représentent aujourd'hui 34 espèces, isolées principalement du TGI d'hommes ou d'animaux. Les espèces reconnues ainsi que leur origine sont listées ci-dessous (Figure 7).

<i>Bifidobacterium breve</i>	TGI Humain	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	TGI Animal
<i>Bifidobacterium bifidum</i>		<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>		<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	
<i>Bifidobacterium longum</i> biotype <i>infantis</i>		<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	
<i>Bifidobacterium longum</i> biotype <i>longum</i>		<i>Bifidobacterium longum</i> biotype <i>suis</i>	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		<i>Bifidobacterium choerinum</i>	
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>		<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	
<i>Bifidobacterium angulatum</i>		<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	
<i>Bifidobacterium gallicum</i>		<i>Bifidobacterium magnum</i>	
<i>Bifidobacterium dentium</i>	Cavité Orale	<i>Bifidobacterium saeculare</i>	
<i>Bifidobacterium tsurumiense</i>		<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	Sang humain	<i>Bifidobacterium merycicum</i>	
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>		<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	
<i>Bifidobacterium indicum</i>	Insecte	<i>Bifidobacterium boum</i>	
<i>Bifidobacterium asteroides</i>		<i>Bifidobacterium gallinarum</i>	
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Alimentation	<i>Bifidobacterium pullorum</i>	
		<i>Bifidobacterium minimum</i>	Ensillage
		<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	
		subsp. <i>thermacidophilum</i>	

Figure 7 : Répartition écologique des bifidobactéries dans les différentes niches écologiques.

Leur génome a un contenu en G+C généralement élevé qui varie de 42 à 67% (Felis and Dellaglio, 2007). La teneur en G+C de *Bifidobacterium bifidum* vaut approximativement 62% (Turroni *et al.*, 2010; Zhurina *et al.*, 2011).

1.5.2. Morphologie et physiologie des bifidobactéries

Les bifidobactéries ont des caractéristiques morphologiques et physiologiques particulières. Ces bactéries sont en forme de bâtonnet à morphologie variable, généralement un peu courbées et plissées, parfois ramifiées. Des souches fraîchement isolées peuvent avoir des formes allant d'uniformes à ramifiées, en forme de Y ou de V voire en forme de spatule. Cependant, sur des milieux défavorables, les bifidobactéries présentent des ramifications et un pléomorphisme, bien qu'elles soient sous forme de bâtonnet dans leur habitat naturel. La paroi des bifidobactéries a une structure typique des Gram-positives, constituée d'une enveloppe fine de peptidoglycane contenant des polysaccharides, des protéines et des acides téichoïques (Gomes and Malcata, 1999). La composition en acides aminés des térapeptides des peptidoglycane peut différer entre les espèces, et également entre les souches ; elle peut ainsi être utilisée pour leur différenciation (Lauer and Kandler, 1983).

Les bifidobactéries sont décrites comme étant strictement anaérobies, bien que certaines souches tolèrent l'oxygène (Simpson *et al.*, 2005). La sensibilité à l'oxygène peut différer cependant entre les espèces mais également entre les souches d'une même espèce (Shimamura *et al.*, 1992; Talwalkar and Kailasapathy, 2003).

La plupart des souches de bifidobactéries d'origine humaine ont un optimum de croissance compris entre 36 et 38 °C. Les souches d'origine animale, elles, ont un optimum de croissance légèrement plus élevé puisque compris entre 41 et 43 °C. La souche *Bifidobacterium thermacidophilum* est une exception puisque son optimum de croissance est de 49,5 °C (Dong *et al.*, 2000). *Bifidobacterium psychraerophilum* quant à elle peut se développer à des températures de 4 °C (Simpson *et al.*, 2004).

Les bifidobactéries ont un optimum de croissance compris entre pH 6,5 et 7. Les souches de *Bifidobacterium lactis* et *Bifidobacterium animalis* peuvent survivre à pH 3,5 (Matsumoto *et al.*, 2004) tandis que les bifidobactéries dans un environnement supérieur à pH 8,5 ne survivent pas (Biavati *et al.*, 2000).

1.5.3. Métabolisme

Chimio-organotrophes avec un métabolisme fermentaire, les bifidobactéries peuvent cataboliser plusieurs sources de sucre et toutes peuvent fermenter le glucose, le fructose et le galactose (Figure 8).

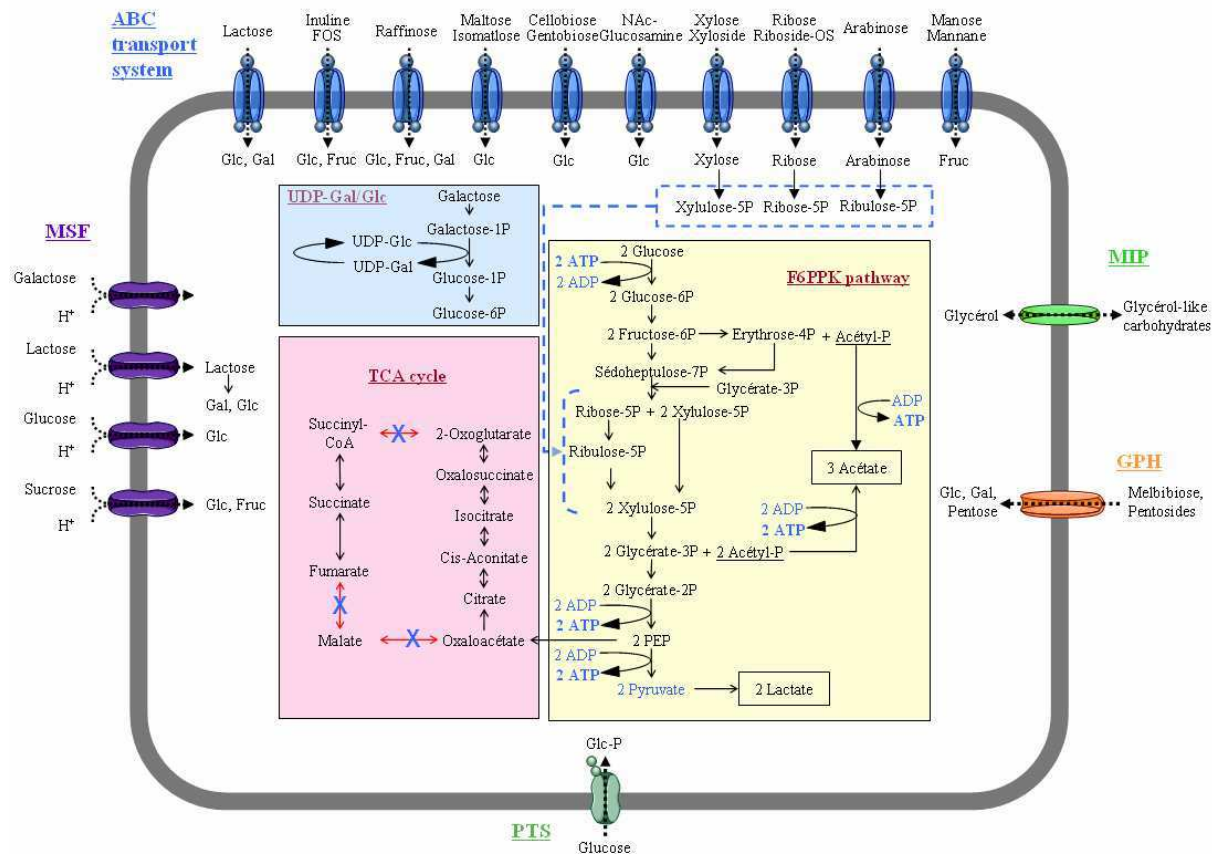


Figure 8 : Métabolisme général des bifidobactéries. D'après (Lee and O'Sullivan, 2010). ABC : ATP-binding cassette systems ; GPH : glycoside-pentoside-hexuronide cation symporter family ; MIP : major intrinsic protein ; MSF : major facilitator superfamily ; PTS : sugar phosphotransferase systems

Les hexoses sont dégradés par une voie métabolique particulière, la voie de la fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) (EC 4.1.2.2) ou « bifid shunt ». Il existe également une voie partielle de la glycolyse ainsi qu'une voie partielle du cycle d'acide tricarboxylique (cycle de Krebs ; les gènes codant pour la fumarase, l'oxoglutarate déshydrogénase et la malate déshydrogénase étant absents). Des différences existent entre les espèces dans leur capacité à fermenter d'autres glucides ou des alcools.

La fermentation de deux moles de glucose produit approximativement trois moles d'acide acétique, deux moles d'acide lactique et 2,5 moles d'ATP. L'enzyme clé de cette voie métabolique, la F6PPK, est considérée comme un identifiant taxinomique pour la famille des Bifidobacteriaceae (Ventura *et al.*, 2004; Felis and Dellaglio, 2007).

Il est intéressant de noter que 8.9% des protéines prédites à partir du génome de *Bifidobacterium bifidum* (Turroni *et al.*, 2010) seraient impliquées dans le transport et le métabolisme des glucides. Ceci est équivalent à 30% de plus qu'observé chez d'autres organismes (Schell *et al.*, 2002).

1.6. Critères de sélection des souches probiotiques

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Le choix des probiotiques dépend de ces propriétés et du type d'utilisation. Selon le rapport de la FAO/OMS (2002), pour qu'un produit soit reconnu comme étant probiotique, une évaluation du produit basée sur plusieurs critères doit être effectuée suivant les recommandations suivantes (Figure 9) :

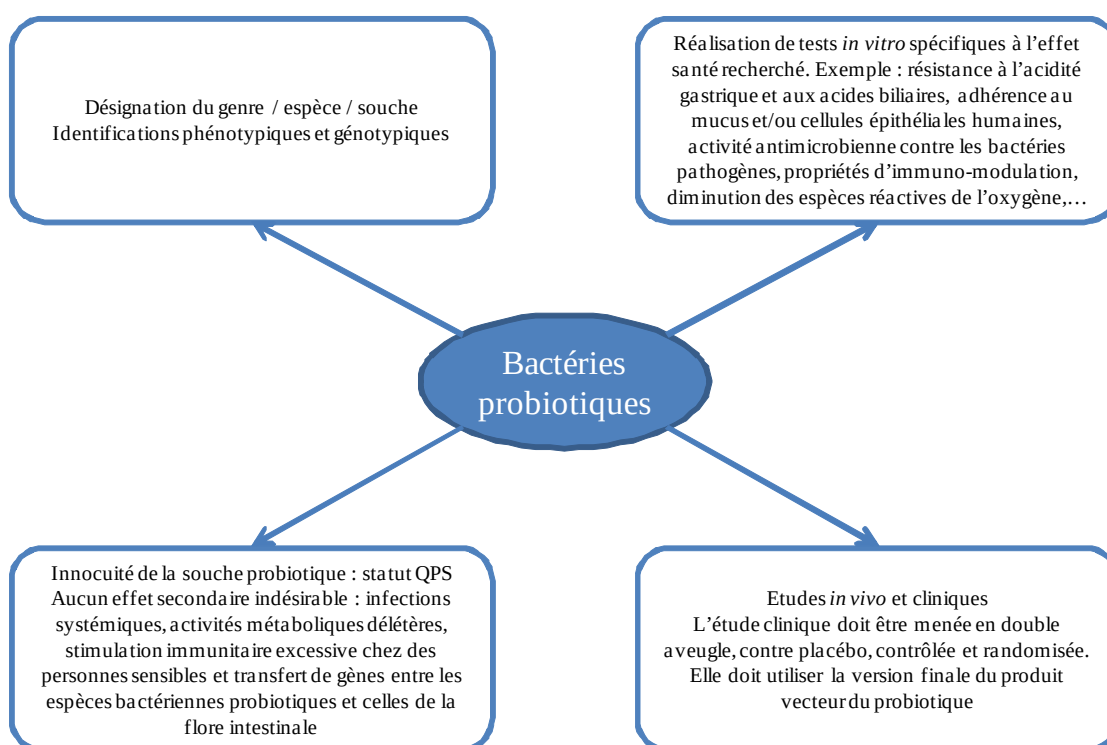


Figure 9 : Recommandation pour l'évaluation d'un probiotique dans le cadre d'une utilisation alimentaire. D'après (FAO/WHO, 2002).

En plus de l'innocuité et des propriétés fonctionnelles, des critères technologiques sont également pris en considération dans la sélection des souches probiotiques. Selon Saarela *et al.* (Saarela *et al.*, 2000), ces critères sont de bonnes propriétés sensorielles, une résistance aux phages, une viabilité durant le traitement technologique et une stabilité dans le produit et durant le stockage. Cependant, l'aptitude de ces souches à être industrialisées n'est souvent vérifiée qu'après leur sélection sur les critères de fonctionnalité ; mais les souches les plus fonctionnelles ne sont pas forcément des souches industrialisables. Les études présentant à la fois l'aptitude des souches à résister aux conditions du tractus gastro-intestinal et aux conditions du procédés de fabrication sont également assez rares.

Toutefois, le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques. Ainsi, la capacité de survie des probiotiques dans l'hôte après leur ingestion, dépend de leur résistance intrinsèque, des facteurs de l'hôte et du véhicule par lequel ils ont été ingérés (Marteau and Shanahan, 2003). Parmi les facteurs de l'hôte qui réduisent la survie des probiotiques, on cite principalement l'acide gastrique, l'oxygène, le potentiel redox, les sels biliaires, les autres sécrétions digestives (mucus, défensines) et l'interaction avec la flore endogène (Godward *et al.*, 2000; Marteau and Shanahan, 2003). Compte tenu des tous ces facteurs, il est donc recommandé de consommer les probiotiques à des doses appropriées pour obtenir les effets bénéfiques escomptés (1×10^9 UFC/jour). Contrairement au *Lactobacillus acidophilus*, les souches de *Bifidobacterium*, à l'exception de quelques souches comme *Bifidobacterium lactis* BB12, survivent difficilement au pH gastrique et à l'acidité de l'aliment durant le stockage (Trindade and Grosso, 2000). C'est une des raisons de leur faible industrialisation, bien que présentant un fort potentiel probiotique. Pour augmenter leur taux de survie, les probiotiques doivent être ingérés pendant le repas, ou bien protégés dans des gellules ou par microencapsulation (Kailasapathy, 2002). Le choix des vecteurs dans lesquels ou par lesquels sont ingérés les probiotiques est aussi important (tablettes, capsules de gélatine, laits fermentés). Les techniques classiques pour mesurer la résistances des souches probiotiques aux stress gastro-intestinaux consistent à évaluer leur viabilité après le stress en numération sur milieu gélosé (Chung *et al.*, 1999; Erkkilä and Petäjä, 2000). Cette technique a trois défauts majeurs : elle est longue (24 à 72 h selon les espèces), elle sous-estime le nombre de cellules (problème des chainettes chez les lactocoques par exemple) et elle ne tient pas compte des cellules viables mais non cultivables (qui pourrait retourner dans un état physiologique actif sous d'autres conditions que les conditions de culture) (Kaprelyants *et al.*, 1996). Ainsi, si de nombreux auteurs s'intéressent aux effets du stress sur les probiotiques, ils s'attachent le plus souvent à l'étude de la cultivabilité et rarement au maintien des propriétés des microorganismes et ne concernent généralement qu'une ou deux souches. Or, même s'il est possible de distinguer des groupes microbiens plus sensibles que d'autres, la résistance au stress, dépend fortement des souches (Denis *et al.*, 2006). Au contraire, la cytométrie en flux pourrait permettre de tester l'effet des stress sur un grand nombre de souches et de caractériser non plus la cultivabilité mais l'état physiologique des souches (Rault *et al.*, 2007). Ainsi, l'état physiologique des probiotiques pourrait être estimé grâce à l'utilisation combinée de deux sondes, l'iodure de propidium (IP), qui va renseigner sur la viabilité et la carboxyfluoresceine diacétate (cFDA), qui va renseigner sur la vitalité de la souche. Le terme

vitalité correspond à la capacité qu'à une souche bactérienne d'exprimer des activités enzymatiques.

Conclusions : Les probiotiques constituent un thème de recherche majeur du XXI^{ème} siècle. Avec l'émergence des études sur le microbiote, de plus en plus d'effets santé leur sont attribués. Un axe santé émergent concerne le pouvoir antioxydant des souches probiotiques. Même si les études cliniques doivent être renforcées, les premiers résultats semblent prometteurs. La mise en place d'un crible permettant de tester la résistance aux stress de nombreuses souches devrait permettre de sélectionner des bactéries à la fois fonctionnelles et résistantes. Les bifidobactéries semblent ainsi présenter un fort potentiel probiotique, notamment par rapport à l'axe santé antioxydant. Cependant, leur résistance aux conditions du tractus gastro-intestinal (pH, bile, fluctuations redox) et aux conditions de procédés de fabrications est faible, ce qui les rend difficilement industrialisables. Un verrou scientifique et technologique majeur va donc consister à les protéger pour pouvoir les utiliser dans des produits commerciaux. Ainsi, en étudiant les mécanismes de défense mis en place lors de ces stress, il sera alors possible d'élaborer des stratégies de protection de ces souches.

2. Bifidobactéries et Tolérance aux Stress

2.1. Tolérance au stress acide

2.1.1. Physiologie du pH

Le pH est défini comme la valeur négative du logarithme décimal de la concentration en ions hydrogènes (protons). C'est l'unité standard mesurant le degré d'acidité ou d'alcalinité d'une solution aqueuse. On considère une solution comme acide si son pH est inférieur à 7. En conséquence, les environnements acides sont caractérisés par une concentration élevée en protons. Les acides non dissociés peuvent diffuser de façon passive à travers les membranes cytoplasmiques suivant un gradient électrochimique. En l'absence de mécanisme de protection, ils acidifient le cytoplasme, entraînant ainsi une perturbation dans le métabolisme cellulaire pouvant conduire à la mort cellulaire. C'est pourquoi l'existence de mécanismes moléculaires permettant de maintenir le cytoplasme à des valeurs de pH physiologiques est essentielle pour la survie des bactéries dans des environnements acides. La plupart des enzymes du métabolisme ayant un optimum d'activité à pH légèrement acide, une diminution brutale du pH entraîne un arrêt du métabolisme bactérien. En raison de leur catabolisme, les bifidobactéries acidifient leur environnement à travers la fermentation des sucres par la production d'acétate et de lactate (Vernazza *et al.*, 2006). Leur activité métabolique implique donc un stress acide durant la phase stationnaire, phase où le métabolisme énergétique est ralenti et où l'ATP est peu disponible pour les ATPases membranaires. De plus, les bifidobactéries incluses dans des produits fonctionnels peuvent faire face à des environnements acides lors du stockage, notamment dans le cas des produits laitiers fermentés (Jayamanne and Adams, 2006). Enfin, après avoir été ingérées, les bifidobactéries rencontrent des conditions drastiques dans l'estomac, puisque la nourriture y reste aux alentours de 90 minutes à un pH proche de 2. La sélection de souches possédant une grande tolérance à l'acidité est donc très intéressante pour l'industrie agro-alimentaire.

2.1.2. Réponse ATR des bifidobactéries

Chez les bactéries, les mécanismes inductibles, déclenchés par une exposition à un stress acide modéré et conduisant à une adaptation à des valeurs de pH plus létales, sont dénommés ATR (Acid Tolerance Response). L'ATR est caractérisé comme étant un procédé complexe impliquant des changements dans la transcription de plusieurs gènes et dans la synthèse d'un grand nombre de protéines (Tableau 4).

Tableau 4 : Gènes et protéines impliqués dans la réponse au stress acide. D'après (Sanchez *et al.*, 2007a).

Fonction putative (nom)		Activité
H ⁺ -ATPase, sous-unité alpha (AtpA, <i>atpA</i>)	+	Régulation du pH intracellulaire
H ⁺ -ATPase, sous-unité beta (AtpD, <i>atpD</i>)	+	Régulation du pH intracellulaire
Methionine synthase (MetE)	+ *	ND
BSH (Bile Salt Hydrolase)	- *	Diminution l'activité BSH
Glutamine synthetase 1 (GlnA1)	+	Augmentation de la synthèse d'ammoniac
Protéine chaperone (DnaJ)	-	ND

+ : induction ; - : répression ; * : implication dans l'adaptation au stress ; ND : non déterminé

Ce procédé est souche et espèce dépendante (Saarela *et al.*, 2004). Les mécanismes associés à l'ATR peuvent être mis en œuvre simplement par l'entrée des cultures en phase stationnaire de croissance, en raison de la production fermentaire d'acides organiques. Ceci est une des raisons expliquant la meilleure résistance des cellules récoltées dans cette phase de croissance au pH acide (Samelis *et al.*, 2003). Ainsi, la survie des bifidobactéries à des pH drastiques peut être améliorée si les cellules sont pré-exposées à des valeurs de pH sublétales, à travers l'induction de l'ATR (Maus and Ingham, 2003). De plus, les souches résistantes à l'acidité possèdent également une bonne résistance à d'autres stress (sels biliaires, NaCl) (Collado and Sanz, 2006). Inversement, l'exposition des bifidobactéries à des stress sublétaux, comme des températures modérées (40 à 47 °C), peut conférer une résistance croisée aux pH acides (Saarela *et al.*, 2004).

La résistance des bifidobactéries aux valeurs de pH des produits laitiers fermentés ou à celles des fluides gastriques de synthèse est très variable (Sanz, 2007). De manière générale, la résistance des bifidobactéries au stress acide est faible, à l'exception de *Bifidobacterium animalis* (Masco *et al.*, 2007). Cette espèce est d'ailleurs la plus utilisée dans les produits laitiers fermentés également en raison de sa bonne tolérance à l'oxygène (Vernazza *et al.*,

2006). C'est pourquoi, cette espèce, contrairement aux autres espèces de *Bifidobacterium*, est capable de maintenir sa viabilité lors du stockage des laits fermentés (Jayamanne and Adams, 2006; Jayamanne and Adams, 2009). Chez *Bifidobacterium animalis*, une forte induction de l'activité des ATPases membranaires a été observée, pouvant ainsi expliquer la résistance élevée au pH acide ; cette activité n'étant pas induite chez les souches moins résistantes aux environnements acides (Matsumoto *et al.*, 2004). La résistance au pH acide de *Bifidobacterium animalis* peut être reliée à son excellente survie au passage du TGI de l'Homme (Alander *et al.*, 2001).

En dépit de la faible résistance des autres espèces de *Bifidobacterium* au pH acide, certaines souches sont également capables d'induire une réponse ATR. C'est le cas de *Bifidobacterium longum* BL1, sélectionnée en raison de sa résistance à l'exposition à un fluide gastrique de synthèse (pH 3). Cette résistance est corrélée avec le maintien de sa viabilité durant le stockage d'un lait fermenté (Takahashi *et al.*, 2007). *Bifidobacterium longum* est capable de maintenir un pH cytoplasmique plus élevé que les souches non résistantes au pH acide.

Enfin, l'acquisition de la résistance aux environnements acides peut induire des changements dans les propriétés de surface des *Bifidobacterium*. Ainsi, des souches résistantes au pH acide présentent une meilleure capacité à adhérer à la mucine humaine, et d'autres montrent une plus grande habilité à inhiber l'adhésion de certains pathogènes, ou à prendre la place de pathogènes déjà adhérents (Collado *et al.*, 2006). Cependant, l'adaptation au milieu acide peut entraîner de profond changement dans la susceptibilité aux antibiotiques des souches de bifidobactéries (Collado *et al.*, 2007). En effet, la résistance aux aminoglycosides, au chloramphénicol, à l'érythromycine ou à la tétracycline augmente chez plusieurs souches de *Bifidobacterium* qui ont survécu à l'exposition à des stress acides drastiques (pH 2 / 60 min) (Kheadr *et al.*, 2007).

2.1.3. Résistance au stress acide

Deux des principaux mécanismes dans la résistance au pH acide sont l'extrusion active des protons et l'alcalinisation du cytoplasme. Chez les bactéries anaérobies, l'excès de protons apparaissant dans un environnement acide est contrebalancé par l'activité de la F_0F_1 -ATPase (Matsumoto *et al.*, 2004). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse de l'ATP, ce qui permet la translocation de protons à travers la membrane cytoplasmique contre un gradient électrochimique. Donc, l'action de la F_0F_1 -ATPase maintient le pH du cytoplasme à des

valeurs physiologiques lorsque les bifidobactéries sont en conditions de pH très acides. Outre l'activité de la F_0F_1 -ATPase, la formation d'ammoniac est également un mécanisme de tolérance au pH acide largement répandu chez les bactéries. En effet, étant un composé basique, l'ammoniac peut capter un proton, conduisant à l'ion ammonium et par conséquent tamponner le cytoplasme à pH acide (Cotter and Hill, 2003) (Figure 10).

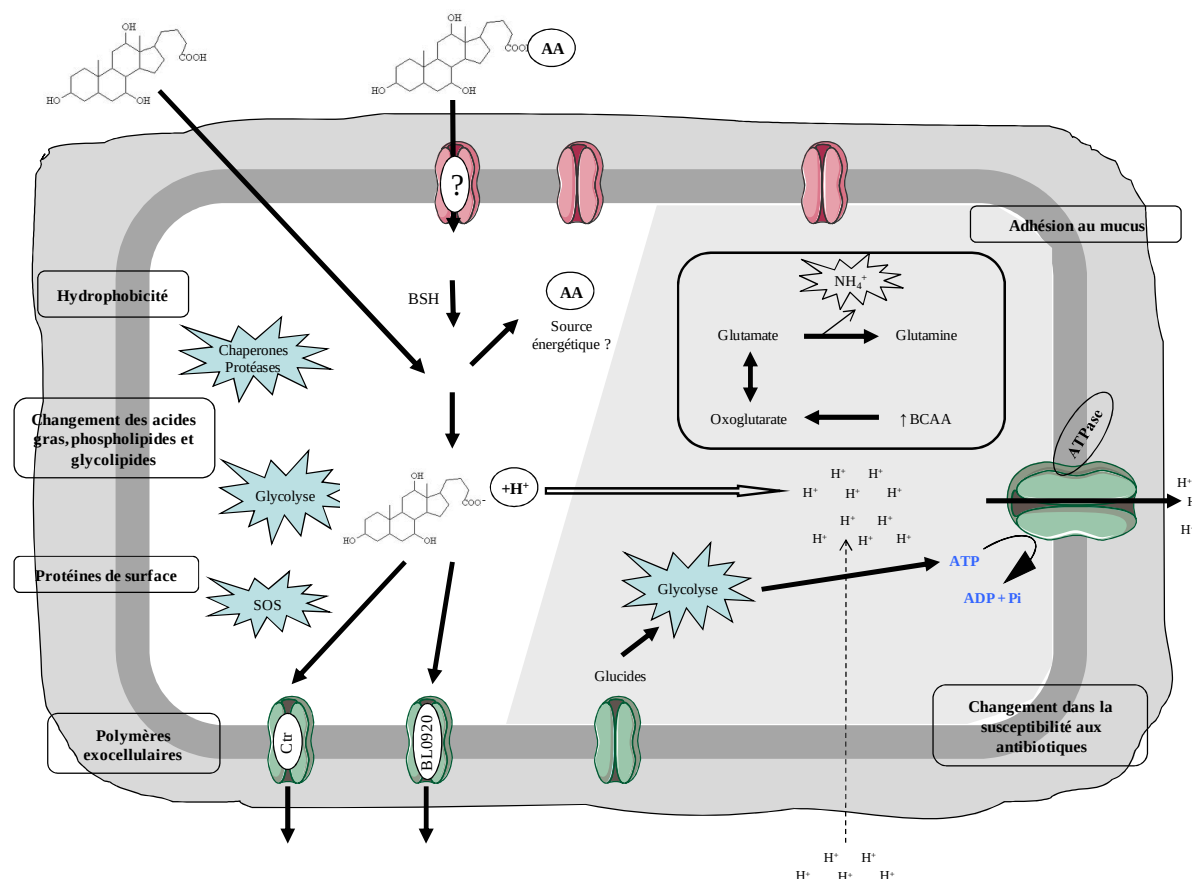


Figure 10 : Réponse aux stress acide et bile chez *Bifidobacterium*. D'après (Sanchez *et al.*, 2008).

L'activité de la F_0F_1 -ATPase est directement reliée à l'ATR chez *Bifidobacterium*, tout comme chez d'autres anaérobies ou anaérobies facultatives. L'addition de pepsine à une culture de *Bifidobacterium animalis* confère un effet protecteur contre les pH acides en facilitant l'activité de la F_0F_1 -ATPase (Matto *et al.*, 2006). La présence de glucose dans un tampon acide ralentit également la perte de viabilité de cultures de *Bifidobacterium animalis* récoltées en phase stationnaire de croissance en servant de « fuel » métabolique pour la F_0F_1 -ATPase (Sanchez *et al.*, 2006).

De plus, la quantité d'enzymes responsables de la biosynthèse des acides aminés branchés (BCAA, « Branched-Chain Amino Acids »), comme la glutamine synthétase, est augmentée chez *Bifidobacterium longum* en condition acide (Sanchez *et al.*, 2007a). Ces données

protéomiques supportent l'hypothèse que la synthèse des BCAA serait couplée à la bioconversion du glutamate en oxoglutarate ; le glutamate étant obtenu par la déamination d'une molécule de glutamine (Len *et al.*, 2004). L'ammoniac libéré par la dernière réaction servirait de tampon en condition acide en captant un proton (van de Guchte *et al.*, 2002). Ce fait est corroboré avec les expériences de physiologie dans lesquelles une plus grande concentration en valine (BCAA) et en ion ammonium a été mesurée chez des cellules de *Bifidobacterium longum* cultivées en condition acide (Sanchez *et al.*, 2007a).

2.2. Tolérance au stress biliaire

Le flux biliaire assure un rôle physiologique très important puisque facilitant la digestion des composés lipophiles provenant de l'alimentation. C'est également un agent antimicrobien influençant l'établissement du microbiote intestinal. Lors du passage dans le TGI, les bactéries résistant au stress biliaire peuvent coloniser l'intestin. La bile affecte principalement la composition lipidique et protéique de la membrane, perturbant ainsi sa fonctionnalité, mais génère également un stress oxydant au niveau de l'ADN et impacte le métabolisme des sucres (Begley *et al.*, 2005).

2.2.1. Physiologie de la bile

La bile est un mélange complexe de composés organiques et inorganiques produits dans le foie. Les constituants organiques de la bile incluent sels biliaires, cholestérol, phospholipides et protéines. De nombreuses substances endogènes (vitamines, stéroïdes, trace de métaux essentiels) et exogènes (antibiotiques, médicaments) peuvent également être détectées (Kristiansen *et al.*, 2004). La bile est synthétisée dans les hépatocytes à partir du cholestérol et quitte le foie par le canal hépatique commun qui se joint au canal cystique (provenant de la vésicule biliaire). Ils vont former le canal cholédoque qui va aboutir lors de la digestion au duodénum au niveau de l'ampoule de Vater par le biais du sphincter d'Oddi. La vésicule biliaire n'est pas essentielle dans la sécrétion de la bile mais facilite son stockage ainsi que la digestion des graisses (Begley *et al.*, 2005). Une fois dans l'intestin, la bile assure sa principale fonction physiologique, à savoir d'émulsifier les substances liposolubles (lipides, nutriments et vitamines) pour faciliter leur absorption.

Les acides biliaires représentent approximativement 50% de la fraction organique de la bile. Tous les acides biliaires synthétisés à partir du cholestérol dans les hépatocytes sont appelés acides biliaires primaires (acide cholique et acide chénodésoxycholique principalement) (Figure 11a).

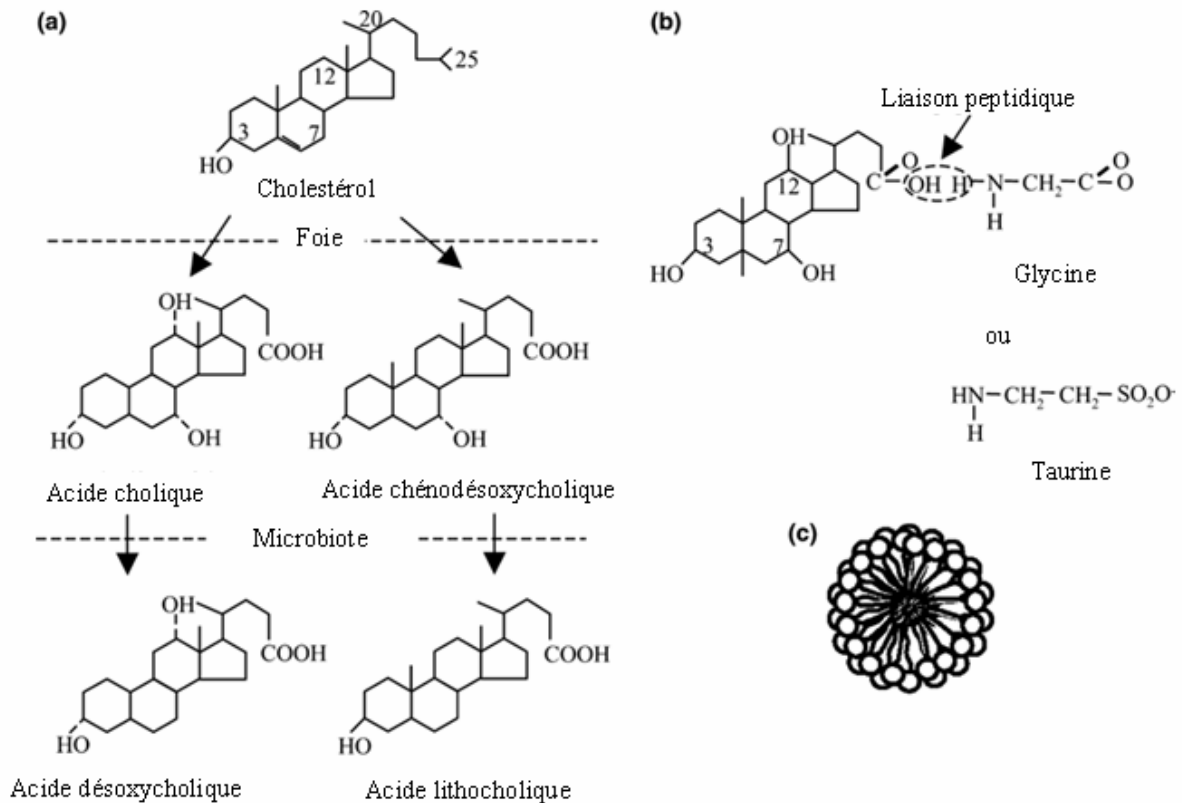


Figure 11 : (a) Structure chimiques des principaux acides biliaires. (b) Conjugaison des acides biliaires. (c) Micelles. D'après (Begley *et al.*, 2005).

Avant leur sécrétion, tous les acides biliaires subissent une conjugaison à la glycine ou à la taurine pour former des acides biliaires conjugués ou sels biliaires primaires (Figure 11b). Une fois dans l'intestin, où la digestion et l'absorption des graisses ont lieu, les acides biliaires peuvent être réabsorbés dans l'iléon distal et transportés par la veine porte vers le foie. Les sels biliaires primaires et secondaires qui en sont issus sont excrétés à nouveau dans la bile : cette voie métabolique est le cycle entéro-hépatique des sels biliaires. Cependant, une petite fraction de la bile présente dans le petit intestin échappe à cette réabsorption et se retrouve dans le colon, où elle exerce une pression de sélection sur le microbiote intestinal. De plus, dans l'iléon, sous l'action des bactéries intestinales, les acides biliaires sont déconjugés. L'acide cholique est partiellement transformé en acide désoxycholique et l'acide chénique en acide lithocholique (Figure 11a). Le désoxycholate et le lithocholate sont les

acides biliaires secondaires. Cette déconjugaison est assurée par la BSH (Bile Salt Hydrolase) qui a été retrouvée chez de nombreuses bactéries indigènes du microbiote, dont *Bifidobacterium*, mais absente chez les bactéries isolées d'environnements dans lesquels la bile est absente (Begley *et al.*, 2006). Son activité libère un acide aminé (glycine ou taurine) à partir des acides biliaires conjugués.

2.2.2. Activité antimicrobienne de la bile

La tolérance à la bile est un critère de sélection *in vitro* des bactéries probiotiques et est généralement considérée comme nécessaire pour évaluer leur aptitude à résister aux effets des acides biliaires qui conditionnent leur aptitude à survivre aux conditions du TGI et à coloniser l'environnement intestinal. Les caractéristiques physico-chimiques de la bile déterminent sa fonction physiologique et son activité antimicrobienne. Les acides biliaires sont des molécules amphiphiles avec des propriétés détergentes qui s'associent à la fois dans des environnements aqueux et organiques pour former des micelles (Figure 11c). Cette propriété est directement reliée à leur capacité à émulsifier et solubiliser les graisses. Durant le passage dans le TGI, la bile représente un paramètre clé pour les bactéries ayant survécu au passage de l'estomac et rentrant dans le petit intestin. En raison de ses propriétés détergentes, une cible privilégiée de l'action de la bile va être la surface des cellules bactériennes. En effet, l'exposition aux sels biliaires module l'expression de protéines membranaires chez *Lactobacillus plantarum* (Bron *et al.*, 2006). Cela affecte également la composition en acides gras et en phospholipides ainsi que la fonctionnalité de la membrane chez *Bifidobacterium* (Gomez-Zavaglia *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2007). Ainsi, en présence de bile, le rapport acides gras insaturés / acides gras saturés diminue significativement chez *B. animalis*. Des changements au niveau de la surface des LAB et des bifidobactéries ont également été observés en microscopie électronique (Taranto *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2007).

Le type et la structure des sels biliaires interagissant avec la membrane bactérienne est également corrélé avec sa cytotoxicité. Les sels biliaires hydrophobes sont plus toxiques puisqu'ayant une plus grande affinité avec la membrane. De plus, les sels biliaires conjugués sont des acides forts qui sont sous forme ionisée aux valeurs de pH physiologiques. Ils sont incapables de traverser la membrane plasmique, à moins qu'un transporteur soit présent. Au contraire, les acides biliaires libres sont des acides faibles qui peuvent diffuser librement à travers la bicouche lipidique (diffusion simple), grâce au gradient transmembranaire de

protons (ΔpH) et sans l'aide de transporteurs spécifiques (Kurdi *et al.*, 2003). Pour cette raison, les acides biliaires déconjugués (cholate et désoxycholate) sont plus inhibiteurs pour la cellule que les formes conjuguées.

Un autre effet délétère des sels biliaires dans la cellule est en relation avec les dégâts causés par la génération de radicaux libres (Begley *et al.*, 2005). Plusieurs études ont également montré l'action de la bile sur des macromolécules en favorisant la formation de structures secondaires aberrantes au niveau de l'ARN; ceci entraîne des modifications de la conformation et du turn-over des protéines.

2.2.3. Aspects moléculaires de la réponse au stress biliaire

Les bactéries accumulent l'acide cholique, qui diffuse passivement au travers de la membrane plasmique, impactant le métabolisme général et l'homéostasie cellulaire. L'accumulation intracellulaire d'acides biliaires déconjugués réduit le pH intracellulaire ce qui peut conduire à une dissipation du ΔpH . Ceci aura comme effet, concomitamment avec la perturbation de l'intégrité membranaire par les sels biliaires, de conduire à une fuite d'ions, de protons et d'autres composants cellulaires, pouvant entraîner la mort cellulaire. La composition de l'enveloppe et la structure de la bactérie ont également une forte influence sur la tolérance à la bile. A la fois l'adaptation et la réponse des bifidobactéries à la bile sont corrélées avec une altération dans la composition des lipides membranaires. Ces changements sont considérés comme étant responsables des modifications des caractéristiques physicochimiques de l'enveloppe cellulaire (Ruiz *et al.*, 2007). La production d'exo-polymères est également une réponse commune chez certaines bactéries, causant une modification de leurs propriétés de surface, agissant ainsi comme une couche protectrice face aux conditions environnementales, et éventuellement affectant les capacités de colonisation de l'intestin (Lebeer *et al.*, 2007; Crawford *et al.*, 2008; Denou *et al.*, 2008; Ruas-Madiedo *et al.*, 2009; Alp and Aslim). Enfin, une réponse des bactéries à l'exposition aux sels biliaires est l'induction de protéines de stress jouant un rôle dans la protection vis-à-vis du stress oxydant (Leverrier *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2005; Bron *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2007b; Sanchez *et al.*, 2008).

Indépendamment de leur niveau de résistance à la bile, les bactéries peuvent subir des mutations adaptatives en réponse à l'exposition à la bile, et développer des phénotypes de résistance stables à travers les générations (Sanchez *et al.*, 2008). Les mécanismes impliqués

dans l'adaptation à la bile semblent être souches dépendants (Begley *et al.*, 2005), bien qu'une réponse commune soit une diminution de la longueur de la cellule (Leverrier *et al.*, 2003; Margolles *et al.*, 2003). Plusieurs souches de *Bifidobacterium* ont été adaptées de façon stable aux sels biliaires, à travers une adaptation progressive après une croissance dans des extraits de sels biliaires en concentration croissante (Noriega *et al.*, 2004). De plus, l'adaptation à la bile peut permettre également de protéger les bactéries face à d'autres stress (stress acide ou thermique) (Saarela *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2006). L'adaptation à la bile chez les bifidobactéries a été corrélée à des changements stables au niveau du profil de fermentation des sucres ainsi qu'au niveau de l'activité glycosidase (Margolles *et al.*, 2003; Noriega *et al.*, 2004; Ruas-Madiedo *et al.*, 2005). Des changements au niveau de la composition en acides gras et du profil protéique membranaire (Margolles *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2007), au niveau de l'adhésion au mucus intestinal (Gueimonde *et al.*, 2005), au niveau de la compétition avec les entéro-pathogènes (Gueimonde *et al.*, 2007) et enfin au niveau de la résistance à la tétracycline (Kheadr *et al.*, 2007) ont également été observés.

Parmi les membres du genre *Bifidobacterium*, les études moléculaires sur le stress biliaire ont principalement été menées sur les espèces *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium breve*, couramment retrouvées dans les fèces humaines, ainsi que sur l'espèce *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, typiquement isolée des produits laitiers fermentés (Sanchez *et al.*, 2005; Savijoki *et al.*, 2005; Price *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2007b; Gueimonde *et al.*, 2009). La concentration inhibitrice minimale en bile a été décrite pour les *Bifidobacterium* entre 0,125% et 2% (Margolles *et al.*, 2003), bien que les différences entre les conditions expérimentales (origine de la bile, milieu de culture,...) rendent très difficile la comparaison des études. La résistance à la bile est une caractéristique souche dépendante et extrêmement variable au sein des espèces et des genres. Les mécanismes associés à cette résistance sont encore relativement méconnus.

Comme mentionné précédemment, les acides biliaires déconjugués peuvent s'accumuler passivement dans la cellule en passant librement la bicouche lipidique. Un mécanisme bien connu de résistance à la bile chez les bactéries implique l'action de pompes d'efflux, responsables de l'expulsion des sels biliaires ou d'autres composés toxiques (Gunn, 2000). Ainsi, les pompes d'efflux 4 MDR ont été décrites chez *Bifidobacterium* (Margolles *et al.*, 2003; Margolles *et al.*, 2006; Price *et al.*, 2006; Gueimonde *et al.*, 2009). L'expression de deux d'entre elles, Ctr et BL0920 chez *Bifidobacterium longum*, permet de conférer une résistance aux sels biliaires des bactéries par une activité d'extrusion de la bile.

2.3. Tolérance au stress oxydant

2.3.1. Effet de l'oxygène et des ROS sur les bactéries probiotiques

Nous aborderons dans cette partie les effets du stress oxydant sur la croissance (effet bactériostatique) puis sur la survie (effet bactéricide) des bactéries probiotiques.

2.3.1.1. Effet bactériostatique de l'oxygène

Les études menées sur le métabolisme des bactéries lactiques en présence d'oxygène, par rapport à des conditions anaérobies, ont montré un changement des produits finaux issus de la fermentation du glucose, notamment chez *Lb. plantarum* : le niveau de lactate diminue alors que l'acétate s'accumule. Le métabolisme des sucres jusqu'à l'acétate plutôt que jusqu'au lactate doublerait les quantités d'ATP (Plihon *et al.*, 1995; Jensen *et al.*, 2001). Il semblerait que les rendements de biomasse durant l'aération soient supérieurs à ceux obtenus en absence d'O₂. Ces effets sont notables quand la concentration en sucre est faible. Les vitesses de croissance de certaines bactéries lactiques sont plus rapides en présence d'O₂ qu'en son absence, spécifiquement si la peroxydase est présente pour éliminer l'H₂O₂ formé (Duwat *et al.*, 2001). La croissance aérobie permet également à certaines bactéries de métaboliser des substrats tels que le glycérol, le mannitol, qu'elles n'utilisent pas en absence d'O₂.

Une étude menée sur 12 espèces de lactobacilles a montré une diversité de réponses métaboliques de ce genre vis-à-vis de l'oxygène. Les lactobacilles peuvent être classés sur la base de leurs réponses à l'aération en 3 groupes (Buggy, 1985) :

- le groupe I : l'aération n'a pas d'effet sur le taux de croissance ou sur le rendement (*Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus* I5009) ;
- le groupe II : l'aération a un effet stimulateur sur le taux de croissance mais pas sur le rendement (*Lb. fermentum*, *Lb. helveticus* UCC, *Lb. viridescens*, *Lb. bulgaricus*) ;
- le groupe III : l'aération a un effet stimulateur initial sur le taux de croissance mais cet effet est suivi d'une inhibition due à l'accumulation d'H₂O₂ (*Lb. lactis* BYLI, *Lb. lactis* I438, *Lb. leichmanii*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*).

De plus, des auteurs ont montré que la croissance de *Lb. bulgaricus* sur milieu MRS (Marty-Teyssset *et al.*, 2000) ou milieu lait (Beshkova *et al.*, 2002) était altérée sous culture aérée et agitée. Il semblerait que l'aération déclenche chez les bactéries une entrée précoce en phase stationnaire, et entraîne une réduction notable de la production de biomasse mais sans modifier la vitesse de croissance maximum. L'entrée précoce des cellules en phase stationnaire de croissance serait due à l'accumulation de peroxyde d'hydrogène dans le milieu ; celle-ci étant 2 à 3 fois supérieure à celle retrouvée en culture non aérée.

2.3.1.2. Effet bactéricide de l'oxygène

L'oxygène a été identifié comme un des facteurs les plus importants, responsable du déclin du nombre de cellules de bactéries probiotiques telles que *Lb. acidophilus* ou *Bifidobacterium* spp. (Klaver *et al.*, 1993; Dave and Shah, 1997a; Dave and Shah, 1997b; Dave and Shah, 1997c; Shah and Lankaputhra, 1997; Miller *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2003). L'exposition des souches à l'oxygène dissous durant la fabrication et la conservation est considérée comme très néfaste à leur survie. *Lb. acidophilus* et *Bifidobacterium* spp. sont respectivement microaérophiles et anaérobies. Contrairement aux bactéries aérobies qui réduisent complètement l'oxygène en eau, le système de défense contre l'oxygène de ces bactéries probiotiques est réduit, voire absent. Le manque d'une chaîne de transport d'électrons entraîne une réduction incomplète de l'oxygène avec accumulation de peroxyde d'hydrogène. De plus, ces bactéries ne possèdent pas de catalase. L'exposition à l'oxygène cause l'accumulation de métabolites toxiques tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), le radical hydroxyle (HO°), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans la cellule et, éventuellement, conduit à la mort cellulaire (Sanders *et al.*, 1999). Les bifidobactéries sont généralement plus vulnérables que *Lb. acidophilus* aux effets néfastes de l'oxygène du fait de leur nature strictement anaérobie.

2.3.2. Réponse des bactéries probiotiques au stress oxydant

De nombreux travaux ont permis d'identifier plusieurs enzymes pouvant être présentes chez les bactéries probiotiques et réagissant avec l' O_2 ([Tableau 5](#)).

Tableau 5 : Réactions enzymatiques catalysant la réduction de l'O₂ ou des ROS chez les bactéries probiotiques.

NADH:H ₂ O ₂ oxydase	$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$
NADH:H ₂ O oxydase	$2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NAD}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$
NADH peroxydase	$\text{NADH} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$
Pyruvate oxydase	$\text{Pyruvate} + \text{phosphate} + \text{O}_2 \rightarrow \text{acétylphosphate} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
α -glycérophosphate oxydase	$\alpha\text{-glycérophosphate} + \text{O}_2 \rightarrow \text{dihydroxyacétone phosphate} + \text{H}_2\text{O}_2$
SOD	$2\text{O}_2^{\circ-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Catalase	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
NADH peroxydase	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$
Glutathion peroxydase	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
Pyruvate	$\text{Pyruvate} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Acétate} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

La majorité utilise le NADH comme molécule source d'électrons pour la réduction de l'O₂, libérant soit de l'H₂O₂ soit de l'H₂O. Chez certaines bactéries comme *Lb. bulgaricus*, *Lb. plantarum* ou *Lb. casei*, une pyruvate oxydase a été mise en évidence et permet de réduire l'O₂ grâce à l'oxydation du pyruvate en acétylphosphate. Enfin, parmi les bactéries capables d'utiliser le glycérol, comme certains entérocoques, une α -glycérophosphate oxydase permet de transformer l' α -glycérophosphate en dihydroxyacétone phosphate par réduction de l'O₂. Les ROS sont en majorité formés lors de la réduction de l'O₂ par la chaîne respiratoire. Celle-ci n'étant pas fonctionnelle chez la majorité des bactéries probiotiques, les sources de ROS sont les activités d'enzymes métaboliques telles que la NADH oxydase ou la pyruvate oxydase générant de l'H₂O₂.

Les bactéries disposent de plusieurs types de systèmes afin de garantir leur croissance et leur survie lors d'un stress environnemental, les uns permettant de limiter le stress par détoxification des agents oxydants présents dans son environnement, les autres réparant les dommages induits sur les constituants cellulaires. Elles peuvent aussi mettre en place des mécanismes cellulaires permettant le développement d'une résistance globale de la bactérie vis à vis de plusieurs stress (naturellement lors du passage en état de carence ou par induction lors de l'exposition à des niveaux sub-létaux d'un stress spécifique). Le stress oxydant étant généré par la présence de ROS, un des moyens de défense de la cellule est leur élimination afin de limiter les dégâts causés sur ses constituants cellulaires et notamment sur ses protéines, acides nucléiques et lipides membranaires. La plupart des fonctions de détoxification

sont assurées par des enzymes capables de réduire ces ROS au pouvoir oxydant élevé tels que $O_2^{\circ-}$ ou H_2O_2 en H_2O .

2.3.2.1. Les systèmes de détoxification enzymatiques

- la superoxyde dismutase (SOD) : cette enzyme catalyse la réduction de $O_2^{\circ-}$ en H_2O_2 . Cette réaction peut se faire de façon spontanée à pH physiologique ($k \sim 4.10^5 M^{-1}.s^{-1}$) mais la présence d'une activité SOD permet d'augmenter considérablement la vitesse de réduction ($k \sim 2.10^9 M^{-1}.s^{-1}$). Chez les bactéries lactiques, l'activité enzymatique SOD n'est présente que chez certaines souches seulement. L'activité SOD peut protéger la cellule en présence de H_2O_2 grâce à l'élimination des $O_2^{\circ-}$ qui pourraient en réduisant le fer, former du Fe^{2+} disponible pour générer des radicaux OH° en réagissant avec le H_2O_2 . De plus, la présence de SOD permet d'améliorer sa survie à long-terme en phase stationnaire. Cependant cette meilleure conservation n'est plus possible à 4 °C, sûrement du fait de l'inhibition de l'enzyme par la basse température (Bruno-Barcena *et al.*, 2005).

- la catalase : la catalase réduit H_2O_2 en H_2O et O_2 . Cette réaction ne requérant pas de source réductrice et ne nécessitant pas de consommation d'ATP, la cellule est donc capable de lutter contre le stress oxydant qu'elle soit dans un état non-énergisé, métaboliquement inactif ou non. Les bactéries lactiques ont longtemps été considérées comme des organismes dépourvus de catalase. Mise à part la souche de *Lb. plantarum* ATCC14431, il semble que certaines bactéries lactiques possèdent dans leur génome des gènes spécifiant des catalases héminiques. Cependant, dans l'impossibilité de synthétiser l'hème, elles sont dépendantes d'une source exogène. L'ajout de catalase est couramment utilisé en industrie pour éliminer l' H_2O_2 . En effet, celui-ci est employé dans certains procédés de stérilisation du lait (nommée la pasteurisation « froide ») et doit être éliminé afin de permettre la croissance des ferments lactiques.

- La NADH peroxydase : contrairement aux catalases, les NADH peroxydases sont dépendantes du pouvoir réducteur de la bactérie car la catalyse enzymatique nécessite l'oxydation du co-facteur NADH. Chez les bactéries lactiques, cette enzyme permet de compenser l'absence de catalase en éliminant l' H_2O_2 produit en aérobiose par le métabolisme cellulaire.

- la glutathion peroxydase : il existe d'autres types de peroxydase utilisant un autre co-facteur que le NADH. Ainsi, le GSH, un tripeptide (Glu-Cys-Gly) possédant un groupement thiol, peut servir de donneur d'électron dans la réduction du H_2O_2 en H_2O . Le GSH oxydé (GSSG) est ensuite régénéré grâce à l'activité GSH réductase qui utilise le NAD(P)H comme co-facteur (Figure 12).

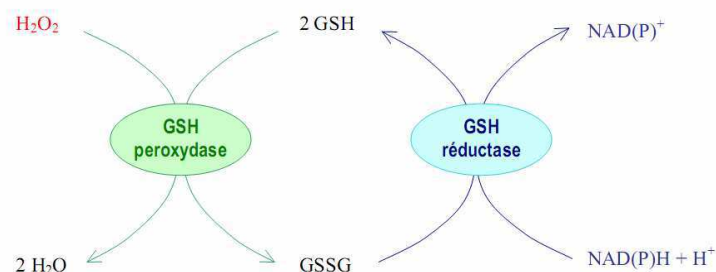


Figure 12 : Elimination du H_2O_2 par le système Glutathion (GSH) peroxydase/ GSH réductase.

Une étude a permis de montrer que, si *L. lactis* est incapable de synthétiser le GSH, elle possède un système GSH peroxydase/GSH réductase. La présence de GSH dans le milieu de culture conduit à une forte accumulation intracellulaire qui confère à la bactérie une meilleure résistance au H_2O_2 .

- l'alkyl hydroperoxyde réductase : L'élimination des peroxydes organiques est catalysée par l'alkyl hydroperoxyde réductase (Ahp), une peroxydase dépendante du NADPH. Cependant, une activité Ahp fonctionnelle n'a été identifiée que chez la bactérie lactique *S. mutans* (Higuchi *et al.*, 1999).

2.3.2.2. Les systèmes de détoxification non enzymatiques

Parallèlement aux enzymes antioxydantes catalysant des réactions d'élimination des ROS, il existe des modes de détoxification non enzymatiques. Les bactéries peuvent réduire leur compartiment intracellulaire. Cette fonction est en majorité assurée par deux systèmes : le GSH (nécessitant la présence de GSH réductase pour perdurer) et la thioredoxine (Trx). Les thioredoxines sont des petites protéines qui contiennent un site actif formé, entre autre, de deux cystéines porteuses de groupements thiols. Ainsi, lorsqu'ils sont sous forme réduite SH, ces thiols peuvent s'oxyder en induisant la réduction du H_2O_2 . La thioredoxine réductase, se charge par la suite de la réduction des thioredoxines oxydées (Arnér and Holmgren, 2000). Des gènes codant une Trx réductase ont été identifiés chez plusieurs espèces de lactobacilles. Chez *L. lactis*, qui est dans l'incapacité de synthétiser le GSH, le système Trx/Trx réductase

semble être le seul à pouvoir maintenir un équilibre dans l'état d'oxydoréduction des thiols cytoplasmiques. De plus, en l'absence de SOD, certaines espèces de bactéries lactiques utilisent le manganèse pour éliminer l' $O_2^{\circ-}$. Récemment, l'analyse du génome de *Lb. plantarum* WCFS1 a permis d'identifier cinq systèmes de transport du manganèse : un transporteur ATPase Mn^{2+}/Cd^{2+} spécifique (MntA), trois transporteurs de type Nramp (mntH1, mntH2 et mntH3) et un ABC transporteur (mtsCBA) (Watanabe *et al.*, 2012). La présence de pyruvate, qui est capable d'éliminer l' H_2O_2 non enzymatiquement, ainsi que de vitamines A, C ou E est également un moyen de detoxication non enzymatique chez les bactéries probiotiques.

2.3.3. Cas particulier des bifidobactéries

La majorité des bifidobactéries sont anaérobies et sont incapables de former des colonies sur milieu gélosé sans ajout d'un composé redox comme la cystéine. Cependant, des différences dans la tolérance à l'oxygène ont été reportées en fonction des souches (Tableau 6) (Shimamura *et al.*, 1992).

Tableau 6: Bifidobacterium et résistance à l'oxygène. D'après (Simpson *et al.*, 2005)

Espèces	Résistance à l'oxygène
<i>B. adolescentis</i>	Faible
<i>B. angulatum</i>	Faible
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Modérée
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Modérée
<i>B. bifidum</i>	Faible
<i>B. breve</i>	Modérée
<i>B. longum</i> biotype <i>infantis</i>	Faible
<i>B. longum</i> biotype <i>longum</i>	Faible
<i>B. psychraerophilum</i>	Forte

Pour lutter contre l'accumulation d'espèces oxydantes de type ROS, les bifidobactéries ont principalement recours à des mécanismes comme le système NADH oxydase. En effet, le séquençage de bifidobactéries n'a montré aucun gène de catalase ou de superoxyde dismutase (SOD), mais a confirmé la présence d'un gène analogue de la NADH oxydase (Lee and O'Sullivan, 2010). Cependant, aucun gène codant pour la NADH peroxydase n'a été trouvé

dans le génome des bifidobactéries, à l'exception de *Bifidobacterium adolescentis*. Des gènes analogues de complexes alkyl hydroxyde réductase (AhpR), composés d'une NADH oxydase nommée AhpF et d'une peroxyredoxine nommée AhpC, ont été identifiés dans le génome des bifidobactéries (Lee and O'Sullivan, 2010) (Figure 13).

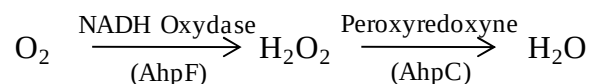


Figure 13 : Complexes alkyl hydroxyde réductase (AhpR)

Par ailleurs, le séquençage a mis en évidence des gènes analogues codant pour des enzymes de type thioredoxine et thioredoxine réductase (Lee and O'Sullivan, 2010). Des gènes analogues de *oxyR* ont été retrouvés dans le génome des bifidobactéries. Chez *E. coli*, ces gènes codent pour la protéine OxyR qui fonctionne comme un activateur transcriptionnel de gènes de détoxification, de protection de l'ADN ou d'activité antioxydante et qui est activée par la présence de peroxyde dans la cellule. Enfin, l'analyse du génome de *Bifidobacterium longum* a mis en évidence la présence d'un gène susceptible de coder pour un facteur sigma alternatif (Klijn *et al.*, 2005). Les facteurs sigma sont mis en jeu dans la régulation de gènes et plus particulièrement de gènes impliqués dans la réponse au stress. Ces facteurs pourraient ainsi intervenir dans l'activation de gènes spécifiques impliqués dans la protection contre les ROS ou dans la réparation des dommages oxydants. Par ailleurs, les bifidobactéries ne semblent pas produire de molécules dites anti-oxydantes (acide ascorbique et tocophérol) (Lee and O'Sullivan, 2010). Par conséquent, leur relative résistance aux attaques oxydantes pourrait en partie s'expliquer par l'intervention de mécanismes dits passifs. Cette protection passive impliquerait notamment les thiols exofaciaux en raison de leurs propriétés réductrices.

2.3.4. Implication des thiols exofaciaux dans la défense anti-radicalaire

Les groupements thiols (ou groupements sulfhydryles) peuvent exister sous deux formes : une forme protonée inactive (thiol ou SH) et une forme ionisée active (thiolate ou S⁻). Ces fonctions, essentiellement portées dans la cellule par le résidu cystéine, ont à la fois un rôle structural (organisation des protéines par la formation de ponts disulfures) et fonctionnel (résidus clés de sites catalytiques d'enzymes). Les thiols apparaissent comme un moyen de résistance face au stress oxydant. En effet, grâce à leurs capacités réductrices, les groupements sulfhydryles présents au niveau des protéines thioredoxines sont indispensables

au maintien de conditions réductrices dans le cytoplasme des cellules. Ainsi, lorsqu'on incorpore un plasmide permettant la synthèse de GSH chez *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, sa résistance au stress oxydant est augmentée (Fu *et al.*, 2006b), effet d'autant plus important chez le mutant dépourvu de SOD. Le GSH est un tripeptide composé en partie d'un résidu cystéine. Sous sa forme réduite, le groupement thiol du GSH lui permet de réduire les radicaux oxygénés pouvant avoir des effets délétères. Ainsi, les thiols portés par les cystéines des protéines apparaissent comme des réducteurs des composés oxydants et ont donc une fonction non négligeable dans la défense face aux environnements oxydants.

Par ailleurs, chez certaines espèces les thiols exofaciaux (c'est-à-dire présents sur la membrane externe) jouent un rôle déterminant dans leurs capacités anti-oxydantes. En effet, une étude menée chez *Saccharomyces cerevisiae* a montré qu'en bloquant les groupements –SH à la surface des cellules, la capacité anti-oxydante totale (TAC) de la levure diminuait considérablement. Il semble alors exister une étroite relation entre la présence de ses thiols exofaciaux et ses capacités antioxydantes (Balcerczyk and Bartosz, 2003). Outre leur activité antioxydante, les thiols exofaciaux permettent à certaines espèces bactériennes d'agir sur leur microenvironnement en modifiant le potentiel redox de celui-ci. En effet, *Lc. lactis* réduit le E_h du milieu jusqu'à des valeurs très réductrices (-200 à -250 mV) (Michelon *et al.*, 2010). Cet effet est principalement dû à la présence de groupements thiols exofaciaux. Par conséquent, les fonctions thiols et notamment celles présentes sur la membrane externe des bifidobactéries (thiols exofaciaux) pourraient être un moyen de défense passif contre les espèces oxydantes et ainsi constituer une première barrière de protection. Les différents effets de l'exposition à l'oxygène ainsi que les mécanismes de défenses associés chez les bifidobactéries sont résumés [Figure 14](#).

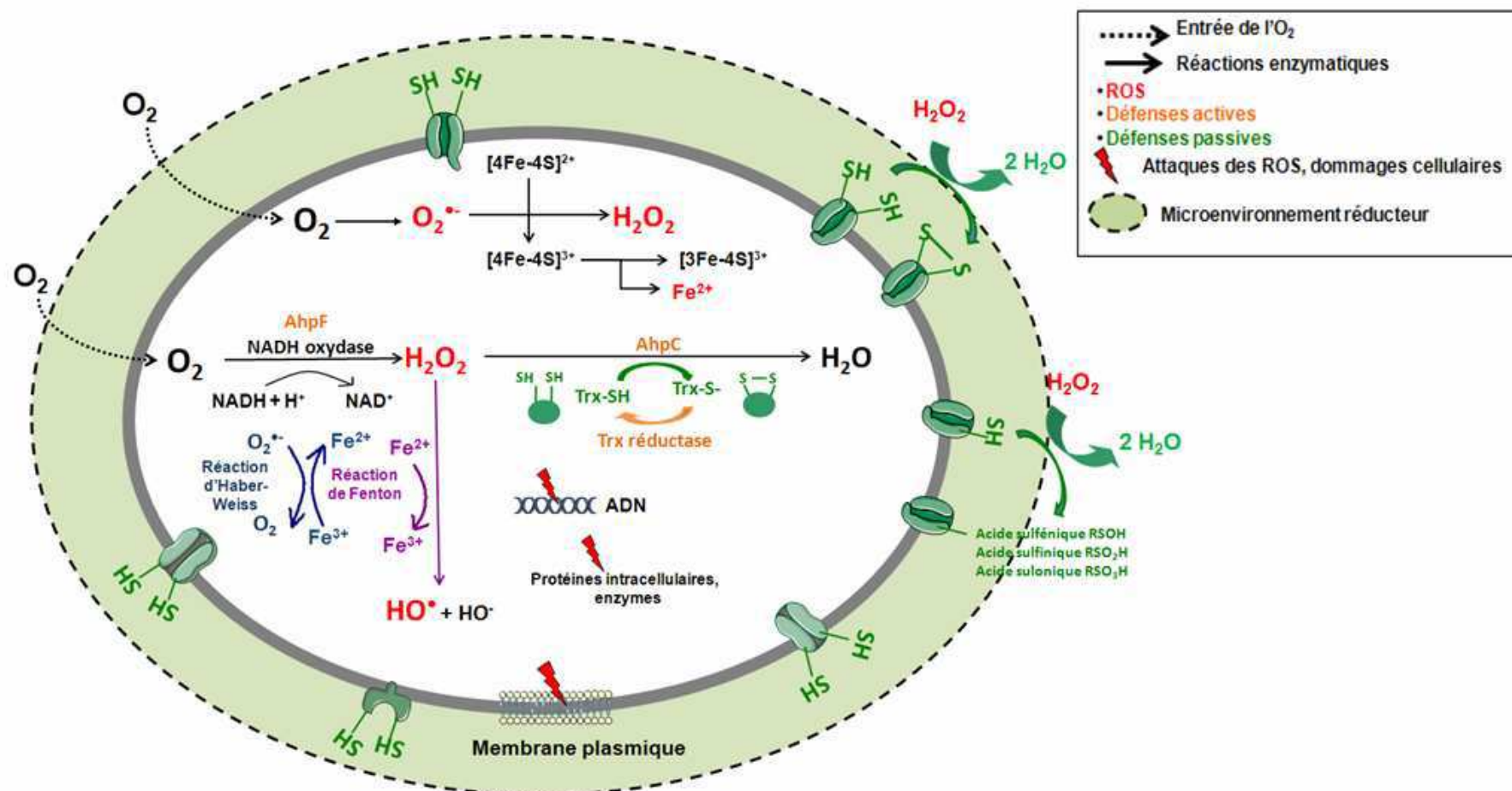


Figure 14 : Schéma récapitulatif des effets de l'exposition à l'oxygène et des défenses engagées contre le stress oxydant chez les bifidobactéries

Conclusion : Les études menées sur la réponse aux stress acides et biliaires de *Bifidobacterium* sont assez nombreuses dans la littérature. Cette bactérie, bien que très sensible à ces stress, est capable de mettre en place des réponses actives. Ceci peut se traduire par une réponse ATR, une plus forte activité de la F_0F_1 -ATPase ou une biosynthèse d'acides aminés branchés dans le cas d'un stress acide. Des protéines de stress, la BSH ou des pompes d'efflux peuvent quant à elles intervenir lors d'un stress biliaire. Pour les deux stress, des phénomènes d'adaptation de la bactérie ont également été constatées. Cependant, les réponses des bifidobactéries face à un stress oxydant ne sont pas autant décrites dans la littérature. Ces bactéries, anaérobies strictes, semblent dépourvues d'enzymes majeures de détoxification de l'oxygène et de ses dérivés actifs (notamment la SOD et la catalase). Elles possèdent néanmoins des gènes analogues d'enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydant, mais leur fonctionnalité n'est pas encore clairement mise en évidence. La membrane cellulaire pourrait cependant jouer un rôle majeur dans la protection de *Bifidobacterium* face au stress oxydant. Les phénomènes d'adaptation ne sont pas décrits dans la littérature pour *Bifidobacterium*. La modulation de l'environnement oxydo-réducteur de cette bactérie semble être un point clé pour sa survie et donc pour son industrialisation en tant que probiotique. De plus, aucune étude dans la bibliographie ne relie l'impact des stress rencontrés par les probiotiques à leur fonctionnalité.

3. Le Potentiel Redox

3.1. Oxydoréduction et système biologique

Le potentiel d'oxydoréduction (E_h), au même titre que le pH, est un paramètre d'état des milieux biologiques ; celui-ci indique la capacité du milieu à capter ou à céder des électrons. Ce concept n'est pas nouveau mais n'a suscité en tant que tel que peu d'attention comme paramètre de contrôle des procédés de fermentation en raison de la nature délicate de sa mesure. Pourtant, le E_h est déjà indirectement pris en compte en milieu industriel au travers de l'oxygène dont l'effet inhibiteur sur les bactéries lactiques est bien identifié.

3.1.1. Définition et mesure

3.1.1.1. Définition

L'**oxydation** est la réaction au cours de laquelle une molécule ou un ion cède des électrons.

La **réduction** est la réaction au cours de laquelle une molécule ou un ion gagne des électrons.

L'**oxydant** est une espèce chimique capable de fixer un ou plusieurs électrons.

Le **réducteur** est une espèce chimique capable de céder un ou plusieurs électrons.

De même que le pH définit les caractéristiques acido-basiques d'une solution, le E_h en définit les caractéristiques réductrices et oxydantes.

Le potentiel standard d'un couple redox nous informe sur sa capacité à céder ou à capter des électrons. Soit la demi réaction suivante : $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$

L'équation de Nernst associe un E_h à un couple redox Ox/Red :

$$E_h = E_h^0 + 2.3 \times \left(\frac{RT}{nF} \right) \times \log \left(\frac{[Ox]}{[Red]} \right)$$

avec E_h : potentiel redox (V) (par rapport à l'électrode à hydrogène)

E_h^0 : potentiel redox standard (V) (par rapport à l'électrode à hydrogène) dans des conditions standards ($P = 101325$ Pa, $T = 298$ K, $pH = 0$, $[Ox] = [Red] = 1$ M),

R : la constante des gaz parfaits ($8,31 \text{ J.K}^{-1}.\text{mole}^{-1}$),

T : la température absolue (K),

n : le nombre d'électrons mis en jeu,

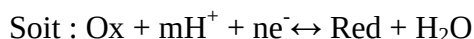
F : la constante de Faraday (96 500 C.mol⁻¹),

$[Ox]$: l'activité de la forme oxydée de l'espèce (mol.L⁻¹),

$[Red]$: l'activité de la forme réduite de l'espèce (mol.L⁻¹).

$$2.3 \times \frac{RT}{F} = 0,059 \text{ V (à } 25 \text{ °C)}$$

Or, les réactions chimiques en milieu aqueux font intervenir des protons (m).



On écrit alors :

$$E_h = E_h^0 - 2.3 \times \left(\frac{mRT}{nF} \right) \times pH + 2.3 \times \left(\frac{RT}{nF} \right) \times \log \left(\frac{[Ox]}{[Red]} \right)$$

Cette équation met en évidence la dépendance du E_h vis à vis du pH.

L'équation de Leistner et Mirna (Leistner and Mirna, 1959) permet de ramener le E_h d'un milieu à un pH (x) donné à sa valeur à pH 7 :

$$E_{h7} = E_{hx} - \alpha \cdot (7 - x)$$

avec : E_{h7} : le potentiel d'oxydoréduction à pH 7 et à 25 °C,

E_{hx} : le potentiel d'oxydoréduction à pH x et à 25 °C,

x : le pH du milieu à 25 °C,

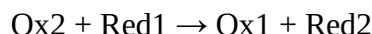
$$\alpha = \frac{2,3mRT}{nF} = 40 \text{ mV} \text{ coefficient de Nernst moyen dans le lait (Cachon } et al., 2002).$$

Cette correction par rapport au pH a été déterminée pour les couples redox faisant intervenir l'échange d'un même nombre de protons et d'électrons (m/n=1). Cependant, la stœchiométrie des couples redox dans un milieu alimentaire est inconnue; il convient donc de déterminer ce coefficient expérimentalement. Dans le Tableau 7 sont présentés les potentiels standard E^0 et E'^0 (valeur de E^0 à pH 7) de couples redox importants dans les systèmes d'oxydoréduction biologiques.

Tableau 7 : E^0 et E'^0 de différents couples redox en mV à 25 °C (Vanysek, 1994).

Couples oxydoréducteurs	E^0 (mV)	E'^0 (mV)
$H_2O_2 + 2 H^+ + 2 e^- \rightleftharpoons 2 H_2O$	+1776	+1362
$O_2 + 4 H^+ + 4 e^- \rightleftharpoons 2 H_2O$	+1229	+815
$Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + e^-$	+771	+771
Ac. dehydroascorbique + 4 H^+ + 4 $e^- \rightleftharpoons$ Ac. ascorbique	+472	+58
$GSSG + 2H^+ + 2 e^- \rightleftharpoons 2 GSH$ (G=Glutathion)	+183	-230
$CSSC + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2 CSH$ (C=Cystéine)	+74	-340
$2 H^+ + 2 e^- \rightleftharpoons H_2$	0	-414
$Fe \rightleftharpoons Fe^{2+} + 2e^-$	-440	-440

En effet, dans une réaction d'oxydoréduction le réducteur s'oxyde (réaction d'oxydation) alors que l'oxydant se réduit (réaction de réduction). L'oxydo-réduction se compose donc de deux demi-réactions : une oxydation et une réduction pouvant faire intervenir deux couples redox selon la réaction suivante :



3.1.1.2. Mesure potentiométrique

La détermination du E_h repose sur la mesure d'une force électromotrice entre une électrode métallique inattaquable et une électrode de référence immergées dans le milieu à étudier.

Dans la pratique, ces deux électrodes sont pour la plupart du temps combinées. La mesure se fait pratiquement sans courant, sans modifier la composition du milieu et correspond à la différence de potentiel qui existe entre les deux électrodes. Pendant la formation du potentiel redox, des électrons sortent de l'électrode de mesure vers le système redox ou inversement, formant un courant entre le milieu à mesurer et l'électrode de référence, un voltmètre placé sur le circuit électrique reliant les deux électrodes permet de mesurer le potentiel d'oxydoréduction.

➤ *Les électrodes de mesure*

Le métal de l'électrode de mesure agit comme un accepteur ou un donneur d'électrons. Le métal de l'électrode est constitué le plus souvent d'or ou de platine et peut être de formes différentes. Ces deux métaux présentent des potentiels standards suffisamment élevés : Pt^{2+}/Pt (1118 mV) et Au^{3+}/Au (1498 mV) pour être électrochimiquement inertes vis-à-vis du milieu étudié (Vanysek, 1994). Ces deux métaux n'échangent pas d'électrons avec la solution à mesurer.

L'utilisation du platine est cependant généralisée pour les mesures de potentiel à courant nul dans les milieux naturels. Ceci s'explique essentiellement par les courants standards élevés du platine ajouté à des propriétés catalytiques ; l'or étant préféré pour les milieux très oxydants (Bühler and Galster, 1980). Le platine présente également un temps de réponse plus rapide que l'or avec des solutions diluées et il permet une fabrication d'électrode plus robuste ce qui a contribué à sa préférence.

➤ Les électrodes de référence

Une électrode de référence est nécessaire car on mesure la tension apparaissant entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence.

Il existe principalement trois types d'électrodes de référence (Figure 15) :

- hydrogène : $H^+ + e^- \leftrightarrow \frac{1}{2}H_2$
- argent/chlorure d'argent : $AgCl + e^- \leftrightarrow Ag + Cl^-$
- calomel : $Hg_2Cl_2 + 2e^- \leftrightarrow 2Hg + 2Cl^-$

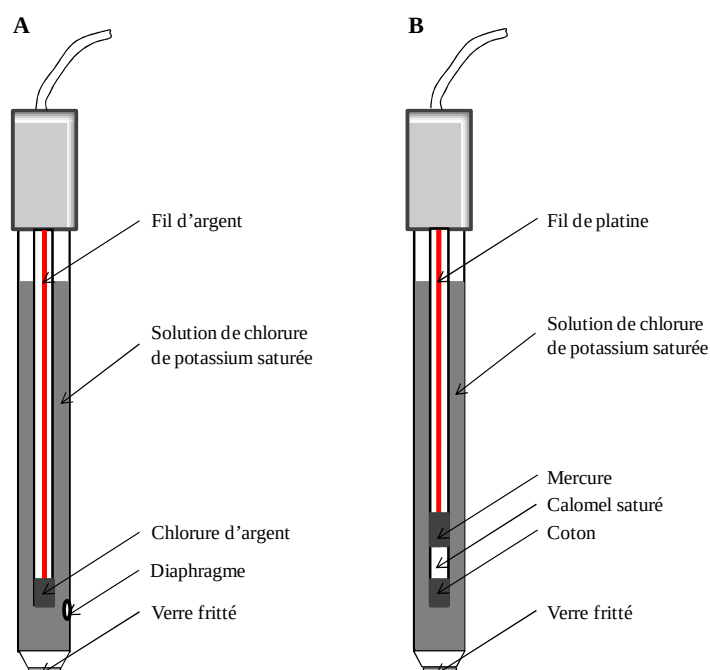


Figure 15 : Les deux principales électrodes utilisées couramment. A : Electrode argent/chlorure (Ag/AgCl). B : Electrode au calomel (Hg/HgCl₂).

Pour toutes ces électrodes, le potentiel est constant lors des mesures ; il est basé sur un couple oxydoréducteur dont les concentrations sont constantes. L'électrode à hydrogène est une électrode à gaz. Elle n'est pas utilisée dans les montages habituels pour des raisons pratiques mais conserve un intérêt théorique important. Les deux autres électrodes de références sont constituées d'un métal recouvert d'un sel peu soluble du même métal plongé dans une solution contenant l'anion de ce sel à une concentration donnée (= électrolyte de référence). L'électrode Ag/AgCl est la plus utilisée car elle ne possède pas de mercure. Il existe un très grand nombre de capteurs combinés redox adaptés à de nombreuses conditions environnementales (Figure 16).

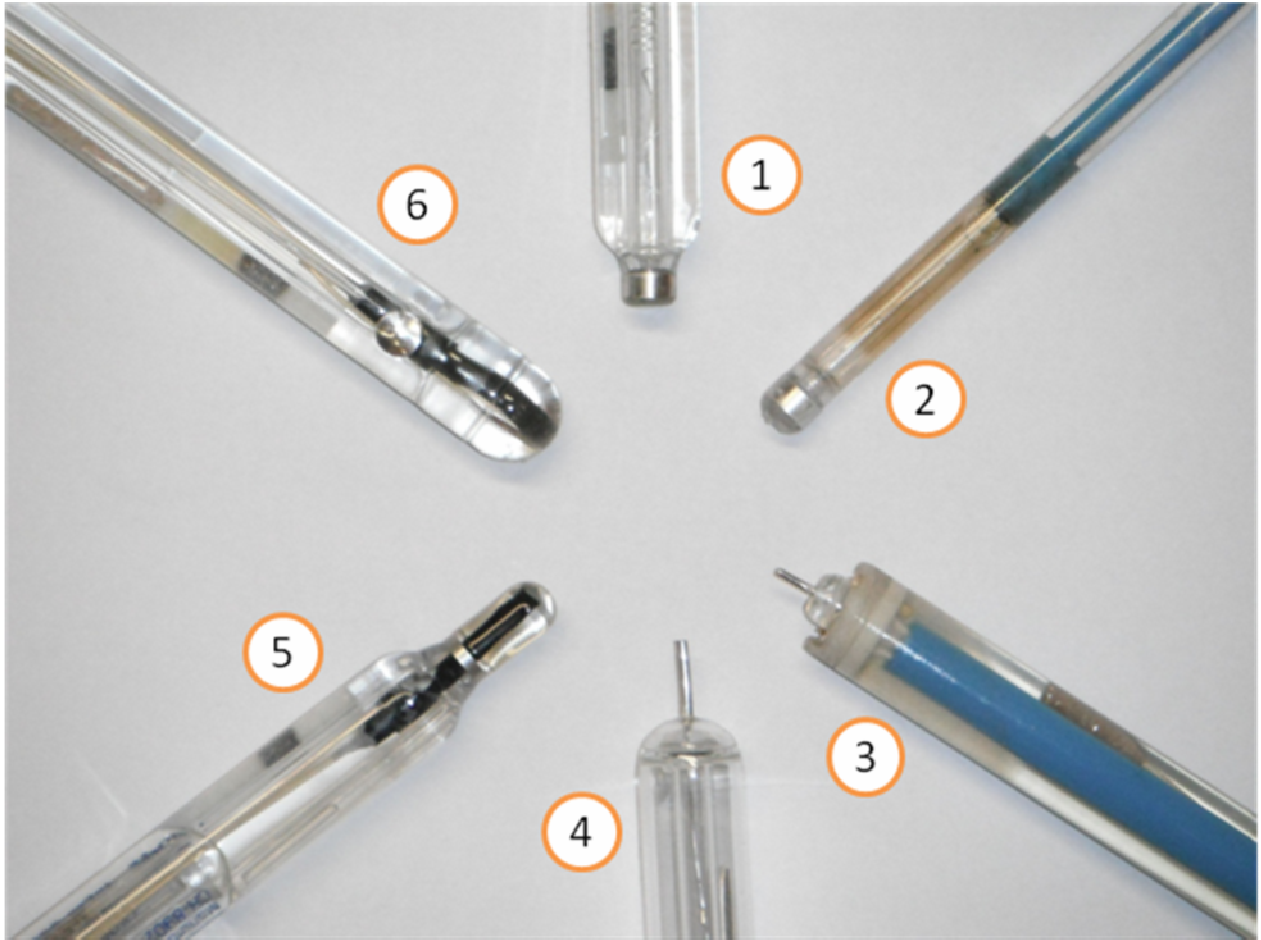


Figure 16 : Différents types d'électrodes redox combinées (Cachon and De Coninck, 2011). ① Ø=12 mm, à calotte platine ; ② Ø=6 mm, à calotte de platine ; ③ et ④ Ø=12 mm à pointe de platine ; ⑤ Ø=12 mm, à anneau de platine ; ⑥ Ø=12 mm, à disque de platine. Les électrodes ⑤ et ⑥ sont des capteurs multi-paramètres : rédox, pH et température.

➤ *Expression des résultats*

Un E_h est exprimé par rapport à l'électrode de référence à hydrogène, donc :

$$E_h = E_m + E_r$$

avec : E_h : le potentiel mesuré exprimé par rapport à l'électrode à hydrogène (mV),

E_m : le potentiel mesuré exprimé par rapport à l'électrode de référence (mV),

E_r : le potentiel de l'électrode de référence exprimé par rapport à l'électrode à hydrogène (mV), ce dernier est fonction de la température (ainsi, pour l'électrode argent/chlorure d'argent, 207 mV à 25 °C et pour l'électrode à calomel : 244 mV à 25 °C).

Cachon propose des équations remodelées pour corréler E_r et température (Cachon and De Coninck, 2011) :

$$\text{Ag/AgCl} : E_r = 207 + 0,8 \times (25 - T)$$

$$\text{Calomel} : E_r = 244 + 0,7 \times (25 - T)$$

3.1.1.3. Mesure à l'aide d'indicateurs colorés

La mesure du E_h à l'aide d'indicateurs colorés redox (ICR) peut être utilisée lorsque les techniques potentiométriques habituelles ne sont plus adaptées (contaminant redox, faible courant d'échange, système redox en déséquilibre...) ou difficiles à mettre en place (activités redox dans des sédiments). Les ICR, qui sont pour la plupart des indophénols ou des dérivés d'indigo, sont composés à la fois d'une forme oxydée et d'une forme réduite constituant un couple redox réagissant selon une réaction redox standard (Figure 17).

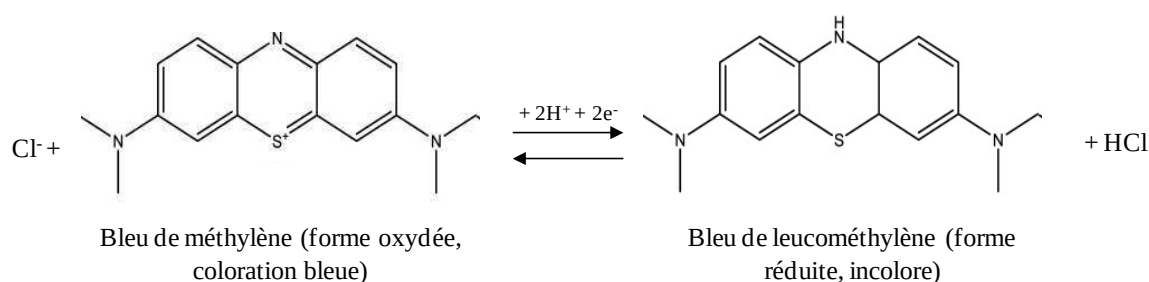


Figure 17 : Exemple de la réaction d'un indicateur coloré redox indigo ou dérivé.

Ainsi, l'équation de Nernst peut être appliquée à ces couples redox. L'intensité de coloration des indicateurs colorés redox va être dépendante de l'équilibre redox de l'indicateur coloré redox. Comme chaque couple redox, les indicateurs colorés redox sont caractérisés par un potentiel redox standard (E_h^0) (Tableau 8) et le pourcentage d'oxydation de l'indicateur sera proportionnel à l'intensité de la coloration.

Tableau 8 : Indicateurs colorés d'oxydoréduction et leur potentiel standard à pH7 et 30 °C (Tratnyek et al., 2001)

Indicateurs colorés redox	$\lambda_{\text{max}}^{\text{ox}}$ (nm) ^a	$\lambda_{\text{max}}^{\text{red}}$ (nm) ^a	E_h' (mV)	E_h^0 (mV)	pKa ^b
2,6-Dichlorophenol	601 bleu	256 leuco	+668	+228	8.1 (o1), 9.4 (r1), 10.6 (r2)
Bleu de méthylène	663 bleu	253 leuco	+532	+11	11.0 (o1), 4.5 (r1), 5.3 (r2)
Résazurine/resorufin	600 pourpre	569 rose	ND	ND	6.9 (o1)
Resorufin/dihydroresorufin	569 rose	293 leuco	+380	-51	6.9 (o1), 9.3 (r1), 10.0 (r2)
Indigo disulfonate	610 bleu	407 jaune	+291	-125	12.3 (o1), 12.8 (o2), 7.4 (r1), 12.1 (r2)
Indigo tisulfonate	600 bleu	421 jaune	+332	-81	11.7 (o1), 12.8 (o2), 7.2 (r1), 12.1 (r2)
Indigo tetrasulfonate	589 bleu	433 jaune	+365	-46	11.9 (o1), 12.9 (o2), 7.0 (r1), 11.8 (r2)
Phenosafranine	516 rouge	249 leuco	+280	-252	5.0 (r1), 5.8 (r2)

^a Maximum d'absorbance et couleur de la forme oxydée et réduite déterminée en eau déionisée

^b pKa pour les formes oxydées (o1, o2) et réduites (r1, r2).

ND : données non disponibles du fait que le couple n'est pas réversible

Ainsi, la mesure de la coloration par spectrophotomètre permettra *via* l'équation de Nernst de donner une estimation assez précise du E_h . Par ailleurs, le pH du système redox est un élément capable de modifier et d'influencer les propriétés redox de l'indicateur (les protons H^+ interviennent dans la réaction redox, [Figure 17](#)) ce qui aura pour conséquence de déplacer sa fenêtre de virage. Les indicateurs colorés redox peuvent donc être également utilisés comme indicateur coloré pH, car leurs états de coloration sont également sensibles au pH. Dans les environnements où le pH va être amené à évoluer, leur utilisation comme indicateurs colorés redox va être difficile voire impossible.

Parmi ces indicateurs colorés redox, les plus utilisés dans l'industrie laitière sont la rézasurine et le bleu de méthylène. Le test de réduction de la rézasurine en résosfurine est utilisé depuis les années 1950 comme indicateur d'une contamination microbiologique (levure et/ou bactéries) dans le lait (laits paucimicrobiens) mais également dans les fluides biologiques (O'Brien *et al.*, 2000). Le bleu de méthylène est utilisé durant la fermentation du lait comme un indicateur d'anaérobiose (élimination de l'oxygène par les bactéries) et de la formation de composés réducteurs par le métabolisme microbien. Lorsque la couleur bleue disparaît, cela traduit un environnement anaérobiose et une croissance importante de la flore bactérienne.

Cependant, l'utilisation des ICR comme moyen de mesure du E_h est très limitée, surtout en milieu biologique ou alimentaire, car ils influencent les réactions et peuvent déplacer les équilibres ; ils peuvent également catalyser certaines réactions biologiques ou en inhiber d'autres, et l'équilibre entre forme oxydée et réduite (et donc la coloration) peut varier en fonction du pH. Ils sont utilisés principalement comme indicateurs du seuil du E_h , notamment dans la fabrication des milieux de culture en anaérobiose stricte (rézasurine), où le maintien d'un niveau minimum de réduction est obligatoire pour la croissance de micro-organismes anaérobies.

3.1.1.4. Mesure du E_h à l'aide des sels de tétrazolium

- Structure et réaction

Les sels de tétrazolium sont des composés incolores à l'état oxydé qui deviennent très colorés (rouge, pourpre, violet, bleu) lorsqu'ils sont réduits en formazan. Ils sont principalement utilisés pour caractériser des activités redox cellulaires : indicateur de viabilité, marquage histochimique et mesure d'activité biochimique. Les sels de tétrazolium sont composés d'un

cycle tétrazole (fermé par un azote quaternaire) pour les sels monotétrazolium et deux cycles tétrazoles pour les sels ditétrazolium liés par des groupes aromatiques de type phényle. Ils existent de nombreuses formes dérivées de sels tétrazolium qui diffèrent par la nature des groupements aromatiques (type phényle) liés sur les positions 1, 2, 3, 4 de cette structure centrale.

Il s'agit généralement de composés solubles en solution aqueuse. Leurs réductions s'effectuent par l'addition de protons H^+ et cette réaction est irréversible. Elle provoque une ouverture du cycle tétrazole conduisant à la formation d'une molécule de formazan insoluble en milieux aqueux. Les molécules de formazan sont intensément colorées. Leur couleur varie du jaune au rouge (MTT, INT, TV, TTC...) ou fluorescent (CTC) pour les monoformazans et du bleu au noir pour les diformazans (TNBT, BT...). Les molécules de formazans peuvent être solubilisées par des solvants organiques pour être quantifiées par spectrophotométrie (acétone). Cependant une nouvelle génération de sels de tétrazolium forme après réduction des composés de formazans solubles en solution aqueuse (XTT, MTS dérivés de WST) directement mesurable en spectrophotométrie.

- Utilisation en microbiologie

En microbiologie, les deux catégories de sels de tétrazolium (formazan insoluble / liposoluble et formazan hydrosoluble) sont utilisées, soit directement dans les milieux nutritifs de cultures soit dans les milieux non-nutritifs pour les cellules quiescentes. La première catégorie de sels de tétrazolium (formazan insoluble et membrane plasmique perméable) est généralement utilisée comme indicateur de l'activité redox cellulaire ou de viabilité. Ils sont employés dans les études de résistances ou de dégradations des solvants (Finette *et al.*, 1984; Hayashi *et al.*, 2003), de sensibilité à des composés toxiques (Dinamarca *et al.*, 2007) ou des antibiotiques (Salama *et al.*, 1995) et dans l'utilisation spécifique de substrat (Lin *et al.*, 2008). Ils sont également capables de discriminer les bactéries viables dans une population de bactéries aérobies (Rodriguez *et al.*, 1992) ou anaérobies (Bhupathiraju *et al.*, 1999). Dans certains milieux de cultures, les sels de tétrazolium sont ajoutés pour faciliter la numération des colonies (Emswiler *et al.*, 1976) ou comme facteur de discrimination des colonies selon leurs capacités à les réduire (Petrovic *et al.*, 2008) et dans la détection de contaminants alimentaires. Sollod *et al.* ont utilisés les sels de tétrazolium comme indicateur du potentiel redox de surface d'hyphes de *Cercospora* spp (Sollod *et al.*, 1992). Dans cette étude, 20 sels de tétrazolium ont été classés du plus facile à réduire vers le plus difficile à réduire. La capacité de réduction de ces sels par des hyphes de 8 champignons a été examinée. Les résultats ont

montré que les hyphes des champignons résistant à une toxine très oxydante (générant des ROS) étaient capables de réduire la quasi-totalité des sels de tétrazolum contrairement aux champignons sensibles à la toxine. De plus, les sels de tétrazolum sont également utilisés pour mesurer le pouvoir antioxydant de bactéries probiotiques (Saide and Gilliland, 2005).

Les sels de tétrazolum de seconde catégorie (XTT, MTS et WST) sont employés dans la mesure de la prolifération bactérienne en microplaque et dans les méthodes colorimétriques de résistance aux antimicrobiens (Tsukatani *et al.*, 2008; Tsukatani *et al.*, 2009). L'emploi de transporteurs intermédiaires d'électrons (quinones ou autres dérivés) est souvent nécessaire pour faciliter la réaction entre des sels exocellulaires et des systèmes redox intracellulaires.

Enfin, une étude récente a employé des sels de tétrazolum comme agent de discrimination redox (Michelon, 2010). Trois des quatre sels employés se sont révélés efficace pour discriminer une souche de *L. lactis* considérée comme réductrice d'une souche de *Lb. bulgaricus* considéré comme non-réductrice. La culture de ces deux souches en aérobiose sur un milieu gélosé à base de lait entier UHT supplémenté avec du Tétrazolum Violet (GeLa-TV) a permis de les discriminer aussi bien par la méthode des spots qu'en colonies isolées. A partir de ces résultats, le milieu GeLa-TV a permis de cribler une banque d'environ 8500 mutants. Six mutants se sont révélés avoir une capacité à réduire le TV différente de la souche sauvage (Tachon *et al.*, 2009). Ces mutations affectaient principalement les gènes impliqués dans la biosynthèse des ménaquinones pour les cinq mutants incapables de réduire le TV et de la lactate déshydrogénase pour le sixième mutant capable de réduire d'avantage de TV que la souche sauvage. Suite à ces résultats, une méthode de caractérisation redox sur gélose au lait a été développée (Michelon, 2010). Trois sels de tétrazolum TV, TTC, BT respectivement classés du plus facile à réduire au plus difficile à réduire ont été utilisés en aérobiose et en anaérobiose pour caractériser l'activité réductrice de souches de bactéries lactiques. Le résultat de ce test permet d'établir un score symbolisant les capacités réductrices des souches et cela dans des conditions aérobies et anaérobies. Ainsi, les souches de *L. lactis* ont obtenus les scores les plus élevés, suivi par les *St. thermophilus* et *Lb. plantarum*, et enfin les *Lb. bulgaricus* avec un score nul. De plus, la réduction des sels de tétrazolum pour l'espèce *L. lactis* est significativement plus importante en anaérobiose qu'en aérobiose. Enfin, les mutants sélectionnés pour leurs incapacités à réduire le TV en aérobiose sont capables de réduire les trois sels de tétrazolum en anaérobiose (de façon identique à la souche sauvage). Ces résultats suggèrent qu'il existe un second mécanisme impliqué dans la réduction des sels de tétrazolum. Il a également pu être mis en évidence que la libération ou l'exposition à la

surface cellulaire de composés thiols pouvait être corrélée avec les résultats obtenus avec le test de caractérisation redox au sel de tétrazolium pour les 4 espèces de bactéries lactiques étudiées (Michelon, 2010). Il semble que la libération ou l'exposition à la surface cellulaire de composés thiols réducteurs participe à la réduction des sels de tétrazolium.

3.1.2. Impact du E_h sur la physiologie microbienne

De nombreuses réactions redox interviennent dans le catabolisme des bactéries lactiques. Elles permettent la synthèse d'ATP et génèrent de nombreux équivalents réducteurs nécessaires à la croissance, la maintenance et à la synthèse de molécules biologiques. L'équilibre redox intracellulaire s'établit entre les cofacteurs réduits (NADH, NADPH et $FADH_2$) d'une part, produits par le catabolisme, et les cofacteurs oxydés d'autre part, ré-oxydés par les voies anaboliques. La régénération des cofacteurs est assurée via le transfert des électrons vers des accepteurs finaux pouvant être exogènes pour un métabolisme respiratoire ou carbonés dans le cas d'un métabolisme fermentaire. Etant donné que la cellule échange des électrons via des mécanismes redox ou des composés redox avec le milieu extérieur, toute variation du E_h extracellulaire sera susceptible d'affecter la balance redox intracellulaire et par conséquent les réactions métaboliques qui en dépendent. Ainsi, plusieurs études ont montré que des variations de E_h sont capables pour certaines espèces de bactéries lactiques d'influencer leur état physiologique.

3.1.2.1. En milieu oxydant

L'impact d'un milieu oxydant sur la physiologie microbienne a déjà en partie été décrite dans le paragraphe 2.3.1.1. La croissance aérobie permet à certaines bactéries de métaboliser des substrats tels que le glycérol, le mannitol, non utilisés en absence d'oxygène. De plus, en présence d'oxygène, le métabolisme du pyruvate peut être altéré par la compétition entre les NADH oxydase et NADH peroxydase d'une part et la lactate déshydrogénase d'autre part pour le NADH, affectant ainsi les produits finaux de la fermentation (Condon, 1987). Chez *L. lactis*, le E_h modifie la distribution du pyruvate entre lactate et formate et celle de l'acétyl-CoA entre acétate et éthanol. En effet, la voie de la lactate déshydrogénase devient majoritaire lorsque l'on passe d'un milieu réducteur à un milieu oxydant, et le flux de l'acétyl-CoA est alors dirigé vers la formation d'acétate. Les

activités spécifiques de la NADH oxydase, de la lactate déshydrogénase, de l'acétate kinase, de l'alcool déshydrogénase ainsi que le rapport intracellulaire NADH/NAD sont modifiés.

Au niveau membranaire, un environnement oxydant peut entraîner de sérieux dommages par la peroxydation lipidique. Cette réaction en chaîne entraîne la formation de composé tels que des aldéhydes, des acides gras insaturés, des alcanes, des cétones et des époxydes, possédant des chaînes carbonées plus courtes augmentant la fluidité membranaire (Hauville *et al.*, 2001). Cette fluidification peut affecter les transports membranaires en augmentant sa perméabilité notamment aux ions H^+ . Cette dernière induit une chute du pH interne conduisant à la destruction du ΔpH et donc, de la force proton-motrice et des activités ATPasiques associées (Miyoshi *et al.*, 2003).

3.1.2.2. En milieu réducteur

Les conditions réductrices peuvent modifier les propriétés de la membrane (fluidité membranaire et propriétés de surface) des microorganismes. Ouvry (2001) a mis en évidence chez *Lb. plantarum* une atténuation de l'effet du rédox sur la croissance et l'activation de l'activité ATPasique à 10 °C par rapport à 37 °C (Ouvry *et al.*, 2002). A 37 °C, une rigidification de la membrane cellulaire est constatée en conditions réductrices, conditions où une différence de croissance est également observée. De plus, cette rigidité se maintient au cours de la croissance en conditions réductrices. Ceci implique que le E_h du milieu peut influencer la synthèse des acides gras et/ou des protéines de membrane. En effet, si le E_h entraîne une augmentation des protéines de membrane, le ratio protéines sur lipides membranaires pourrait augmenter et maintenir la rigidité membranaire. Ces auteurs ont également observé chez *Lb. plantarum* des modifications de propriétés de surface de l'enveloppe cellulaire dans différentes conditions de rédox. Celle-ci possède un caractère donneur d'électrons plus faible et un caractère accepteur d'électrons plus fort à -400 mV qu'à +250 mV. Il a été noté également qu'en phase stationnaire, les cellules sont nettement plus hydrophiles en conditions réductrices. Les propriétés de surface sont directement liées à la composition de l'enveloppe cellulaire. Ainsi, la présence de groupements $-COO^-$ et $-HSO_3^-$ serait à l'origine du caractère donneur d'électrons et des modifications de la composition en acides teichoïques pourraient affecter l'hydrophobicité.

Chez *E. coli* (Riondet *et al.*, 1999) ou *Saccharomyces carlsbergensis* (Petrov *et al.*, 1992), des auteurs ont montré que la diminution du E_h pourrait modifier les équilibres oxydoréducteurs des fonctions thiols des protéines membranaires, conduisant à une

perméabilisation membranaire aux protons. Néanmoins, Waché *et al.* n'ont pas observé de modifications du pH interne et du Δp (force proton-motrice) chez une souche de *L. lactis* subsp. *lactis* cultivée en milieu acide en présence de DTT (Dithiothréitol) (Waché *et al.*, 2002). Le caractère plus acidophile des bactéries lactiques ou les caractéristiques différentes de l'enveloppe cellulaire chez une bactérie Gram+ ou Gram- sont des pistes à envisager pour expliquer ces différences. Il s'agit de premiers résultats, mais ils soulignent la biodiversité microbienne vis-à-vis du rédox, sous l'angle physiologique.

3.1.3. Impact de la cellule microbienne sur le E_h

La croissance de micro-organismes dans un milieu est souvent caractérisée par une modification du E_h . En effet, l'activité métabolique des micro-organismes est constituée de réactions d'oxydoréduction utilisant des composés minéraux ou organiques du milieu comme source d'énergie et accepteur terminaux d'électron. Jacob a observé que le E_h d'une culture bactérienne était modifié au cours de la croissance (Tableau 9) (Jacob, 1970).

Tableau 9 : Evolution du E_h du milieu au cours de la croissance de micro-organismes selon leur type respiratoire

Type respiratoire	Espèce	Valeur caractéristique du E_h		Référence
		E_h de départ (mV)	E_h final (mV)	
Aérobie stricte	<i>Bacillus subtilis</i>	+135	-100	(Jacob, 1970)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+500	+100	(Oblinger and Kraft, 1973)
Anaérobie facultative	<i>Staphylococcus aureus</i>	+180	-230	(Jacob, 1970)
	<i>Proteus vulgaris</i>	+150	-600	(Jacob, 1970)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	+430	70	(Oblinger and Kraft, 1973)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	+350	-200	(Ignatova <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Lactococcus spp. prt+</i>	+250	-144	(Cachon <i>et al.</i> , 2002)
Anaérobie stricte	<i>Clostridium paraputrificum</i>	-30	-550	(Jacob, 1970)
	<i>Clostridium perfringens</i>	0	-420	(Pearson and Walker, 1976)
	<i>Clostridium botulinum</i>	-60	-400	(Smoot and Pierson, 1979)

Le début de la croissance des micro-organismes est souvent caractérisé par une chute du E_h du milieu liée à la consommation de l'oxygène dissous et à l'activité métabolique (utilisation de composés oxydants et/ou production de composés réducteurs). Les caractéristiques physiologiques des micro-organismes (type fermentaire, type respiratoire...) sont déterminantes sur l'évolution du E_h dans un milieu (Jacob, 1970). Ainsi, les cinétiques de

réduction du E_h peuvent être des critères de différenciation et de caractérisation des micro-organismes. En effet, la diminution du E_h par les bactéries aérobies est limitée car la présence de l'oxygène nécessaire pour leur croissance maintient le potentiel redox à des valeurs oxydantes. De plus, si la mesure se prolonge suffisamment longtemps, le ralentissement du métabolisme cellulaire et l'arrêt de la croissance sont des facteurs qui favorisent l'augmentation du E_h en raison de la ré-oxygénation du milieu (Jacob, 1970). En condition anaérobie, la croissance microbienne s'accompagne généralement d'une chute importante du E_h , d'autant plus importante que les bactéries sont anaérobies strictes. Les capacités de certaines espèces de bactéries lactiques à réduire le E_h du lait initialement oxydant vers des valeurs réductrices (-200 à -250 mV) ont été mises en évidence dans la littérature (Keen, 1972; Jönsson and Pettersson, 1977; Cachon *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2005). Enfin, Brasca *et al.* ont montré que les cinétiques de réduction des bactéries lactiques dans le lait et la valeur finale du E_h étaient très divers selon les espèces (Brasca *et al.*, 2007). Ainsi, la capacité réductrice peut être utilisée comme un critère de différenciation des espèces.

3.2. Le E_h dans les produits agro-alimentaires

3.2.1. Utilisation du E_h en IAA

Le E_h peut être utilisé en tant que paramètre de contrôle des procédés alimentaires.

Il peut être un critère de qualité organoleptique comme dans le cas des produits carnés et des pâtes alimentaires. En effet, certaines enzymes qui interviennent au cours de l'évolution des produits carnés lors de la conservation ont des E_h d'action optimaux ; le E_h devient alors un indicateur de la stabilité du produit et, par là même, un indicateur de leur durée de conservation (Rödel and Scheuer, 2000). De plus, les travaux d'Alwazeer *et al.* (Alwazeer *et al.*, 2003) ont mis en évidence que le conditionnement du jus d'orange, en absence d'oxygène après le traitement thermique, permettait d'augmenter la stabilité microbiologique et les propriétés organoleptiques du jus d'orange pasteurisé durant la conservation.

Il peut aussi être un critère de qualité microbiologique et devenir un signal d'alarme pour des développements microbiens non souhaités. Les clostridies et certains coliformes produisent de l'hydrogène (Tabatabai and Walker, 1970; Smoot and Pierson, 1979; Lund *et al.*, 1984), réducteur puissant ($E'^0 = -414$ mV) entraînant une chute brutale du E_h du milieu. Ainsi, la

chute brutale du E_h pourrait être un paramètre révélateur de la contamination par ces bactéries. Un tel contrôle permet de détecter si le gonflement tardif et excessif de certains fromages est dû à une contamination par des micro-organismes produisant de l'hydrogène ou par des bactéries productrices de CO_2 (Langeveld and Galesloot, 1971).

Au cours de la maturation des saucisses fermentées, la diminution du E_h est accompagnée d'une augmentation de l'activité microbiologique et du taux de tyramine (Rödel and Scheuer, 2000). L'étude de ce paramètre, dans ce cas précis, est d'une aide précieuse en sécurité alimentaire. En effet, la tyramine est une amine biogène, révélateur de l'activité métabolique de micro-organismes contaminants, qui peut entraîner des intoxications alimentaires.

Enfin, des travaux menés sur des carottes râpées en sauce ont montré que l'atmosphère la plus efficace pour limiter le développement des flores totale et lactique était l'atmosphère réductrice imposée par un mélange gaz de 4% d' H_2 et 96% d' N_2 (Cachon *et al.*, 2000).

Le E_h est employé comme barrière technologique afin de préserver les produits alimentaires (Leistner and Gorris, 1995). Un produit alimentaire est microbiologiquement stable et sûr grâce à la présence d'un ensemble de barrières qui est spécifique à un produit, en terme de nature et d'intensité de leurs effets. Le potentiel d'oxydoréduction fait partie de ces barrières au même titre que le pH, la température ou l'activité de l'eau. Par exemple, un faible potentiel rédox est exigé en tant que barrière afin d'obtenir une meilleure durée de vie d'aliment comme ceux conservés sous MAP (Modified Atmosphere Packaging ou conditionnement sous atmosphère modifié) tel que les salades ou les pâtes fraîches.

Le E_h peut être un paramètre de contrôle de l'aération des conditions de culture limitées en oxygène (Tengerdy, 1961; Winpenny, 1969; Jacob, 1970; Oh *et al.*, 1998). En effet, le E_h est utilisé pour contrôler l'oxygène dissous, et notamment, lorsque sa concentration est inférieure à la limite détectable par les sondes à oxygène dissous.

Enfin, le E_h peut servir de critère de sélection pour des ferments comme cela a été proposé pour les ferments lactiques (Cachon *et al.*, 2002). L'évolution du E_h au cours des fermentations lactiques est différente selon les bactéries lactiques utilisées. Ainsi, les travaux de Cachon *et al.* ont permis de mesurer les aptitudes réductrices des souches de bactéries lactiques (Cachon *et al.*, 2002). Le E_h peut alors servir de critère de sélection pour les ferments. Les activités acidifiantes et réductrices de levains lactiques (lactobacilles, lactocoques, streptocoques) ont ainsi été suivies au cours de fermentations du lait. Une

analyse en composante principale des activités réductrices des souches de bactéries lactiques permet de différencier les trois espèces bactériennes. En effet, la vitesse maximale de réduction des souches de lactocoques est 6 fois supérieure à celle des souches de streptocoques et de lactobacilles. En revanche, les streptocoques et les lactobacilles présentent des vitesses d'acidification légèrement plus élevées que les souches de lactocoques. Les souches se distinguent également par leur temps de réduction et d'acidification : les lactocoques réduisent d'abord complètement le milieu avant de l'acidifier alors que, pour les souches de streptocoques et de lactobacilles, les activités acidifiantes et réductrices semblent associées dans le temps. Cette méthode a été reprise par Aubert *et al.* (Aubert *et al.*, 2002) pour l'étude de ferments mixtes commerciaux utilisés dans la fabrication de fromages. Ces auteurs ont mis en évidence une diversité des activités réductrices des ferments du commerce alors que les activités obtenues en souches pures étaient relativement homogènes entre les espèces. Cette approche peut donc être proposée afin de compléter les informations relatives aux caractéristiques technologiques des ferments lactiques (Brasca *et al.*, 2007). Cette technique peut être appliquée à d'autres technologies telles que la salaison ou la panification où les activités réductrices des bactéries lactiques peuvent également s'avérer importantes.

3.2.2. Intérêt des gaz en IAA

Le secteur agro-alimentaire est l'une des cibles privilégiées des fournisseurs de gaz industriels. Les applications des gaz en agro-alimentaire sont très nombreuses : conditionnement sous MAP, distribution des boissons, refroidissement, surgélation, carbonatation. L'intérêt des gaz utilisés pour modifier le E_h tels que l'hydrogène, l'azote et le dioxyde de carbone est leur non toxicité directe vis-à-vis des microorganismes. Ces gaz ont également une innocuité vis-à-vis du produit, et ils peuvent être utilisés de manière séquentielle. Enfin leur utilisation est autorisée au niveau européen. Parmi les gaz utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, nous nous intéresserons dans ce chapitre plus particulièrement à l'azote et à l'hydrogène.

3.2.2.1. L'azote

L'azote (N_2) gaz inodore, incolore, sans saveur, sans effet toxique, ininflammable, est utilisé pour prolonger la durée de vie des produits emballés (additif autorisé E941) ; il exerce son

action en chassant l'oxygène de l'emballage avant sa fermeture. Il empêche ainsi les phénomènes d'oxydation notamment des pigments, des arômes et des acides gras. Il est également utilisé pour la congélation rapide et la réfrigération des denrées lors des transports.

3.2.2.2. L'hydrogène

L'hydrogène (H_2) présente des potentialités intéressantes pour une utilisation alimentaire puisqu'étant un gaz incolore, inodore et sans effets toxiques connus. Il est déjà utilisé en industrie agro-alimentaire pour l'hydrogénation des huiles liquides et leur transformation en produits solides tels que la margarine ou le beurre de cacahuètes. L'hydrogène est doté d'un pouvoir réducteur puissant en solution, même à très faible concentration dans le milieu. Il a été utilisé pour démontrer l'effet du E_h sur la thermorésistance de bactéries (George *et al.*, 1998). L'hydrogène est un réducteur particulier : il impose au milieu une valeur de E_h liée à l'introduction du couple H^+/H_2 ($E'^0 = -414$ mV). Cette valeur de E_h est peu dépendante de la concentration de ce couple qui influence surtout la stabilité du E_h imposé. Dans la perspective d'une utilisation alimentaire, l'hydrogène présente l'avantage par rapport aux réducteurs chimiques de ne pas modifier la formulation du produit, et donc de ne pas en modifier le goût. Son utilisation industrielle n'a été que très peu considérée dans ce contexte jusqu'à présent car sa limite inférieure d'inflammabilité dans l'air à 20 °C est de 4% (Medard, 2002). Cependant, son utilisation en agro-alimentaire est autorisée au niveau européen (E949).

3.2.3. Modulation du E_h dans les produits laitiers

Le lait est un milieu biologique complexe dans lequel coexiste un très grand nombre de composés redox. La concentration de chacun des couples redox mis en jeu, leurs potentiels redox standards et l'équilibre entre chacun des couples déterminent la valeur finale du E_h du lait. Les valeurs de E_h du lait rencontrées dans la littérature sont comprises entre +100 et +450 mV (Cachon *et al.*, 2002; Bolduc *et al.*, 2006a; Abraham *et al.*, 2007; Brasca *et al.*, 2007).

3.2.3.1. Les composés redox du lait

Le composé redox incontournable du lait est l'oxygène avec son potentiel standard de +818 mV. Une très faible quantité d'oxygène dissous suffit pour établir des conditions oxydantes et un E_h positif. Cependant, la présence de l'oxygène dissous dans le lait ne suffit pas à expliquer le E_h positif du lait. En effet, Jeanson *et al.* ont montré que du lait dont l'oxygène a été chassé par un bullage d'azote conservait une valeur oxydante (Jeanson *et al.*, 2009). Ainsi, le E_h du lait est également relié à sa composition biochimique, minérale et à ses systèmes enzymatiques naturels. Par conséquent, les différences de E_h entre les laits sont dues à la variabilité de sa composition comme par exemple à son taux de matière grasse variable, mais également aux différents traitements physico-chimiques qu'il peut subir, capables de modifier les propriétés redox de ces composants (Moreton, 1998).

Les composés redox du lait sont entre autre des ions métalliques (zinc, fer), des vitamines (A, B2, C et E). La composition lipidique, protéique (caséine, albumine), peptidique, glucidique et les acides aminés (cystéine et tyrosine) interviennent également sur la valeur du E_h (Suetsuna *et al.*, 2000; Pihlanto, 2006; Zulueta *et al.*, 2009). En effet, l'oxydation des lipides ainsi que les réactions de Maillard accentuées par les traitements thermiques peuvent influencer la valeur du E_h du lait. Le lait contient également des enzymes dotées d'activités pro-oxydantes et anti-oxydantes. Ces enzymes sont issues du sang, des membranes apicales, du cytoplasme des cellules sécrétrices ou encore des leucocytes des animaux. Les principales enzymes pro-oxydantes sont la sulfhydryle oxydase, la lactoperoxydase et la xanthine oxydase générant des espèces radicalaires de l'oxygène très oxydantes. Les enzymes anti-oxydantes présentes dans le lait sont la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (Fox and Kelly, 2006a; Fox and Kelly, 2006b). Elles participent à l'élimination des dérivés de l'oxygène présents naturellement dans le lait et/ou générés par les enzymes pro-oxydantes.

3.2.3.2. Impact des traitements physico-chimiques sur le E_h du lait

L'industrie laitière a recourt habituellement à des procédés thermiques tels que la stérilisation par upérisation à haut température (UHT) ou la pasteurisation pour augmenter la sécurité microbiologique du lait et son temps de conservation. Cependant, les traitements thermiques augmentent également le nombre de réactions telles que les réactions de Maillard et d'hydrolyses (Van Boekel, 1998). Les réactions de Maillard représentent un ensemble de réactions complexes entre des acides aminés ou des protéines et des sucres réducteurs. Ces

réactions sont dépendantes du E_h , il peut s'agir à la fois de réactions d'oxydations notamment sur les lipides ou de réductions (Calligaris *et al.*, 2004; Yaylayan *et al.*, 2005). Par conséquent, les effets de ces réactions peuvent contribuer à la modification du E_h . De plus, l'effet anti-oxydant des produits des réactions de Maillard a également été montré (Riondet, 1999). Le chauffage peut également avoir un impact sur les activités enzymatiques du lait, il contribue souvent à l'inactivation des enzymes pro- ou anti-oxydantes présentes dans le lait (Fox and Kelly, 2006a; Fox and Kelly, 2006b).

3.2.3.3. Impact des bactéries lactiques sur le E_h du lait

La présence de bactéries dans un milieu biologique a souvent pour conséquence une diminution du E_h de ce dernier. De plus, l'amplitude de la réduction et la valeur final du E_h sont dépendantes du type respiratoire ou fermentaire des bactéries. En milieu alimentaire, la diminution du E_h jusqu'à des valeurs très réductrice tels que -550 mV est souvent un indicateur de la contamination par *E. coli*. En effet, la production d' H_2 ($E'^0 = -414$ mV) à la fois en condition aérobie et anaérobie par *E. coli* se traduit par une chute du E_h vers des valeurs extrêmes de E_h (Bagramyan *et al.*, 2000). Malgré leur incapacité à produire de l'hydrogène, les bactéries probiotiques sont également dotées d'une activité réductrice, notamment dans le lait. Néanmoins, la valeur finale du E_h du lait après culture de bactéries lactiques est de moindre ampleur que pour *E. coli*. Certaines espèces comme *Enterococcus faecalis* sont capables de diminuer le E_h jusqu'à -221 mV (Brasca *et al.*, 2007). Cette capacité réductrice des bactéries lactiques est l'hypothèse souvent avancée pour expliquer l'obtention d'environnement réducteur dans les produits laitiers fermentés alors que la matrice initiale, le lait, est oxydante.

- Paramètres de suivi de l'activité réductrice

Afin d'appréhender l'activité réductrice des bactéries lactiques, Cachon *et al.* (Cachon *et al.*, 2002) ont proposé de caractériser cette dernière de manière analogue à celle utilisée pour caractériser l'activité acidifiante (Spinnler and Corrieu, 1989). De la même manière que pour le pH, le E_h est suivi *via* une sonde potentiométrique durant la croissance, permettant ainsi d'établir la cinétique de réduction du E_h . A partir des données cinétiques, plusieurs paramètres caractéristiques peuvent être calculés tels que la vitesse maximale de réduction (V_m^r), le temps nécessaire pour atteindre la vitesse maximale de réduction (T_m^r) ainsi que la valeur du E_h à ce temps ($E_{h,m}^r$) (Figure 18).

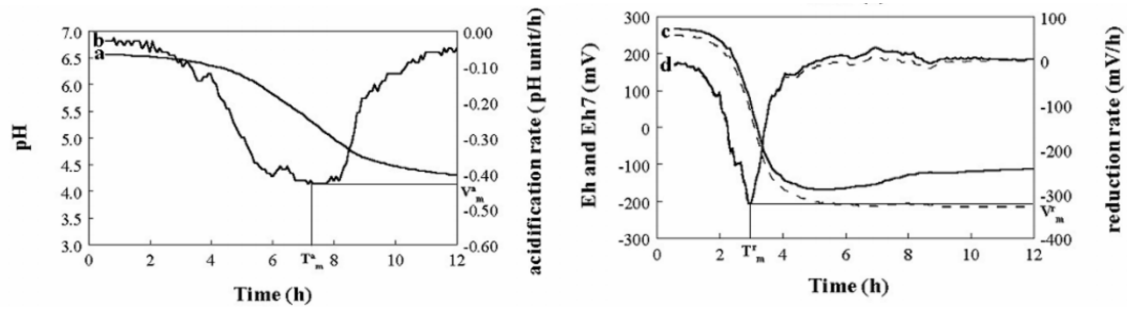


Figure 18 : Détermination des paramètres cinétiques redox (Cachon *et al.*, 2002). Courbe typique d'acidification (a) et de réduction (c, courbe en pointillé E_{h7}), vitesse d'acidification (b) et de réduction (d) de *Lactococcus lactis* sp dans du lait écrémé à 26°C.

Les bactéries lactiques tirent essentiellement leur énergie de la fermentation des sucres, notamment du lactose dans le lait, avec comme conséquence une acidification rapide de leur environnement. Précédemment, nous avons constaté que le pH est un paramètre intervenant sur la valeur du E_h . Afin de discerner l'effet de l'acidification due à la fermentation sur le E_h et l'activité réductrice intrinsèque des bactéries lactiques, il est préférable de corriger la valeur du E_h pour une condition de pH fixe selon l'équation de Leistner & Mirna (Leistner and Mirna, 1959). Généralement, le E_h est corrigé pour un pH de 7, noté alors E_{h7} .

- Diversité inter et intra espèces

Les travaux de Brasca *et al.* (Brasca *et al.*, 2007) ont permis de donner un vaste aperçu de l'activité réductrice des bactéries lactiques. Dans cette étude, 88 souches de bactéries lactiques isolées à partir de fromage italiens et représentant dix espèces différentes ont été caractérisées durant la fermentation du lait en conditions statiques. La Figure 19 représente les cinétiques moyennes de réduction pour les 10 espèces en condition aérobie.

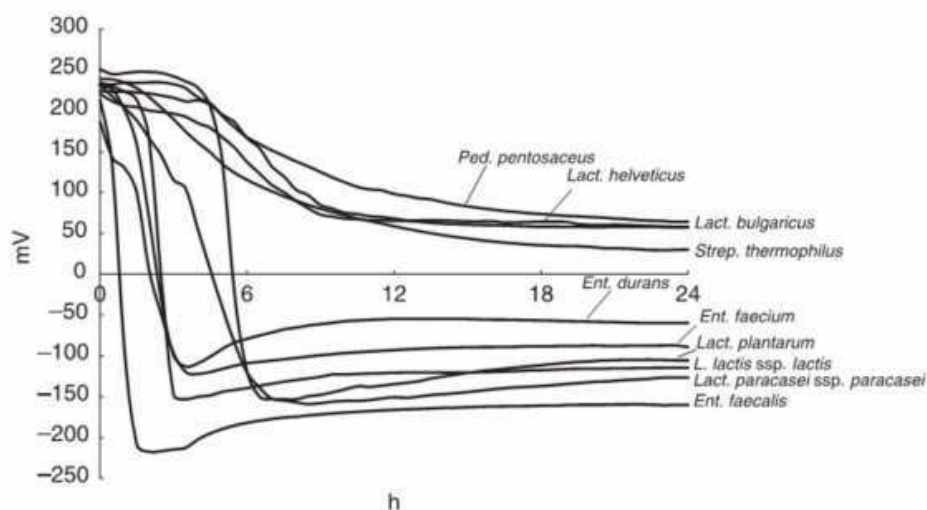


Figure 19 : Evolution du potentiel redox durant la croissance des différentes espèces de bactéries lactiques dans du lait écrémé préalablement stérilisé (Brasca *et al.*, 2007).

Parmi ces espèces, *Enterococcus faecalis* se distingue par sa rapidité à atteindre un E_h très réducteur contrairement à *Lactobacillus helveticus* incapable de réduire le lait jusqu'à des valeurs négatives de E_h . Par ailleurs, *Lactococcus lactis* peut être classé parmi les bactéries lactiques les plus réductrices. En effet, malgré un temps de réduction supérieur à *Enterococcus faecalis*, sa V_m^r est similaire. Elle est même six fois supérieure à celle de *Streptococcus thermophilus* et 5 fois à celle de *Lactobacillus helveticus* (Cachon *et al.*, 2002). Parmi les espèces incapables d'établir un environnement réducteur se trouvent les ferments utilisés dans la fabrication des yaourts (*Lb. bulgaricus* et la plupart des souches de *St. thermophilus*). Au sein même de chaque espèce, il peut exister une très grande diversité d'activité réductrice notamment pour *St. thermophilus* où 133 mV séparent la souche la plus réductrice de la souche la moins réductrice. De plus, il s'agit de la seule espèce présentant à la fois des souches avec un E_h minimum négatif et des souches avec E_h minimum positif. Cette diversité inter et intra espèces démontre tout l'intérêt de la sélection de souches selon leur activité réductrice dans l'élaboration des ferments afin de maîtriser au mieux la qualité redox dans les produits laitiers fermentés.

- Caractérisation de l'activité réductrice

La capacité des bactéries à diminuer le E_h est souvent attribuée à la consommation de composés oxydants tels que l'oxygène et/ou à la production de molécules très réductrices tels que l' H_2 en ce qui concerne *E. coli*. Les bactéries lactiques sont des bactéries anaérobies facultatives dépourvues de chaîne respiratoire fonctionnelle, cependant elles sont capables d'éliminer plus ou moins l'oxygène de leur environnement *via* des mécanismes enzymatiques parfois coûteux en énergie et en pouvoir réducteur. La présence d'oxygène dans le milieu, même à l'état de trace suffit pour maintenir des conditions oxydantes. En effet, l'élimination dans sa totalité de l'oxygène semble être la condition obligatoire à la réduction du milieu par *L. lactis* dans le lait (Jeanson *et al.*, 2009). Cependant, la consommation de l'oxygène même totale par *L. lactis* ne suffit pas à expliquer l'obtention de conditions très réductrices (-220 mV) dans un lait qui même débarrassé de l'oxygène reste oxydant (+340 mV) (Jeanson *et al.*, 2009). De même, la part de la réduction dans du MRS liée à la consommation de l'oxygène par *Lb. plantarum* ne représente seulement que 15% de la réduction totale. En effet, *Lb. plantarum* est capable de réduire le milieu MRS d'une valeur initiale de E_{h5} de +420 mV à -40 mV alors que l'élimination de l'oxygène par l'azote ne permet que de diminuer le E_{h5} à +340 mV (Ouvry *et al.*, 2002).

Les mécanismes impliqués dans l'activité réductrice des bactéries lactiques demeurent encore très peu connus. L'élimination totale de l'oxygène semble être une condition nécessaire à la réduction du milieu mais elle ne semble pas expliquer la diminution du E_h vers des valeurs très réductrices. D'après ces observations, la production de composés réducteurs semble être l'hypothèse privilégiée. Une étude récente propose un mécanisme d'action pour expliquer la réduction du milieu par les bactéries lactiques (Michelon *et al.*, 2010). Ainsi, l'espèce *L. lactis* utilisée dans la fabrication de produits laitiers et capable de réduire le lait jusqu'à environ -200 mV a été choisie comme modèle. Cette étude a été menée dans des conditions d'anaérobiose totale afin de se soustraire de l'impact de l'oxygène sur la mesure du E_h . Ainsi, il a été montré par une méthode de filtration que la réduction du milieu ($E_h \approx -220$ mV) par *L. lactis* n'est ni due à la production de composés réducteurs ni liée à la consommation de composés. Celle-ci est principalement due à la présence de groupement thiol exofaciaux. En effet, la diminution du E_h par *L. lactis* est étroitement corrélée avec la concentration de protéines exposant des groupement thiols exofaciaux. De plus, la présence de cellules passives (dé-énergisées) de *L. lactis* suffit à maintenir un E_h très réducteur dans le milieu.

3.2.3.4. La valeur de E_h dans les produits laitiers fermentés

Dans la fabrication des produits laitiers fermentés le E_h du lait va être amené à évoluer vers des valeurs moins élevées voir très réductrices. Les facteurs responsables de cette diminution du E_h ont trait d'une part aux procédés technologiques employés et d'autre part à l'activité de la flore microbiologique implantée, plus particulièrement à la nature des ferments lactiques utilisés et dans les conditions de conservations (Aubert *et al.*, 2002). La valeur du E_h a été déterminée dans certaines fromages et dans les yaourts (Tableau 10).

Tableau 10 : Valeurs d' E_h dans les produits laitiers

Produit	E_h (mV)	Références
Lait	+100 à +400	(Aubert <i>et al.</i> , 2002)
Yaourt	-150 à +410	(Aubert <i>et al.</i> , 2002)
Camembert	-360 à +360	(Abraham <i>et al.</i> , 2007)
Comté	-156	(Aubert <i>et al.</i> , 2002)
Cheddar	-140 / -340	(Kristoffersen, 1967; Topcu <i>et al.</i> , 2008)

3.2.4. Impact du E_h sur la qualité des produits laitiers fermentés

3.2.4.1. Effet du E_h sur la biomasse au cours de la conservation du yaourt

Delbeau a mesuré l'évolution de la biomasse de *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus* au cours de la conservation d'un yaourt (à 1 jour et à 30 jours) (Figure 20) (Delbeau, 2005).

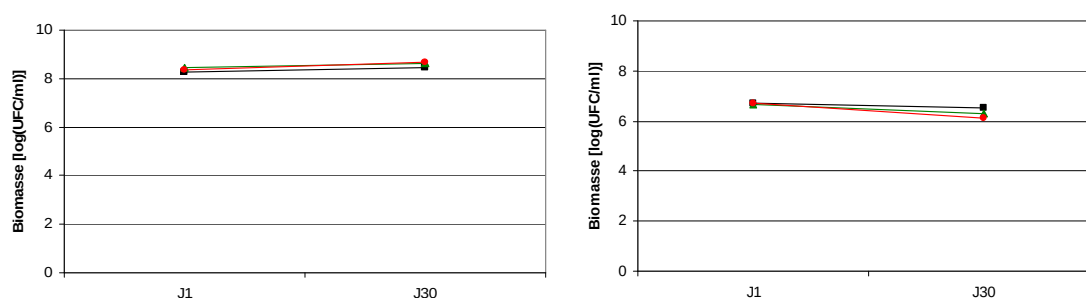


Figure 20 : Evolution de la biomasse exprimée en UFC/ml de *St. thermophilus* (A) et *Lb. bulgaricus* (B) après un et trente jours de conservation selon le conditionnement initial du lait (Delbeau, 2005)

Conditionnement initial du lait : —■— air, —▲— N₂ et —●— N₂ - H₂

Aucune différence significative de population dans les différents yaourts n'a été mise en évidence selon le conditionnement gazeux initial du lait. Le E_h ne semble donc pas avoir d'impact sur la survie de *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus* dans le yaourt.

3.2.4.2. Effet du E_h sur la qualité organoleptique du yaourt

Les travaux menés par Delbeau sur le yaourt ont permis d'évaluer l'impact de modifications du E_h du lait sur les propriétés organoleptiques d'un produit laitier fermenté (Delbeau, 2005). Il apparaît que différentes caractéristiques du produit sont affectées par le E_h , celles-ci étant déterminantes en tant que critères de qualité pour le consommateur.

Ainsi, il a été montré que les yaourts fabriqués à partir de lait conditionné sous air étaient plus sujets à la synérèse que ceux fabriqués à partir de lait conditionné sous azote ou mélange azote/hydrogène.

Par ailleurs, dans ce même travail, une analyse sensorielle a montré des différences d'appréciation des produits selon le conditionnement initial du lait sous différents redox (Delbeau, 2005). Il apparaît qu'au cours de la conservation, les yaourts fabriqués à partir de

lait conditionné sous azote/hydrogène sont plus appréciés que ceux fabriqués à partir de lait conditionné sous azote ou air. La maturation des yaourts est ressentie, par le jury, de manière différente selon le conditionnement initial du produit. Cette analyse sensorielle a permis de mettre en évidence un effet du E_h du milieu de culture sur les qualités organoleptiques du yaourt.

Des travaux plus récents ont confirmé la diminution significative du phénomène de synérèse pour des yaourts fabriqués à partir de lait conditionné sans oxygène (diminution de 11% et de 30% respectivement pour les yaourts fabriqués à partir de lait conditionné sous N_2 et N_2-H_2 par rapport à ceux conditionnés sous Air) (Tableau 11) (Martin *et al.*, 2010).

Tableau 11 : Effet du conditionnement redox des yaourts sur la synérèse, la viscosité apparente, le rapport pore/protéine et la fraction volumique protéique. D'après (Martin, 2009).

Conditionnement gazeux appliqué au lait	Synérèse (g/100 g de yaourt)	Viscosité apparente η (Pa.s) à 500 s ⁻¹	Rapport pore/protéine	Fraction volumique protéique (%)
Air (+ 405 mV)	1,98 ^a	0.046 ^a	1,34 ^a	80,77 ^a
N_2 bullé (+ 283 mV)	1,03 ^{ab}	0,035 ^b	0,43 ^b	89,42 ^{bc}
$N_2 - H_2$ bullé (- 349 mV)	0,59 ^b	0,021 ^c	0,39 ^b	92,09 ^c

De plus, la viscosité apparente est également affectée par le type de gaz utilisé. En effet, les gels apparaissent comme plus rigide pour les yaourts conditionnés sous air, et plus l'environnement est réducteur, plus la viscosité apparente diminue. Enfin, pour les yaourts fabriqués sous Air, la fraction volumique apparente en protéines est plus faible que l'espace occupé par les pores (rapport pores / protéines supérieur à 1). Pour tous les autres yaourts, la fraction volumique apparente en protéines est plus élevée que l'espace occupé par les pores (rapport pore/protéine inférieur à 1). La valeur la plus faible, c'est-à-dire la plus faible proportion de pores, a été obtenue pour les yaourts faits sous N_2-H_2 . De plus, le pourcentage de fraction volumique protéique est élevé pour chaque gel (au-dessus de 80%). Des différences significatives ont été trouvées entre les différents laits fermentés : la fraction volumique protéique la plus faible a été constatée pour les gels produits sous Air et la plus élevée pour les laits fermentés fabriqués sous $N_2 - H_2$. Ainsi, plus l'environnement est réducteur, plus le taux de fraction volumique protéique est élevé.

3.2.4.3. Effet du E_h sur la synthèse des composés d'arômes

Dans son travail Delbeau a conduit une étude analytique qui a permis de montrer que la synthèse de composés d'arômes caractéristiques était modifiée selon le E_h du milieu de fermentation (Delbeau, 2005). Ainsi, il a été montré que la production d'acétaldéhyde était plus élevée pour le lait initialement conditionné sous azote/hydrogène par rapport à celle obtenue pour le lait conditionné sous azote, elle-même supérieure à celle obtenue sous air. Cette quantité produite reste relativement stable au cours de la conservation (Imhof and Bosset, 1994; Tamine and Robinson, 1999). Il a été supposé qu'une quantité plus faible d'acétaldéhyde est produite en conditions aérobies à cause de la compétition pour l'utilisation du NADH entre l'oxygène et la pyruvate déshydrogénase ou l'aldéhyde déshydrogénase.

Concernant le diacétyl, il apparaît que la quantité produite est relativement stable au cours de la conservation ; par contre une augmentation de la production de pentane-2,3-dione est observée. Selon Ott *et al.* (Ott *et al.*, 1999), il y a une augmentation de la concentration des dicétones au cours de la conservation à 4 °C. Cette augmentation pourrait être attribuée à l'activité des bactéries lactiques à 4 °C. Ces deux composés sont également produits de façon plus importante dans les conditions aérobies. Ce résultat correspond aux attentes puisque ces dicétones sont produites par décarboxylation oxydative de leurs précurseurs ; ces réactions sont donc favorisées en présence d'oxygène (Monnet *et al.*, 1994; Boumerdassi *et al.*, 1996; Neijssel *et al.*, 1997; Hugenholtz and Kleerebezem, 1999).

Enfin, en ce qui concerne le diméthylsulfure, une diminution de la quantité produite est observée au cours des trois premières semaines de conservation. Cette quantité est légèrement supérieure pour le lait conditionné sous azote par rapport à l'air ou le mélange azote/hydrogène. La synthèse des composés soufrés dans les fromages semble favorisée par des conditions réductrices (Green and Manning, 1982) ; or dans cette étude, ce résultat est retrouvé pour la condition azote mais pas pour la condition azote/hydrogène. Les voies métaboliques conduisant au diméthylsulfure ne sont pas précisément connues ; il est donc difficile de conclure. Cependant, il a été supposé que le redox imposé par l'azote est plus favorable à la stabilité de ce composé par rapport à des conditions trop réductrices.

Une étude plus récente a montré que le E_h d'un milieu influence la production d'arôme en modifiant les voies métaboliques de *Lb. bulgaricus* et *St thermophilus* (Martin *et al.*, 2011). Des conditions oxydantes favorisent la production d'acétaldéhyde, de diméthylsulfure et des dicétones (diacétyl et pentane-2,3-dione).

Conclusions : Les réactions d'oxydoréductions interviennent dans des étapes clés du métabolisme. Les conditions oxydantes ont notamment un fort impact sur les bactéries anaérobies facultatives et anaérobies strictes. Différentes techniques peuvent être envisagées pour moduler le potentiel redox du milieu pour préserver les bactéries probiotiques. Ainsi, l'utilisation de gaz neutre (azote, ou un mélange gazeux d'azote – hydrogène) permet d'améliorer la survie de souches probiotiques lyophilisées mais également les propriétés organoleptiques des laits fermentés. Son impact sur *Bifidobacterium* reste cependant non décrit dans la littérature. De plus, les bactéries lactiques peuvent moduler ce potentiel d'oxydoréduction de façon très disparate. Ainsi, *Lc. lactis* est capable de réduire le E_h du milieu vers des valeurs très négatives, contrairement à *St. thermophilus* ou *Lb. bulgaricus* qui ne le peuvent pas. La présence de groupements thiols exofaciaux serait en partie responsable de l'activité réductrice de *Lc. lactis*. La sélection des ferments lactiques sur leur aptitude à moduler le E_h présente donc un intérêt majeur en industrie. Dans la bibliographie, il n'existe cependant aucune donnée sur la capacité réductrice (capacité à abaisser le potentiel d'oxydoréduction du milieu, donc à moduler le E_h) ni même sur le pouvoir réducteur (aptitude à réduire des composés plus ou moins facile à réduire) des bifidobactéries.

4. Conservation et Intégration des Bifidobactéries dans un Produit Laitier

En raison de leur large consommation, les produits laitiers fermentés sont de bons vecteurs des probiotiques. Pour escompter un effet, la prise quotidienne de probiotiques devrait être comprise entre 10^8 et 10^9 UFC (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001). Cependant, des études menées sur des produits laitiers du commerce montrent une perte de viabilité de ces souches en amont de leur consommation (Jayamanne and Adams, 2009). Plusieurs facteurs peuvent en être responsables, comme les pH acides ou les phénomènes d'oxydation et plus particulièrement les effets liés à l'oxygène lors de la fabrication et le stockage des produits laitiers (Figure 21).

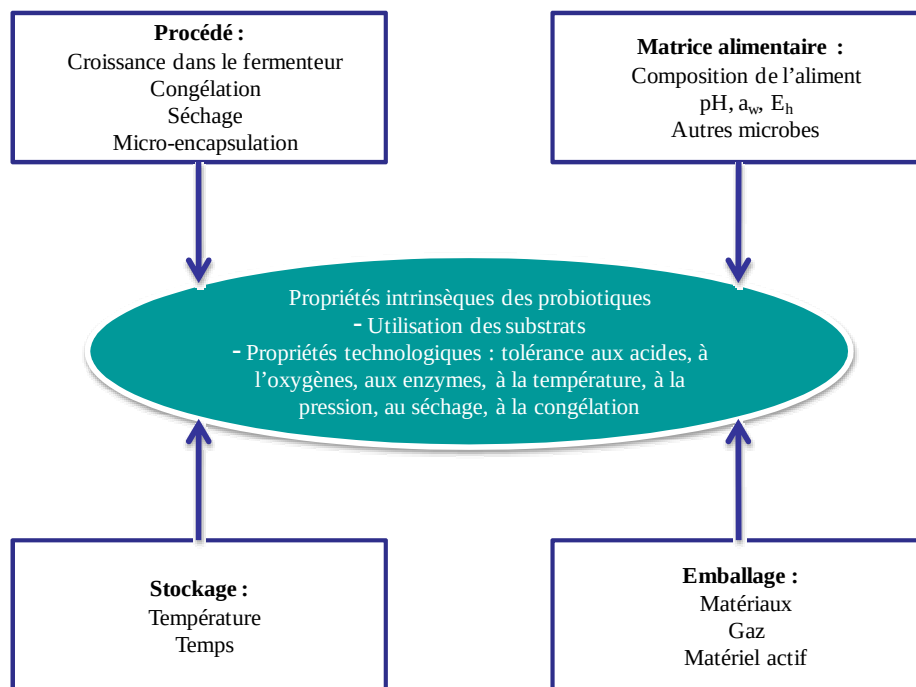


Figure 21 : Facteurs influençant la viabilité et la stabilité des probiotiques. D'après (Vesa *et al.*, 2000).

Afin de conserver les probiotiques dans des concentrations suffisantes, différentes techniques ont été envisagées. Ne seront pas traitées dans cette partie les techniques permettant d'augmenter la viabilité des souches probiotiques en amont de la fabrication des produits laitiers fermentés comme par exemple les phénomènes d'adaptation à l'oxygène (Ahn *et al.*, 2001; Talwalkar and Kailasapathy, 2004a) ou à l'acidité (Noriega *et al.*, 2004).

4.1. Micro-encapsulation

La micro-encapsulation est un procédé par lequel les cellules vivantes sont protégées par une matrice les préservant de conditions défavorables tout en permettant leur libération contrôlée. Cette technique permet d'augmenter la survie des bactéries probiotiques dans les produits laitiers (Kailasapathy, 2002). Différents procédés de dispersion (atomisation, émulsion, extrusion, enrobage par lit fluidisé) ainsi que différents matériaux (alginate, gomme de xanthane, κ -carraghénane, chitosane, amidon, gélatine ou protéines de lait) peuvent être utilisés pour encapsuler des bactéries probiotiques (Burgain *et al.*, 2011). Cependant, même si la micro-encapsulation se révèle être très efficace pour protéger les bactéries probiotiques dans les laits fermentés, elle n'est que très peu utilisée en raison de la taille des particules (20-50 μm) (Adhikari *et al.*, 2003). En effet, lors de l'ingestion des produits laitiers, les consommateurs les perçoivent en bouche. La recherche pourrait s'orienter à diminuer la taille des particules pour palier à ce problème d'acceptation de la part du consommateur.

4.2. Emballage actif

Des auteurs ont mesuré le taux d'oxygène dissous dans des yaourts commerciaux juste après leur mise en pot (pot en polyéthylène téréphtalate ou PET) et au cours du stockage (Miller *et al.*, 2002). Ainsi, le taux d'oxygène double entre la fabrication du yaourt et la fin du stockage (42 jours). De plus, il est à noter que la distribution de l'oxygène est hétérogène au sein du pot. Pour prévenir la diffusion de l'oxygène dans les pots en PET, le verre peut être utilisé pour mettre en pot les yaourts. Ainsi, dans ces conditions, des auteurs ont montré une meilleure survie au cours du temps de *L. acidophilus* (Dave and Shah, 1997c). Dans les yaourts conditionnés dans des pots en verre, la teneur en oxygène dissous reste très faible au cours du stockage contrairement à ceux conditionnés dans des pots en plastique. Cependant, les pots en verre ont un coût beaucoup plus élevé que ceux en PET et nécessitent des mesures de sécurité plus importantes, notamment pour les opérateurs de ligne. C'est pourquoi, des emballages actifs à base de PET ont été mis au point. Ainsi, des pots plastiques contenant une couche barrière aux gaz (Nupak[™]) permet de maintenir un taux d'oxygène dissous très faible dans le produit (Miller *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2003). Ce matériau a une constante de diffusion de l'oxygène de 0.005 à 0.01 $\text{cm}^2/\text{kg}/\text{j}$ alors que le PET seul a une constante de 1.0 à 5.0 $\text{cm}^2/\text{kg}/\text{j}$. De plus, en ajoutant un film piègeur d'oxygène dans cet emballage actif

(Zero2tm), le taux d'oxygène dissous diminue dans le produit au cours du stockage. Cependant, aucun effet n'a pu être montré avec ce matériau innovant sur la viabilité de *L. acidophilus* ou de *Bifidobacterium* spp. (Talwalkar *et al.*, 2004).

4.3. Méthodes physiques

La sur-acidification, néfaste pour les probiotiques, du produit peut-être évitée en maintenant le pH à une valeur supérieure à 5 (Varnam and Sutherland, 1994), en appliquant des chocs thermiques au yaourt (58 °C, 5 min) avant l'addition de la souche probiotique (Marshall, 1992), en diminuant la température de stockage en dessous de 4 °C (Mortazavian *et al.*, 2007) ou en augmentant le pouvoir tampon du yaourt par l'ajout de protéines de lactosérum (Kailasapathy and Rybka, 1994). Un pré-traitement thermique du lait (95 °C /15 min) peut également augmenter la survie des bactéries probiotiques (Mortazavian *et al.*, 2006). En effet, l'augmentation de la température permet d'éliminer l'oxygène du lait (Moreton, 1998). Néanmoins, cet effet est souvent de courte durée car l'oxygène peut très rapidement être réincorporé si l'atmosphère environnante est aérobie. De plus, les traitements thermiques favorisent la dénaturation des protéines du lait, ce qui libère les groupements thiols des protéines, tout particulièrement ceux présents dans la β -lactoglobuline. Les thiols étant des composés très réducteurs, la diminution du E_h et une augmentation de la capacité antioxydante sont souvent associées à leur libération dans le milieu.

La température d'incubation est également un paramètre très important à prendre en compte pour optimiser la viabilité des souches probiotiques. Habituellement, les yaourts sont fermentés à 43 °C (température optimale pour la production d'acide lactique par les ferments du yaourt) alors que la température optimale de croissance des *Bifidobacterium* est de 37 °C. Ainsi, une incubation plus basse, entre 37 et 40 °C, permet une meilleure croissance des bifidobactéries (Kneifel *et al.*, 1993; Mortazavian *et al.*, 2006).

4.4. Ajout de molécules actives

Un certain nombre de molécules sont connues pour améliorer la croissance des bactéries probiotiques. Ainsi, la supplémentation du lait avec un mélange de casitone et de fructose stimule la croissance de *L. acidophilus* (Saxena *et al.*, 1994). Les protéines de lactosérum, le

jus de tomate et la pulpe de papaye stimule également la croissance de *L. acidophilus* (Babu *et al.*, 1992; Kailasapathy *et al.*, 1996).

De plus, par le biais d'additifs chimiques il est possible de contrôler ou modifier le potentiel redox d'un aliment, mais cet usage est mal perçu par les consommateurs et demeure strictement réglementé. Par exemple, l'ajout de protéines de lactosérum et de cystéine a été employé pour diminuer le potentiel redox à des valeurs inférieures à -121 mV et fournir des nutriments azotés afin d'augmenter la viabilité de bactéries probiotiques dans les laits fermentés (Dave and Shah, 1997a; Dave and Shah, 1998). L'acide ascorbique, vitamine antioxydante, a également été utilisée pour protéger les probiotiques de l'oxygène et augmenter la valeur nutritive des laits fermentés (Dave and Shah, 1997b; Zhao and Li, 2008). Si dans les deux cas une diminution du potentiel redox est observée, seule l'utilisation de la cystéine permet de conserver un potentiel redox négatif au cours de l'entreposage du produit (Dave and Shah, 1997a), l'acide ascorbique s'oxydant rapidement dans les contenants utilisés (Dave and Shah, 1997b). De plus, l'emploi de cystéine ou d'acide ascorbique a un impact négatif sur les propriétés organoleptiques des laits fermentés (Talwalkar and Kailasapathy, 2004b). Enfin, l'acide ascorbique n'est efficace qu'avec les lactobacilles. Des auteurs ont montré récemment que la diminution du potentiel redox à des valeurs nulles par l'ajout de DTT permettait d'augmenter la survie au cours du stockage de souches de bifidobactéries dans du lait (Jayamanne and Adams, 2009). Cependant un tel composé ne peut être utilisé dans la fabrication de produit destiné à un usage alimentaire. Des molécules antioxydantes (catéchines ou tocophérols) (Akahoshi and Takahashi, 1996) ou des enzymes (catalase) (Hull *et al.*, 1984) peuvent également être utilisées pour améliorer la survie des bactéries probiotiques dans les yaourts.

4.5. Activité microbienne

La présence de micro-organismes peut induire des modifications des propriétés oxydoréductrices du milieu. L'incorporation d'espèces consommatrices d'O₂ comme *St. thermophilus* fait partie des stratégies envisagées pour protéger les bactéries probiotiques des attaques des ROS. Cependant, ces souches induisent une acidification rapide du milieu à laquelle *L. acidophilus* et les bifidobactéries sont très sensibles (Talwalkar and Kailasapathy, 2004c). Une nouvelle stratégie serait alors d'ajouter des espèces telles que *Lc. lactis* prt

(protéase négative) possédant des capacités réductrices considérables ainsi qu'une faible activité acidifiante (Cachon *et al.*, 2002; Michelon *et al.*, 2010).

4.6. Electroréduction

L'électroréduction est un procédé d'électrolyse pouvant être une voie à envisager afin de protéger les probiotiques des effets toxiques de l'oxygène (Figure 22).

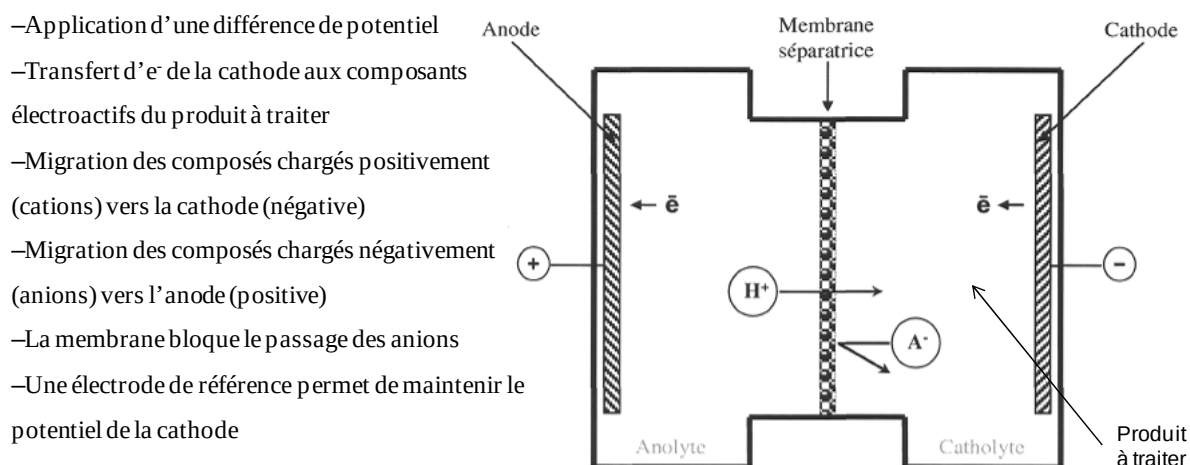


Figure 22 : Principe de fonctionnement du procédé d'électroréduction (Schreyer, 2007).

Cette technique permet de diminuer le E_h sans altérer les qualités organoleptiques et nutritionnelles du lait, et ceci sans ajout de molécules chimiques (Schreyer, 2007). Le principe repose sur la réduction des protons en hydrogène ($2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$) mais également sur réduction de l'eau : $H_2O + e^- \rightarrow OH^- + 1/2H_2$. Un impact positif sur la viabilité de souches probiotiques a également été observé (Bolduc *et al.*, 2006b). En effet, un effet similaire à l'ajout de cystéine ou au dégazage par l'azote (cf. infra) a été observé sur des souches de *Bifidobacterium* dans du lait fermenté conservé à 4 °C pendant 4 semaines.

4.7. Utilisation des gaz

Des auteurs ont montré la possibilité de diminuer le E_h du lait par un dégazage à l'azote (Decker and Ashworth, 1951; Greenbank and Wright, 1951). Selon Klaver *et al.* un faible contenu en O_2 et un faible potentiel redox ont été cités comme des facteurs importants pour la viabilité des bifidobactéries durant la conservation des produits laitiers fermentés (Klaver *et al.*, 1993). Ces auteurs ont, entre autre, trouvé une meilleure viabilité des bifidobactéries dans

un lait dégazé. Récemment, certains auteurs ont démontré un intérêt pour l'utilisation de gaz tel que l'azote ou l'hydrogène pour chasser l'oxygène de jus de fruit et ainsi diminuer leur potentiel redox afin d'augmenter la qualité et la stabilité (microbiologique et de la couleur) de ces jus (Alwazeer *et al.*, 2003). Ainsi, il est possible de diminuer le potentiel redox d'un jus d'orange de + 360 mV à +240 mV par barbotage d'azote et jusqu'à -180 mV lors de l'utilisation d'un mélange azote-hydrogène. Cette diminution du potentiel redox a également permis d'accroître la stabilité de l'acide ascorbique. De plus, d'après les travaux de Delbeau, des conditions de culture réductrices obtenues par l'utilisation d'un gaz réducteur (N_2-H_2) favorisent la viabilité des bactéries lyophilisées de *Lactobacillus rhamnosus* durant le stockage (la viabilité est doublé par rapport au témoin après 60 jours de stockage à température ambiante) (Delbeau, 2005). L'utilisation de gaz neutres comme l'azote ou comme l'hydrogène pourrait ainsi être une alternative aux méthodes chimiques ou physiques qui bien souvent ont un effet négatif sur le produit. En effet, des auteurs ont montré que le dégazage du lait pour confectionner des yaourts n'entraînait aucun défaut organoleptique sur le produit fini et tendait même à l'améliorer (Delbeau, 2005; Martin *et al.*, 2010).

Conclusion : Les techniques de préservations des bifidobactéries, afin de les industrialiser comme bactéries probiotiques, sont le plus souvent basées sur la modulation de l'environnement redox. Si certaines de ces techniques sont déjà utilisées industriellement (utilisation de starters spécifiques, modification des températures d'incubation du probiotique), d'autres n'en sont encore qu'au stade laboratoire (électroréduction, utilisation de gaz). Mais même si la plupart de ces techniques tend à moduler le redox du milieu, elles n'ont pas toutes le même impact sur la qualité du produit. En effet, des défauts organoleptiques peuvent apparaître, notamment avec l'utilisation de molécules chimiques ou de bactéries encapsulées. Deux méthodes semblent cependant ne pas altérer le produit : ce sont l'électroréduction et l'utilisation des gaz. La première n'a cependant pas été utilisée pour la confection de laits fermentés de type yaourt. La seconde, elle, permet même d'améliorer les propriétés organoleptiques des yaourts. Mais l'utilisation des gaz pour améliorer la survie d'une souche de *Bifidobacterium* dans un produit laitier fermenté n'a pas été décrit dans littérature.

CONCLUSION ET AXES DE LA THESE

Cette étude bibliographique montre l'importance de la sélection des bactéries probiotiques sur des critères de viabilité/vitalité. En effet, le criblage des souches probiotiques se fait le plus souvent uniquement sur des critères de cultivabilité, ne reflétant pas l'aptitude des souches à faire face aux contraintes de fabrication, de conservation et d'ingestion. Ainsi, les méthodes couramment utilisées pour s'assurer de la bonne viabilité de la souche sélectionnée suite à un stress sont de plus généralement difficiles et longues à appliquer en routine (culture sur milieu gélosé) et ne reflètent pas l'activité des souches après un stress (vitalité).

De plus, concernant le criblage *in vitro* des souches sur le critère santé « antioxydant », l'utilisation de modèles complexes utilisant des cellules animales ou humaines, comme c'est le cas pour le pouvoir immuno-modulateur, n'est pas encore généralisée. Cependant, aux vues des recommandations de l'EFSA quant à l'utilisation de bactéries probiotiques antioxydantes, il semble indispensable de mettre en place de tels types de modèles.

Cette étude bibliographique montre également qu'afin d'augmenter la viabilité et donc par la même, la fonctionnalité des souches probiotiques incluses dans un produit laitier fermenté, un paramètre majeur à contrôler semble être l'environnement redox que l'on peut appréhender *via* le potentiel d'oxydoréduction (E_h). De plus, dans la perspective d'une application alimentaire, la modification du E_h par des gaz purs ou en mélange présente l'avantage de conserver l'innocuité du produit par opposition à l'utilisation de molécules oxydantes ou réductrices.

Les résultats précédemment obtenus au sein du laboratoire ont montré qu'une modification du E_h par des gaz pouvait jouer un rôle sur les propriétés des produits laitiers fermentés. En particulier, la modification du E_h par les gaz dans le lait modifie positivement les caractéristiques physico-chimiques et les propriétés sensorielles d'un produit laitier fermenté. De plus, un ferment lyophilisé produit en conditions réductrices présente également une meilleure survie. Il a enfin été montré dans le laboratoire que les bactéries sont capables de moduler le E_h *via* leurs thiols exofaciaux dans les produits laitiers fermentés.

Bien que les bifidobactéries soient capables de mettre en place des mécanismes de défense face aux stress acide et biliaire, elles ne possèdent pas ou très peu de défenses actives face au stress oxydant (catalase, SOD). Leur membrane va constituer la première barrière face au stress. Il serait donc intéressant de préserver au maximum cette membrane jusqu'au site d'action de la bactérie, voire de renforcer son efficacité barrière. Un moyen d'y parvenir serait de replacer les bifidobactéries dans des conditions proches de leur niche écologique d'origine, le côlon. Pour ce faire, le potentiel redox peut être utilisé. Cependant, à ce jour, l'influence de la modulation du E_h sur la viabilité et la fonctionnalité des bifidobactéries n'a que très peu été explorée. En effet, même si l'influence du E_h sur la viabilité des bifidobactéries est décrite, les mécanismes associés à la meilleure résistance observée restent inconnus. De même, l'influence des bifidobactéries sur le redox du milieu et les mécanismes associés ne font pas l'objet de descriptions dans la littérature. Les axes de ce travail de thèse ont visé à répondre à différentes questions soulevées par l'étude bibliographique :

- ❖ Peut-on mettre en place un crible de détection rapide de l'efficacité des souches probiotiques intégrant leur résistance aux stress et leur fonctionnalité ?
- ❖ Quel est l'impact d'une souche anaérobie stricte, *Bifidobacterium bifidum*, sur l'évolution du redox d'un milieu oxydant ou sur des molécules oxydantes ?
- ❖ Peut-on moduler la résistance aux stress et la fonctionnalité de *B. bifidum* en la remplaçant dans des conditions proches de celle de sa niche écologique ?
- ❖ Des changements biochimiques membranaires pourraient-ils expliquer ces phénomènes ?

Afin de répondre à ces questions, les méthodes utilisées dans ce travail pour mettre en place le crible probiotique (cytométrie en flux, utilisation de tests *in vitro* plus complexes) ont permis de sélectionner des souches à fort potentiel *in vivo*. De plus, elles ont permis de caractériser à la fois l'impact de *B. bifidum* sur son environnement (mesure de l'évolution du pH, du E_h , de l'oxygène du milieu) mais également de caractériser l'impact du potentiel redox sur la survie de *B. bifidum* au cours du stockage dans un produit laitier fermenté et sur sa fonctionnalité (pouvoir réducteur, anti-mutagène et antioxydant). L'utilisation de gaz neutre et/ou réducteur a permis ainsi de moduler le potentiel redox du milieu sans ajout de molécules chimiques. L'analyse de la composition en acides gras membranaires ainsi que des thiols exofaciaux a permis d'appréhender l'impact de la modulation du E_h sur les caractéristiques probiotiques de *B. bifidum*.

MATERIEL & METHODES

MATERIEL & METHODES

1. Matériel Biologique

1.1. Souches bactériennes et techniques d'ensemencement

1.1.1. Souches utilisées pour le crible probiotique

13 souches bactériennes appartenant aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium* ont été incluses dans cette étude (Tableau 12).

Tableau 12: Souches bactériennes utilisées pour le crible probiotique.

Souche	Origine	Milieu de croissance	Température	Caractéristiques
<i>B.bifidum</i> CIP 56.7	Fèces de bébé	mMRS	37 °C	Souche de référence
<i>B. longum</i>	Intestin humain	mMRS	37 °C	Souche immuno-modulatrice (PBMC)
<i>Lc. lactis</i>	Fromage	MRS	30 °C	Souche immuno-modulatrice (PBMC) Souche antioxydante
<i>Lb. brevis</i>	Levain	MRS	37 °C	Souche antioxydante
<i>Lb. bulgaricus</i> CIP104365	Yaourt	MRS	37 °C	Souche de référence
<i>Lb. casei</i> DN 114-001	Danone	MRS	37 °C	Souche immuno-modulatrice (PBMC) Modèle industriel
<i>Lb. curvatus</i>	Choucroute	MRS	37 °C	Souche immuno-modulatrice (PBMC)
<i>Lb. delbrueckii</i>	Yaourt	MRS	37 °C	Souche antioxydante
<i>Lb. fermentum</i> ME-3	Intestin d'enfants	MRS	37 °C	Souche antioxydante Modèle industriel
<i>Lb. paracasei</i>	Pulpe de tomate	MRS	37 °C	Souche immuno-modulatrice (PBMC)
<i>Lb. plantarum</i>	Lait de yack	MRS	37 °C	Souche immuno-modulatrice (PBMC) Souche antioxydante
<i>Lb. zeae</i>	Maïs	MRS	37 °C	Souche immuno-modulatrice (PBMC) Souche antioxydante
<i>St. thermophilus</i>	Fromage italien	M17	30 °C	Souche antioxydante

MRS : milieu Man, Rogosa, Sharpe ; mMRS : MRS + 0,05% cystéine

Dans un souci de confidentialité, le nom des souches utilisées pour le screening n'est pas indiqué. Deux souches de référence de laboratoire ont été incluses : la souche *Lactobacillus bulgaricus* CIP 104365 et la souche *Bifidobacterium bifidum* CIP 56.7. En dehors des ces deux microorganismes de référence, onze souches ont été fournies par l'INRA MICALIS, deux modèles industriels (*Lactobacillus casei* DN114-001 et *Lactobacillus fermentum* ME-3) déjà présents dans des produits commercialisés, et 9 souches présentant un potentiel probiotique (les caractéristiques fonctionnelles ont préalablement été établies par l'INRA).

1.1.2. Souche utilisée pour les expériences sous redox modifié et méthode de culture

La souche utilisée pour les expériences est la souche *Bifidobacterium bifidum* CIP 56.7 (*B. bifidum*) issue de la Collection de l'Institut Pasteur, France. La souche est conservée dans des cryotubes à -80 °C. Une première culture est réalisée en diluant 500 µL d'un cryotube dans 5 mL de milieu MRS (Michelon, 2010) puis incubée 24 h à 37 °C. Une seconde culture est effectuée à partir d'1 mL de la première culture ajouté à 9 mL de milieu MRS. Après une incubation de 8 h à 37 °C, la seconde culture est utilisée pour inoculer le milieu MRS* contenu dans des flacons modifiés pour les expériences de suivi du pH, du E_h , de l'oxygène et pour la composition en acides gras membranaire ou bien dans des tubes de Hungate pour les autres expérimentations. L'utilisation du MRS* permet d'avoir un E_h initial proche de celui du lait. La composition du milieu MRS* est la suivante : extrait de viande (10 g.L⁻¹), extrait de levures (5 g.L⁻¹), saccharose (10 g.L⁻¹), bacto tryptone (10 g.L⁻¹), acétate de sodium (5 g.L⁻¹), citrate de sodium (2 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (2 g.L⁻¹), MgCl₂ (0,25 g.L⁻¹), MnSO₄ (0,05 g.L⁻¹) et Tween 80 (0,1%). Ce milieu est appelé MRS* pour le différencier du milieu MRS commercial (Biokar, X, France) également utilisé au cours de ce travail. Les cultures finales sont réalisées sous trois conditions gazeuses différentes : Contrôle, Azote (N₂) et Azote – Hydrogène (96%-4% vol/vol) (N₂-H₂). Toutes les expériences sont menées avec des cellules en fin de phase exponentielle / début de phase stationnaire.

1.2. Culture dans des tubes de Hungate

Pour les cultures en condition Contrôle, 1 mL de culture est ajouté à 9 mL de milieu MRS*. Les cultures sous Azote et sous Azote – Hydrogène sont réalisées de la même manière mais

dans des milieux préalablement conditionnés par un bullage avec le gaz adéquat stérilisé à l'aide d'un filtre 0,22 μm (MILLLEX-GV polyvinylidene fluoride ; Millipore, Carrig-twohill, Irlande) ([Figure 23](#)).



Figure 23 : Dispositif pour le bullage dans les tubes de Hungate.

Une fois les milieux ensemencés, les tubes sont placés à 37 °C dans une étuve pour les cultures Contrôle ou dans les chambres thermostatées de l'enceinte Bactron I (Sheldon Manufacturing, Cornelius, USA) à ambiance gazeuse contrôlée pour les autres cultures ([Figure 24](#)).



Figure 24 : Enceinte anaérobie Bactron I.

1.3. Culture en flacons Schott modifiés

Les suivis du pH et du E_h sont réalisés en milieu MRS* dans des flacons Schott modifiés de 250 mL. Ces flacons, équipés de joints butyles, empêchent tout échange gazeux avec l'atmosphère et facilitent les opérations de bullage ou d'ensemencement ([Figure 25](#)).

Pour le suivi du pH et du E_h en condition Contrôle, les flacons modifiés équipés des électrodes pH et redox sont placés dans un bain marie à 37 °C. Les électrodes sont ensuite connectées à l'interface d'acquisition puis l'ensemencement des milieux est réalisé à l'aide d'une seringue (ensemencement à 3%). Pour le suivi sous Azote et sous Azote – Hydrogène, les flacons modifiés sont placés dans l'enceinte Bactron I préalablement conditionnée avec le gaz approprié. Les milieux sont ensuite conditionnés en gaz pendant 7 heures par injection de l'atmosphère de l'enceinte. Enfin, les électrodes sont connectées à l'interface d'acquisition, la température de l'enceinte est ajustée à 37 °C puis les flacons sont ensemencés à 3%.

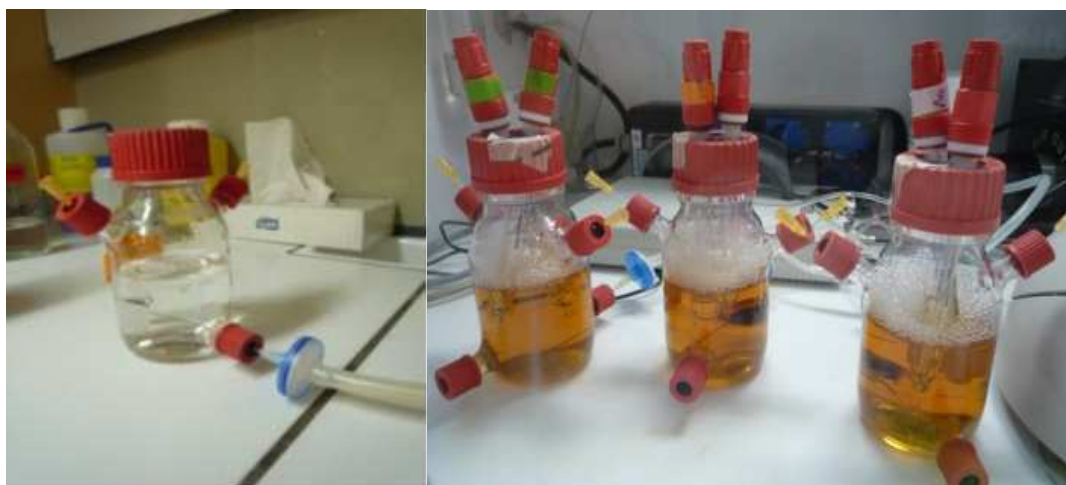


Figure 25 : Bullage dans les flacons Schott modifiés.

1.4. Dénombrement en milieu gélosé

Les milieux MRS, mMRS et ST ont été utilisés pour dénombrer respectivement les lactobacilles, les bifidobactéries et les streptocoques.

Les dénombrements sont réalisés grâce à un ensemencement spiral Eddy Jet 1.2 (IUL, Barcelone, Espagne) ; le mode d'ensemencement utilisé est le mode Log 50 μ l. Le comptage des boîtes est effectué grâce à un compteur Counterstat Flash 4.2 (IUL, Barcelone, Espagne).

2. Fabrication des Laits Fermentés

Le lait UHT écrémé Bio Lactel auquel ont été ajoutés 2% (w/v) de poudre de lait est agité pendant 10 min et chauffé à 45 °C. Ensuite, le lait enrichi est conditionné sous différentes conditions gazeuses. Les différentes conditions de E_h ont été obtenues grâce à un bullage de gaz pendant 4 h à un débit de gaz de 20 mL/min. Le bullage de gaz a été réalisé dans une

enceinte anaérobie (Figure 24). Afin de vérifier l'effet du bullage des gaz, certaines expériences ont également été réalisées sans bullage de gaz (Contrôle). Le lait a étéensemencé à raison de 10^7 UFC/mL de ferments lactiques (mélange de *Streptococcus thermophilus* (75%) et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (25%)) et de 5×10^8 UFC/ml de *B. bifidum*. L'acidification a été réalisée à 45 °C jusqu'à ce qu'un pH de 4,7 soit atteint. Les flacons ont ensuite été placés dans un bain marie d'eau glacée pendant 1 h afin de stopper l'acidification. Ils sont enfin conservés en chambre froide à 4 °C en prévision des différentes analyses.

3. Caractérisation des Capacités Réductrices de *B. bifidum*

3.1. Mesure du pH et du E_h

Le pH est suivi par une électrode pH combinée (Inlab 405 ; Mettler Toledo, Paris, France). L'électrode pH est nettoyée avant utilisation au moyen d'une solution de pepsine/HCl puis calibrée à l'aide de solutions tampons d'étalonnage (pH 4 et 7). Le potentiel redox est suivi par une électrode redox combinée (Pt 4805 ; Mettler Toledo). Avant utilisation, l'anneau de platine de l'électrode est poli à l'aide d'une poudre d'alumine (oxyde d'alumine, VWR Prolabo, Lyon, France) afin de restaurer l'état de la surface du platine. L'électrode est contrôlée dans de l'eau du robinet. Trois mesures sont comparées et doivent être incluses dans l'intervalle de confiance autour de leur moyenne (calculée à 20 mV, 95% de niveau de confiance) (Abraham, 2007). Pour les conditions Azote et Azote – Hydrogène, les mesures du pH et du redox sont réalisées en anaérobiose dans l'enceinte Bactron I.

3.2. Mesure de l'oxygène dissous

La teneur en oxygène du milieu a été suivie par un système de fibre optique spécifique (World Precision Instruments, Sarasota, USA). Le principe de mesure est basé sur le principe de quenching dynamique de la luminescence causé par la collision entre des molécules d'oxygène et le luminophore présent au niveau de la fibre optique. La luminescence est une émission de lumière dite « froide », produite par le retour des électrons excités vers un état de moindre énergie. Tout d'abord, une lumière va être envoyée vers la suspension à doser via la fibre optique. Sans oxygène, la lumière va exciter le luminophore présent au niveau de la

fibres. Le luminophore va à son tour émettre de la lumière que la fibre optique va détecter et retransmettre jusqu'à un système d'acquisition. En revanche, lorsque l'oxygène est présent dans le milieu, cette dernière va entrer en collision avec le luminophore qui va perdre alors son état excité. Dans ce cas, aucun signal lumineux ne va être re-transmis vers le système d'acquisition. En d'autres termes, plus l'oxygène est présent dans le milieu à tester et moins le signal lumineux ré-émit par le luminophore sera important.

Les systèmes de mesure d'oxygène par fibre optique conventionnels sont limités dans leur précision par la stabilité de la source lumineuse et par les fluctuations de lumière. En utilisant une détection par durée de vie de luminescence, les mesures ne sont pas affectées par la stabilité de la lumière, par les fluctuations d'intensité causées par le pliage de la fibre ou les changements des propriétés optiques des échantillons (turbidité, indice de réfraction, coloration, etc.). De plus, cette fibre optique présente l'avantage par rapport au système classique ampérométrique (électrode de Clark) de ne pas consommer l'oxygène du milieu pendant la mesure. La fibre optique est connectée à un système d'acquisition (OxyMini, WPI) et de traitement des données (SpectraSuite, WPI) permettant de suivre en continu la teneur en oxygène dissous du milieu. Le capteur est calibré en deux points, à 100% de saturation d'air et 0%. Ainsi, une solution à 0% d'oxygène est réalisée par un dégazage de l'eau distillée à l'azote et une solution à 100% de saturation d'air est obtenue en faisant buller le milieu avec de l'air ambiant.

3.3. Acquisition des données

Les électrodes pH et redox ainsi qu'une sonde de température sont connectées à une interface de contrôle multi-canaux (ELIT 8088 ; Bioblock, Illkirch, France) permettant l'acquisition des données en temps réel vers un ordinateur. Le pH et le potentiel redox mesuré (E_m ; mV) sont enregistrés simultanément. Sur la base de la valeur de l'électrode de référence (E_{ref}) à la température de croissance ($E_{ref} = 197 \text{ mV}$ à 37°C), les valeurs du E_m , exprimées en comparaison avec l'électrode de référence Ag/AgCl, sont converties en E_h (potentiel redox exprimé en comparaison avec l'électrode de référence à hydrogène, $E_h = E_m + E_{ref}$). Dans le but de corriger l'effet du pH sur les valeurs du E_h , nous avons calculé les valeurs du E_{h7} . Les valeurs du E_{h7} correspondent au E_h à pH = 7. Le E_{h7} est calculé en appliquant l'équation de Leitsner et Mirna (Leistner and Mirna, 1959) : $E_{h7} = (E_h - \alpha (7 - \text{pH}_x))$, α étant le facteur de

corrélation E_h -pH et dont la valeur a été déterminée expérimentalement (38 mV/unité pH pour le lait et 30 mV/unité pH pour le MRS^{*}) et pH_x le pH du milieu.

3.4. Suivi des paramètres cinétiques

L'étude de Cachon *et al.* a repris les mêmes outils de caractérisation que ceux utilisés pour étudier la cinétique d'acidification dans le but de mesurer les aptitudes réductrices de souches de bactéries lactiques (Cachon *et al.*, 2002). Il existe plusieurs méthodes pour étudier la cinétique d'acidification. Cependant, la plus répandue est celle de Corrieu *et al.* (logiciel CINAC) impliquant le calcul des paramètres caractéristiques des cinétiques d'acidification : la vitesse maximale d'acidification (V_m), le temps (T_m) et le pH (pH_m), auxquels la vitesse maximale d'acidification est atteinte (Corrieu *et al.*, 1989). Ces paramètres apparaissent d'après Picque *et al.* comme les meilleurs descripteurs des cinétiques (Picque *et al.*, 1992). Du fait de l'intérêt des paramètres déterminés et de la reconnaissance de la méthode par l'ensemble de la profession, celle-ci a été choisie par Cachon *et al.* pour établir les paramètres cinétiques de réduction (Cachon *et al.*, 2002). Le calcul de la vitesse d'acidification ($V^a = dpH/dt$, unité pH/h) et de la vitesse de réduction ($V^r = dEh/dt$, unité mV/h) permet de déterminer la vitesse maximale d'acidification (V_m^a , unité pH/h) et la vitesse maximale de réduction (V_m^r , unité mV/h), ainsi que les temps auxquels ces vitesses sont atteintes, respectivement T_m^a (h) et T_m^r (h), et le pH auquel ces maximums sont atteints (pH_m^a et pH_m^r) (Figure 26).

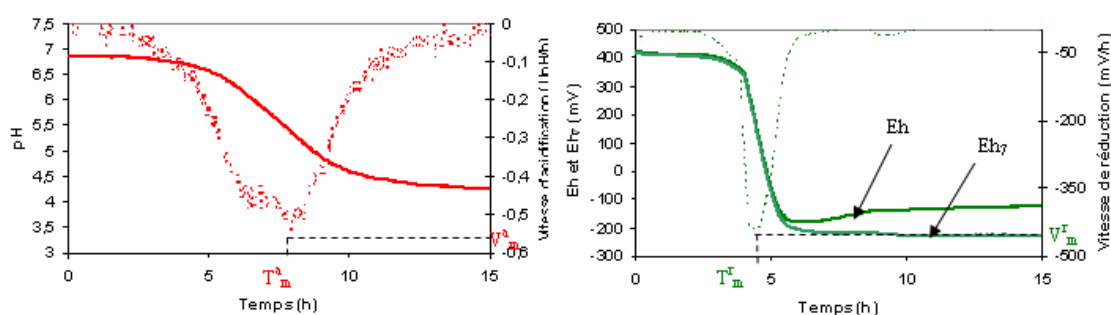


Figure 26 : Courbes typiques d'acidification, de réduction et vitesses d'acidification et de réduction associées.

3.5. Filtration et ajout de NEM

Les cultures de *B. bifidum* réalisées dans des flacons modifiés avec du MRS dégazé au N₂ comme décrit précédemment sont filtrées afin de connaître l'impact de la présence des micro-

organismes sur le E_{h7} final. A la fin de l'étape de réduction ($E_{h7} \sim -180$ mV), 10 mL de culture bactérienne sont prélevés en anaérobiose dans l'enceinte Bactron I à l'aide d'une seringue puis filtrés avec un filtre de 0,22 μ m. Le E_{h7} du filtrat est ensuite mesuré à l'aide d'une électrode redox.

L'utilisation du N-éthylmaleimide (NEM) réagissant spécifiquement avec les thiols permet d'étudier le rôle de ces groupements dans la réduction du milieu. Une solution de NEM est ajoutée dans l'enceinte anaérobie à la fin de l'étape de réduction de la culture. La solution stock de NEM est de 1 M dans une solution de méthanol : eau (3 : 1) et la concentration finale dans le milieu de culture est de 25 mM.

4. Effet des Ambiances Gazeuses de Culture sur les Propriétés Redox de *B. bifidum*

4.1. Quantification des groupements thiols

4.1.1. Observation microscopique des groupements thiols exofaciaux

Le marquage des thiols de surface de *B. bifidum* est réalisé sur des cellules issues de trois conditions de cultures différentes (Contrôle, Azote, Azote – Hydrogène). Ce marquage est rendu possible grâce à la sonde Oregon Green 488 maléimide se fixant spécifiquement aux groupements thiols et incapable de traverser la membrane cytoplasmique.

Pour cette expérience, les cellules sont lavées dans du tampon phosphate (PBS, Phosphate Buffer Saline) 0,1 M pH 8 puis chaque DO est ajustée à 1. Les suspensions sont ensuite centrifugées pendant 15 min à 3500 g et les surnageants sont éliminés. Les culots cellulaires sont ensuite traités à l'Oregon Green 488 maléimide à une concentration de 40 μ M pendant 30 min à 37 °C à l'obscurité. A la suite de deux lavages des cellules, 1 μ L de chaque suspension bactérienne est déposé entre lame et lamelle. Les différents échantillons sont alors analysés en lumière blanche ainsi qu'à la longueur d'onde de 488 nm en utilisant un microscope confocal (Eclipse TE 2000 U ; Nikon, Tokyo, Japon). Le signal d'émission est mesuré entre 500 et 550 nm.

4.1.2. Dosage des groupements thiols exofaciaux et totaux

Les groupements thiols exofaciaux et totaux sont dosés par la méthode d'Ellman (Ellman and Lysko, 1979) qui utilise le réactif 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) réagissant spécifiquement avec les groupements thiolates libres, *via* une réaction d'échange thiol-disulfure, en libérant de manière stoechiométrique un composé chromogène jaune : l'anion nitrothiobenzoate (TNB⁻) absorbant à 412 nm. Le DTNB étant incapable de traverser la membrane cytoplasmique, seuls les groupements thiols exposés à la surface des bactéries sont détectés par cette méthode (Figure 27).

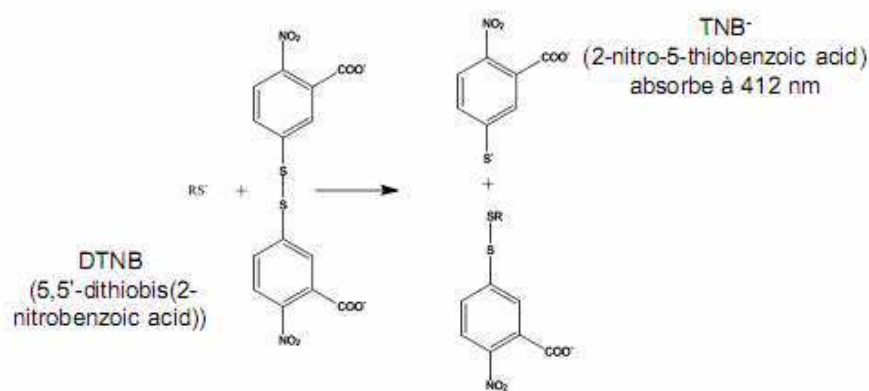


Figure 27 : Réaction d'une molécule de DTNB avec un groupement thiol libre

Lorsque la DO des cultures de *B. bifidum* a atteint une valeur de 1 (environ 16 h de culture), des échantillons de chaque condition gazeuse sont prélevés puis centrifugés 15 min à 3500 g. Les culots cellulaires obtenus sont alors concentrés puis resuspendus dans 1 mL de PBS 0,1 M pH 8, préalablement dégazé à l'azote, de façon à obtenir une DO finale de 2,5. En effet, une quantité relativement importante de cellules est nécessaire pour obtenir des valeurs de dosage conformes à une gamme étalon. 10 µL de solution DTNB 6 mM sont ensuite ajoutés à chaque échantillon. Puis, après 30 min d'incubation à 37 °C à l'obscurité les suspensions cellulaires sont centrifugées 15 min à 3500 g. Les surnageants sont ensuite filtrés à l'aide d'un filtre de 0,45 µm et l'absorbance à 412 nm des filtrats est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Lambda 20 ; Perkin Elmer, Boston, USA). Enfin, la concentration en groupements thiols libres est calculée grâce à la courbe étalon effectuée avec des solutions de différentes concentrations de N-acetyl-1-cysteine (NAC) allant de 5 à 60 µM (Figure 28).

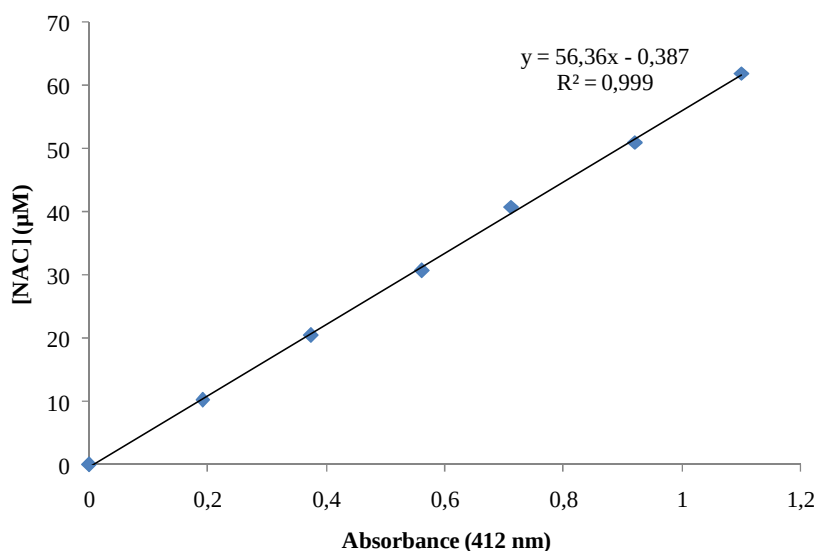


Figure 28 : Gamme étalon en N-acetyl-cystéine (NAC) établie pour le dosage des groupements thiols par la méthode d'Ellman.

Le dosage des thiols totaux est réalisé comme décrit précédemment. Cependant, avant l'ajout de DTNB, les cellules bactériennes sont cassées mécaniquement par 5 traitements de 45 secondes à 6 m.s^{-1} dans un Fast-prep (Fast-Prep 24 ; MP Biomedicals, Illkirch, France). Pour cette lyse, 300 mg de billes de diamètre inférieur à 50 μM sont utilisées (Sigma Aldrich, Lyon, France). Un dénombrement des bactéries est réalisé avant et après casse cellulaire sur du milieu MRS gélosé afin de s'assurer de l'efficacité du traitement.

4.2. Mesure du pouvoir réducteur par l'utilisation de sels de tétrazolium

Les sels de tétrazolium, incolores à l'état oxydé, deviennent colorés lorsqu'ils sont réduits en composés formazan. Ils peuvent être utilisés pour différencier le pouvoir réducteur de *B. bifidum* en fonction des conditions gazeuses de culture. Cette étude, basée sur les travaux de Michelon (Michelon, 2010) utilise quatre sels de tétrazolium : le 3-(4',5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,4-diphenyltetrazolium bromide (MTT), le tétrazolium violet (TV), le 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) et le bleu de tétrazolium (BT) classés respectivement du plus facile au plus difficile à réduire (Sollod *et al.*, 1992). Les différents sels sont alors ajoutés dans un milieu solide ou liquide à base de lait entier UHT (Carrefour) et l'apparition d'une coloration violette intense (MTT), pourpre (TV), rouge (TTC) ou bleue (BT) indique leur réduction.

La préparation des solutions de sels de tétrazolium est réalisée selon la procédure suivante : des solutions mères à 2 mg. mL^{-1} sont réalisées par dissolution de chaque sel dans de l'eau

permutée pendant 4 heures et à l'obscurité. Ces solutions mères sont stérilisées par filtration (filtre 0,22 µm) puis conservées à 4 °C à l'obscurité. Pour la confection des milieux solides, 1 volume de solution d'agar à 4,8% p/v (autoclavée 20 min, 121°C) en surfusion est mélangé à 3 volumes de lait. La solution mère de sel de tétrazolium est ensuite ajoutée au mélange de façon à atteindre une concentration finale de sel de 0,02 mg.mL⁻¹. Après agitation, le mélange est coulé dans des boîtes de pétri qui sont stockées une nuit à 4 °C à l'obscurité. Pour l'ensemencement, des gouttes de 5 µL de culture bactérienne à 1 UDO (soit environ 10⁸ cellules.mL⁻¹) sont déposées à la surface des géloses puis les boîtes sont incubées 48 h à 37 °C en aérobiose (Air) ou en anaérobiose (N₂) dans l'enceinte Bactron I. Pour la confection des milieux liquides, 100 µL de la solution mère de sels de tétrazolium (concentration finale de 0.02 mg.mL⁻¹) ainsi que 100 µL de culture bactérienne à 1 UDO sont ajoutés à 10 mL de lait. Les suspensions sont ensuite incubées à 37 °C.

4.3. Mesure de la résistance à un stress oxydant

Des mesures comparatives de croissance sont réalisées à partir des trois conditions de culture de *B. bifidum*. Après 16 h de culture, des échantillons de 30 µL de chaque condition sont prélevés puis ajoutés dans une microplaque 96 puits à 170 µL de milieu MRS contenant de l'H₂O₂ (Sigma Aldrich, Lyon, France). La concentration en H₂O₂ testée est de 0,1 mM. L'absorbance est mesurée toutes les heures à 600 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Paradigm, Beckman Coulter, Miami, USA) pendant 24 h.

5. Analyse des Acides Gras et des Propriétés de Surface

5.1. Analyses des acides gras

5.1.1. Extraction des lipides et préparation des esters méthyliques d'acides gras

Les lipides totaux ont été extraits des culots cellulaire de *B. bifidum* selon la méthode de Folch *et al.* (Folch *et al.*, 1957) avec quelques modifications. Les culots cellulaires sont lavés, re-suspendus dans 2 ml de PBS (concentration finale de 5x10⁹ UFC/mL) et une extraction avec 4 volumes d'un mélange chloroforme/méthanol (2 :1 v/v) et 1 volume de NaCl 0,73% est

réalisée. Après 2 minutes de vortex, le mélange est centrifugé (3 min, 1000 g). La phase inférieure est transférée dans un tube en verre, puis les solvants sont évaporés sous azote et le tube est pesé pour déterminer la masse approximative de lipides. Les lipides sont ensuite transméthylés par ajout de trifluorure de bore (dans du méthanol) selon la méthode de Morrison and Smith (Morrison and Smith, 1964). Aucune différence dans la quantité de lipides n'a été mise en évidence entre les trois conditions de culture.

5.1.2. Analyse en chromatographie gazeuse des esters méthyliques d'acides gras

Les esters méthyliques d'acides gras sont analysés à l'aide d'une chromatographie gazeuse Hewlett Packard Model 5890 (Palo Alto, CA, USA) avec une colonne CPSIL-88 (100 m × 0.25 mm, épaisseur du film 0.20 µm; Varian, Les Ulis, France). L'hydrogène est utilisé comme gaz vecteur (à une pression de 210 kPa). La température du four est maintenue à 60 °C pendant 15 min, puis augmentée à 85 °C à une vitesse de 3 °C/min et ensuite à 190 °C à une vitesse de 20 °C/min et finalement maintenue à cette température. L'injecteur et le détecteur à ionisation de flamme sont maintenus respectivement à 250 °C et 280 °C. Les esters méthyliques d'acides gras sont identifiés en comparaison avec des étalons internes. Les données sont analysées à l'aide du logiciel Galaxie (Varian, Les Ulis, France) et exprimées en pourcentage par rapport aux acides gras totaux.

5.2. Analyse de la fluidité membranaire

La fluidité membranaire a été déterminée en mesurant l'anisotropie de fluorescence en utilisant le 1,6-diphényl-1,3,5-héxatriène (DPH) (Laroche *et al.*, 2001). Une solution mère à 1 mM de DPH (Sigma Aldrich) est réalisée dans du tétrahydrofurane. Les cellules sont lavées deux fois et le culot (10^8 UCF) est repris dans 3 mL de PBS. 9 µL de DPH sont ajoutés dans la solution (concentration finale en sonde 3 µM). Les échantillons sont agités et placés dans le porte cuvette du spectrofluorimètre (Hitachi F-4500, Japan). La température des échantillons est mesurée à l'aide d'un thermocouple immergé dans la solution à analyser. Les mesures sont effectuées sur une spectromètre Fluorolog 3 (Jobin-Yvon, Horiba Group, Edison, NJ), à polarisation de fluorescence. Les longueurs d'onde d'émission et d'excitation sont respectivement de 360 ± 2 nm et de 431 ± 5 nm (Simonin *et al.*, 2008). Le principe de mesure

est le suivant : l'échantillon, constitué de molécules fluorescentes, est éclairé par un faisceau lumineux polarisé suivant l'axe Z et se propageant parallèlement à l'axe X (Figure 29). On mesure l'intensité lumineuse émise par l'échantillon dans la direction Y, dans les deux polarisations X et Z. Ces intensités, notées $I_{\perp}$ et $I_{\parallel}$ respectivement, permettent de calculer le paramètre d'anisotropie (r) :

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2 I_{\perp}) ;$$

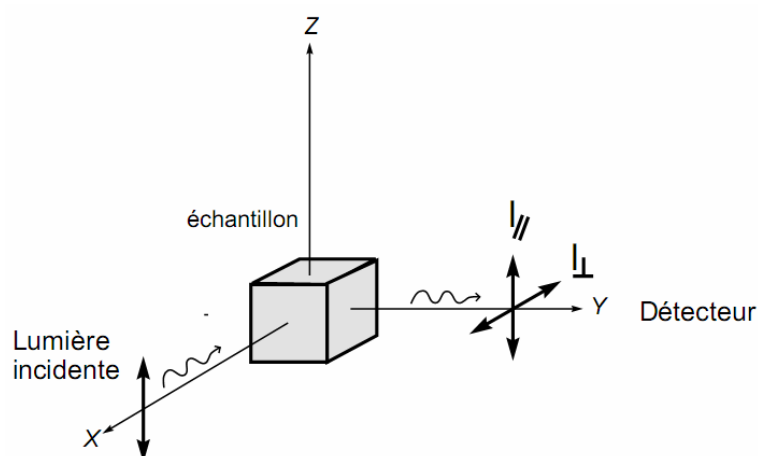


Figure 29 : Principe de la mesure d'anisotropie de fluorescence (Le Floc'h, 2004).

La mesure de l'intensité de fluorescence est corrigée en soustrayant l'intensité lumineuse des cellules non marquées et du DPH dans du tampon. Le bruit de fond n'excède pas 10% de l'intensité des essais.

5.3. Adhésion aux solvants

L'adhésion microbienne aux solvants (Microbial adhesion to solvents ou MATS) est mesurée selon la méthode de Rosenberg *et al.* avec quelques modifications (Rosenberg *et al.*, 1980; Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Les bactéries sont lavées deux fois et re-suspendues dans 5 mL de PBS (concentration cellulaire finale de 10^8 UFC/mL). L'absorbance de la suspension est mesurée à 600 nm (A_0). 1mL de solvant est ajouté à 3 mL de suspension bactérienne. Après 10 min de co-incubation à 37 °C, les échantillons sont vortexés pendant 2 min. La phase aqueuse est retirée après 20 min d'incubation à 37 °C et l'absorbance à 600 nm (A_1) est lue. Trois solvants ont été utilisés : le chloroforme, l'hexadécane et l'acétate d'éthyle. L'adhésion à l'hexadécane reflète de l'hydrophobicité des souches testées. Les deux autres solvants renseignent sur les caractéristiques de donneur (chloroforme) ou d'accepteur (acétate

d'éthyle) d'électrons (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). L'adhésion au solvant est calculée de la manière suivante :

$$\% \text{ adhérence} = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

5.4. Mesure de l'auto-agrégation

Les tests d'auto-agrégation sont effectués suivant la méthode de Del Re *et al.* (Del Re *et al.*, 2000). Les bactéries sont cultivées 18 h à 37 °C en milieu MRS* liquide. Les cellules sont centrifugées (15 min, 4500 g), lavées deux fois dans du PBS et re-suspendues dans du PBS à une DO de 1. 4 ml de suspension cellulaire sont ensuite vortexés pendant 10 secondes et l'auto-agrégation est déterminée pendant 5 h d'incubation à 37 °C. Chaque heure, 0,1 ml est prélevé sur le dessus de la suspension et une mesure d'absorbance est effectuée. Le pourcentage d'auto-agrégation est exprimé de la façon suivante :

$$\% \text{ auto-agrégation} = (1 - A_t/A_0) \times 100$$

5.5. Adhésion aux cellules épithéliales

5.5.1. Culture cellulaire

L'adhérence aux cellules épithéliales a été analysée par l'utilisation de cellules intestinales Caco-2, lignée cellulaire d'adénocarcinome colique humain exprimant plusieurs marqueurs caractéristiques des cellules villositaires de l'intestin. Ces cellules sont obtenues auprès de l'ATCC. Elles sont cultivées à 37 °C sous une atmosphère comprenant 5% de CO₂, dans du milieu essentiel minimum Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé (SVF) (30 min, 56 °C), 1% d'acides aminés non essentiels et 1% de glutamine. Pour les essais d'adhésion, les Caco-2 sont spécifiquement cultivées sur des plaques 24 puits. Les cellules sontensemencées à une concentration de 2x10⁵ cellules / puits. Le milieu de culture est changé tous les deux jours.

5.5.2. Adhésion *in vitro* aux cellules Caco-2

Les tests ont été réalisés comme décrit par Forestier *et al.* avec quelques modifications (Forestier *et al.*, 2001). Les cellules Caco-2 sont utilisées après 15 jours d'incubation, à un

stade post-confluent, avec changement de milieu tous les deux jours. Au moins une heure avant le test d'adhésion, le milieu des cellules est remplacé par du DMEM non supplémenté en SVF. L'adhérence de *B. bifidum* aux cellules épithéliales est réalisée en ajoutant 50 μL de bactéries (5×10^8 UFC/ml) par puits contenant les cellules Caco-2 à post-confluence (1 ml de milieu DMEM par puits). Après incubation à 37 °C pendant 1 h, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et traitées sur glace avec du triton X-100 pendant 5 minutes pour lyser les cellules. Le pourcentage de cellules bactériennes adhérentes est déterminé en réalisant des dilutions successives sur boîtes gélosées mMRS.

6. Application des Stress Représentatif du Procédé de Fabrication et du Tractus Gastro-Intestinal

6.1. Application des stress représentatifs du tractus gastro-intestinal

Les cellules en début de phase stationnaires sont lavées deux fois et reprises dans du milieu tryptone-sel. La concentration cellulaire est ajustée à 10^8 UFC/mL. Les cellules sont incubées avec des fluides gastro-intestinaux (Masco *et al.*, 2007). Le fluide gastrique artificiel (pepsine 0,3% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), pH 2 ajusté avec du HCl) ou les sels biliaires sont ajoutés aux culots cellulaires. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 h à 37 °C. Le fluide intestinal artificiel (pancréatine 0,1% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), pH 8 ajusté avec du NaOH) est ajouté aux culots cellulaires. Les cellules sont incubées pendant 24 h à 37 °C. Afin de générer un stress oxydant, une fois lavées, les cellules ont été mises en contact avec de la ménadione 10 mM (PBS) pendant 24 h. Cette molécule entraîne la formation de $\text{O}_2^{\bullet-}$ chez les cellules (Figure 30). La viabilité et la vitalité sont ensuite mesurées par cytométrie en flux.

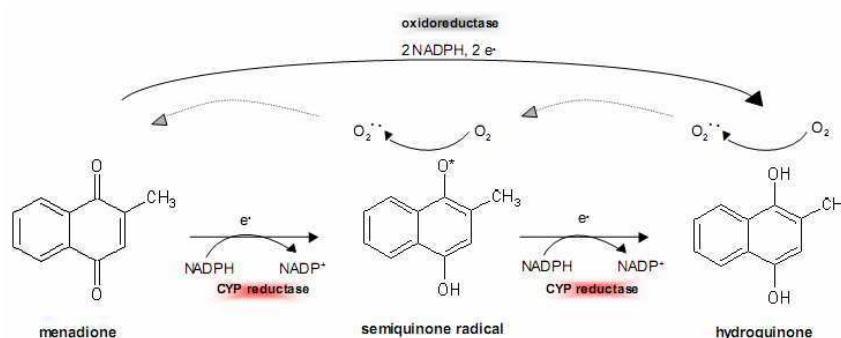


Figure 30 : Réaction redox de la ménadione. En condition aérobie, les formes actives peuvent être ré-oxydées de façon non-enzymatique produisant ainsi des ROS (Göttel, 2009).

6.2. Applications des stress représentatifs du procédé

Les cellules en début de phase stationnaires sont lavées deux fois et reprises dans du milieu tryptone-sel. La concentration cellulaire est ajustée à 10^8 UFC/mL. Les suspensions bactériennes sont congelées à -80 °C. La viabilité et la vitalité sont mesurées après un cycle de congélation – décongélation (cinétique de congélation de 8 °C/min, 24 h de maintien à -80 °C et cinétique de décongélation de 24 °C/min) (Dumont *et al.*, 2004) (Figure 31).

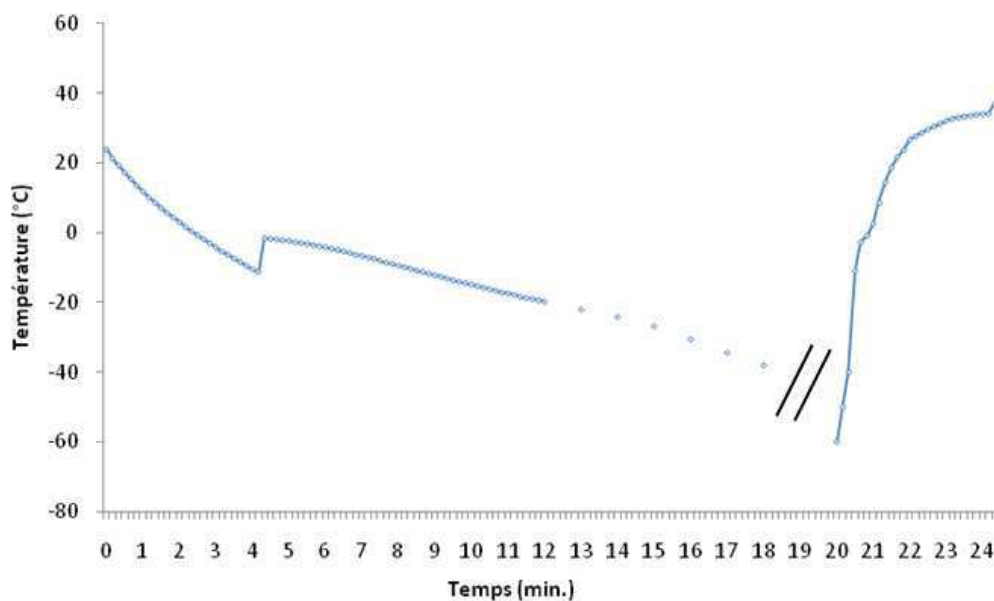


Figure 31 : Congélation et décongélation des préparations bactériennes

6.3. Protocole de marquage

Avant l'analyse en cytométrie en flux, les échantillons sont lavés au PBS. Les taux de survie (viabilité) et l'activité enzymatique (vitalité) après l'application d'un stress sont estimés par cytométrie en flux (FACS Aria II, BD Biosciences, San Jose, USA). L'iodure de propidium (IP), utilisé pour contrôler l'intégrité cellulaire (viabilité), est une sonde qui ne pénètre que dans les cellules perméabilisées et fluoresce lors de sa complexation avec les acides nucléiques intracellulaires. Cette sonde est dissoute dans de l'eau distillée (10 mg.mL⁻¹) pour préparer la solution stock. La carboxyfluorescéine diacétate (cFDA) est utilisée pour contrôler la vitalité cellulaire puisqu'elle peut être clivée par l'activité estérasique intracellulaire et ainsi fluorescer. Cette sonde est dissoute dans du DMSO ($9,2$ mg.mL⁻¹) pour préparer le solution stock. Les tests sont réalisés par un double marquage pour quantifier la viabilité et la vitalité

de chaque échantillon après un stress. Les cellules (1 mL à 10^8 UFC/mL) sont incubées pendant 10 minutes avec $0,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ de solution stock de cFDA, puis lavées et marquées avec $0,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ de solution stock de IP. Après 5 minutes d'incubation, les échantillons sont analysés par cytométrie en flux.

6.4. Analyse en cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique d'analyse quantitative et qualitative de cellules et de particules en suspension. Elle permet l'étude de caractéristiques physiques et chimiques telles que la taille, la granulométrie et d'autres composants ou fonctions pouvant être détectés grâce à des sondes fluorescentes spécifiques. Les cellules sont entraînées par un flux liquide et défilent à grande vitesse, cellule par cellule, dans le faisceau d'un ou plusieurs lasers (jusqu'à 30000 événements par seconde). La lumière réémise par les cellules (par diffusion ou fluorescence) permet de distinguer des sous-populations selon différents critères. Les signaux lumineux sont collectés par des photo-détecteurs (photodiode pour la diffusion petits angles, photomultiplicateurs pour la diffusion grands angles et la fluorescence) qui vont les transformer de façon proportionnelle en signaux électriques. Ces signaux sont ensuite envoyés à un analyseur multicanaux permettant la représentation de la répartition de la population analysée, en fonction du ou des paramètres étudiés (Figure 32).

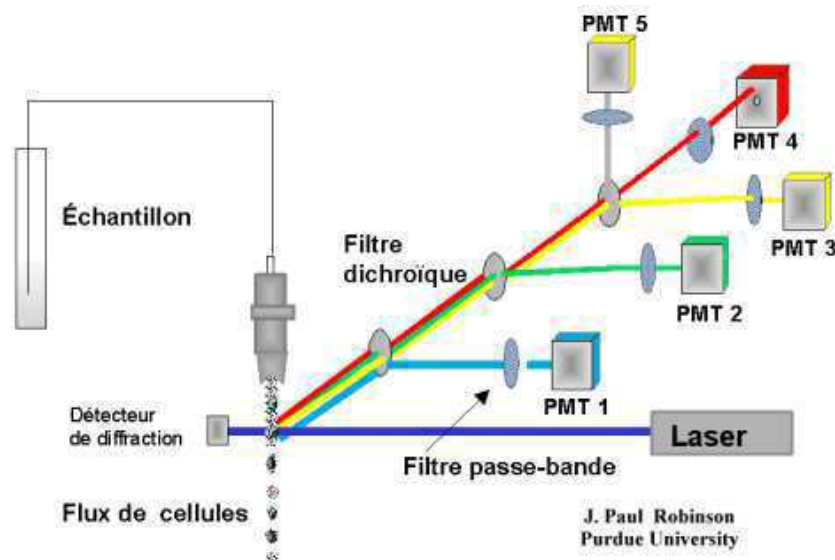


Figure 32 : Schéma du principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux (d'après Robinson J. P., 1999).

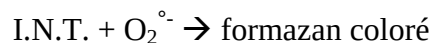
Avant de réaliser les analyses, les compensations des deux sondes fluorescentes ont été calculées. Un mélange de cellules mortes et vivantes (50-50) doublement marquées a été utilisé pour vérifier les compensations. Ainsi, 53% des cellules ont été détectées comme viable et 47% ont été détectées comme mortes. Pour chaque échantillon, 10000 événements sont collectés par le cytomètre de flux FACSCAria II équipé d'un laser d'excitation argon à 488 nm. Des filtres optiques à 530 (cFDA) et à 670 (IP) nm sont utilisés pour récupérer la fluorescence émise par les cellules. Les résultats sont issus au minimum de trois répétitions indépendantes.

7. Mesure de la Fonctionnalité

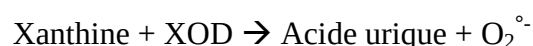
7.1. Mesure des activités SOD et catalase

La mesure de l'activité catalase se fait par mise en contact d'une colonie de bactéries avec du peroxyde d'hydrogène. Un dégagement gazeux témoigne d'une activité catalase positive.

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) est mesurée en utilisant un kit commercial (RANSOD, Randox, Ardmore, UK) (Kullisaar *et al.*, 2002). Ainsi, l'activité SOD est mesurée par le degré d'inhibition de la réaction de l'I.N.T. (chlorure de 2-(p-iodophényl) -3-p(nitrophényl)-5 phényl tétrazolium) avec le radical superoxyde :



La formation du radical superoxyde étant générée par la réaction entre la xanthine et la xanthine oxydase (XOD) :



A 0,05 mL d'extrait cellulaire de bactéries (obtenu comme exposé au paragraphe 3.1.2.) sont ajoutés 1,7 mL de substrat et incubés à 37 °C. Puis 250 µL de xanthine oxydase sont ajoutés, et l'absorbance est mesurée après 30 secondes et 3 minutes. L'activité SOD est exprimée en U/mg de protéines.

7.2. Mesure du TAA

L'activité totale antioxydante (TAA) est mesurée par un kit commercial (TAS, Randox, Ardmore, UK). Cette méthode est basée sur la capacité des bactéries à inhiber le radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2' azinobis (3

éthylbenzothiazoline 6 sulfonique)) comparativement à un antioxydant de référence, le Trolox, dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E. L'obtention du radical cation résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de peroxydation (peroxydase metmyoglobine) en présence de H_2O_2 . Le radical $ABTS^{\bullet+}$, en contact avec un donneur de $H^{\bullet}$ conduit à l' $ABTS^+$ et à la décoloration à 600 nm de la solution.

A 1 ml de chromogène (metmyoglobine) est ajouté 0,02 ml de lysat cellulaire dans du PBS (10^8 UFC/mL) ou de Trolox. L'absorbance initiale est mesurée. Puis 0,2 mL de substrat (H_2O_2) est ajouté. Après exactement 3 minutes d'incubation à 37 °C, l'absorbance est lue à 600 nm. Les résultats sont exprimés en unité Trolox (mmol/L).

7.3. Mesure du potentiel anti-radicalaire global

Le potentiel global anti-radicalaire a été évalué en utilisant le test biologique KRL mis au point par la société Lara Spiral (Couternon, France) (Prost, 1992). Ce test permet l'évaluation de la résistance des globules rouges à une attaque radicalaire induite par une molécule chimique (AAPH ou 2,2'-azobis (2-amidinopropane) qui agit en produisant des radicaux hydroxyles, ce qui induit une peroxydation lipidique et protéique de la membrane cellulaire (Dai *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Les échantillons de sang provenant de chevaux ont un temps de demi-hémolyse proche de la référence médiane retrouvé chez le cheval ($\pm 3\%$) (Pastorelli *et al.*, 2010). L'hémolyse est enregistrée sur un lecteur de plaque 96 puits (GRL 400, Kirial SA, Couternon, France). Les résultats, exprimés comme le temps nécessaire pour atteindre 50% du maximum d'hémolyse (temps de demi-hémolyse ou HT50, en minutes), sont standardisés en équivalent Trolox. Les bactéries sont re-suspendues dans du PBS et utilisées à une dose de 1×10^7 UFC/ml.

7.4. Mesure du pouvoir anti-mutagène

7.4.1. Co-incubation avec le 4NQO

Le pouvoir anti-mutagène des bactéries est mesuré par l'utilisation du 4-nitroquinoline-N-oxide (4NQO), molécule à la fois pro-oxydante (précurseur du $O_2^{\bullet-}$) et mutagène. Les préparations bactériennes sont lavées deux fois puis re-suspendues dans du PBS (5×10^8 UFC/ml). Le 4NQO est ajouté aux cellules (concentration finale de la molécule de 0,1 mM).

La co-incubation est maintenue à 37 °C pendant 180 min sous agitation (100 rpm). Les cellules sont centrifugées et le surnageant est filtré (filtre PVDF 0,2 µm). Le spectre d'absorbance du surnageant est analysé en spectrométrie pour évaluer une éventuelle modification de la molécule. Des expériences sont également menées avec de la cystéine (1,7 mg.L⁻¹ à 10 g.L⁻¹) et avec des cellules tuées thermiquement (100 °C / 15 min) (Lankaputhra and Shah, 1998). L'effet du surnageant bactérien est également évalué.

7.4.2. Test des comètes

Au préalable de ce test, la cytotoxicité du surnageant bactérien et du 4NQO a été évalué. Pour ce faire, après 18 h de co-culture entre les cellules Caco-2 et le surnageant bactérien ou le 4NQO, les cellules viables sont comptées au bleu de Trypan. Le surnageant bactérien tout comme le 4NQO ne présentent pas d'effet cytotoxique ([Tableau 13](#)).

**Tableau 13 : Effet du surnageant bactérien sur la viabilité des cellules Caco-2 (comptage au bleu Trypan).
CV : coefficient de variation.**

	PBS	Surnageant bactérien	4NQO
Cellules vivantes	1,2x10 ⁶ (CV : 9%)	1,4x10 ⁶ (CV : 3%)	1,1x10 ⁶ (CV : 8%)
Cellules mortes	6,1x10 ⁴ (CV : 47%)	4,4x10 ⁴ (CV : 71%)	6,1x10 ⁴ (CV : 0%)

Le test des comètes (Singh *et al.*, 1988) a été utilisé sur des cellules Caco-2 avec quelques modifications. Cette méthode en conditions alcalines permet de détecter non seulement les cassures doubles brins mais aussi les lésions simples brins et les sites alcali-labiles résultants d'une exposition à un agent génotoxique. Le protocole se déroule en cinq étapes : (1) La préparation des lames et des gels d'agarose est une étape importante car les gels doivent être suffisamment stables pour permettre la manipulation mais surtout doivent être suffisamment réguliers pour éviter un bruit de fond trop important. Après solidification du gel contenant les cellules, les lames sont placées dans une solution préparée à partir de sels à forte concentration et de détergents, ce qui aboutit à une lyse de l'intégralité du matériel extranucléaire (membrane nucléaire comprise) ; (2) L'ADN est ensuite dénaturé (déroulé) par rupture des liaisons hydrogènes à pH 13 pour produire les simples brins et permettre l'expression des sites alcali-labiles et des cassures de brins d'ADN ; (3) L'ADN ainsi préparé est ensuite placé dans un champs électrophorétique pour produire les comètes ; (4) Après neutralisation, les brins d'ADN séparés par les conditions alcalines peuvent reprendre leur

forme initiale super enroulée dans la tête alors que l'ADN de la queue reste sous forme simple brin ; (5) Les comètes sont visualisées après coloration de l'ADN par un agent intercalant fluorescent.

Les cellules Caco-2 sont cultivées comme décrit précédemment. Le test est réalisé sur des plaques 6 puits ; les puits contenant 2 mL de DMEM sont inoculés avec 1×10^6 cellules. Les cellules sont mises à incuber (18 h / 37 °C). Le milieu est renouvelé et 100 µL du mélange surnageant bactérien – 4NQO est ajouté au 2 mL de DMEM. Puis une incubation de 18 h à 37 °C est réalisée. Un contrôle négatif est réalisé avec du PBS et un contrôle positif avec du MMS (méthanesulfonate de méthyle ; concentration finale par puits de 65 µM). A la fin du traitement, le milieu est éliminé et les cellules sont décollées avec 25 µL d'EDTA (incubation de 5 minutes à 37 °C). Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 100 g et 4 °C dans un tube Eppendorf contenant 1 mL de milieu DMEM. Le culot cellulaire est repris par 100 µL de DPBS et le tube est maintenu à 4 °C dans la glace. Les cellules sont aliquotées dans 2 tubes Eppendorf (50 µL/tube) gardés sur glace. A ces 50 µL de cellules sont ajoutés 75 µL d'agar LMP (low melting point) 0,5% à 37 °C. 70 µL de ce mélange sont déposés sur une lame trempée la veille dans de l'agarose NMP (normal melting point) à 1% maintenu en surfusion. Les lames sont mises en contact avec 135 mL de solution mère de lyse (NaCl 2M, EDTA₂Na 100 mM, tampon Tris 10mM et sarcosinate de sodium 10g/L), 15 mL de DMSO et 1,5 mL de Triton x100 pendant 1 h à 4 °C. Les lames sont ensuite égouttées puis déposées dans la cuve d'électrophorèse. La cuve est ensuite remplie avec 1 L de tampon pH 13 (NaOH 300 mM, EDTA₂Na 1 mM, H₂O qsp 1 litre). Après 20 minutes, l'électrophorèse est démarrée (300 mA, 25 mV, 20 min). L'ADN des cellules non altérées ne migre pas, l'ADN des cellules altérées est fragmenté et ces fragments d'ADN migrent vers le pôle positif formant ainsi une queue plus ou moins longue qui donnera la comète. Les lames sont rincées trois fois avec du tampon Tris, une fois avec de l'éthanol absolu et séchées à température ambiante. L'ADN est ensuite marqué avec 40 µL d'IP (5 mg/L) puis analysée en microscopie de fluorescence. 100 comètes individuelles par lames et 3 lames par espèce bactérienne ou condition de culture sont évaluées visuellement au microscope. Pour l'analyse, les comètes sont classées selon leur appartenance à l'une des 5 classes selon l'intensité de leur queue ([Figure 33](#)).

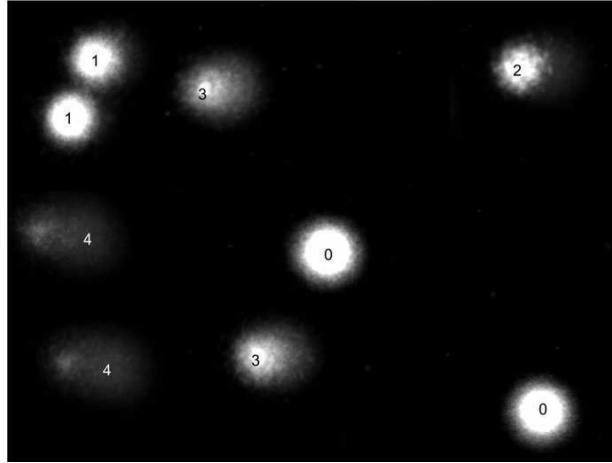


Figure 33 : Exemple de comètes (lymphocytes humains). Le numéro indique le score attribué visuellement. (Collins *et al.*, 2008).

Chaque classe de comètes est évaluée entre 0 et 4 : (0) = pas de dégât et (4) = dégâts maximum. Le score total des comètes est évalué de la façon suivante :

(pourcentage des cellules de classe 0)*0 + (pourcentage des cellules de classe 1)*1 + (pourcentage des cellules de classe 2)*2 + (pourcentage des cellules de classe 3)*3 + (pourcentage des cellules de classe 4)*4. Par conséquent, le score est compris entre 0 et 400 (unité arbitraire).

8. Traitement Statistique des Données

Les différentes analyses statistiques des résultats ont été effectuées à l'aide du logiciel R version 2.12.2 (R Foundation, Vienne, Autriche). Un test ANOVA a été utilisé afin de vérifier que les distributions sont identiques et un test de Student-Newman-Keuls (SNK) permettant la comparaison de moyennes par paires. Sauf cas contraires, les différences ont été considérées comme significatives pour un risque $\alpha \leq 0,05$.

RESULTATS

RESULTATS

1. Mise en Place d'un Crible Permettant de Sélectionner des Bactéries Probiotiques Résistantes et Fonctionnelles

Objectif de l'étude : le but de cette étude est de mettre en place un crible permettant de sélectionner rapidement des souches probiotiques résistantes aux conditions du tractus gastro-intestinal et aux procédés industriels. L'utilisation de la cytométrie en flux permet de cribler des souches à la fois sur leur résistance aux stress (paramètre viabilité) mais également sur leur aptitude à rester métaboliquement actives après un stress (paramètre vitalité). Ainsi, la viabilité mesure la perméabilité membranaire et la vitalité mesure l'activité enzymatique des souches après un stress. Ces deux paramètres combinés permettent de renseigner sur l'état physiologique des souches après un stress. Un crible de la fonctionnalité « antioxydante » est également mis en place. Ce crible devra permettre de sélectionner des souches à la fois sur des critères enzymatiques (SOD, catalase) mais également sur leur aptitude à diminuer le stress oxydant en présence de cellules animales ou humaines. En amont de la mise en place de ce crible, l'INRA a au préalable sélectionné 9 souches sur des critères de fonctionnalité « immuno-modulation » et/ou « antioxydant » ([Tableau 12](#)). De plus, l'efficacité des souches choisies devra être comparée à des souches industrielles de référence. A cet effet, deux souches sont rajoutées dans les souches à cribler : *Lb. casei* DN114-001 et *Lb. fermentum* ME-3. A l'issue du criblage des souches sur leur viabilité/vitalité et sur leur fonctionnalité, une ou deux souches seront retenues pour être testées *in vivo* par l'INRA MICALIS.

1.1. Screening viabilité - vitalité

La sélection des souches probiotiques s'est faite *via* la détection en cytométrie en flux de la viabilité et la vitalité des bactéries après un stress. Pour cela, un marqueur des acides nucléiques, l'iodure de propidium ou IP a été utilisé. Il a la particularité de marquer le noyau des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, phénomène caractéristique de la nécrose cellulaire. Le cFDA a également été employé pour mesurer la vitalité des souches *via* l'activité estérasique. La [Figure 34](#) présente ainsi la technique de marquage : des cellules vivantes apparaissent négatives marquées ou non à l'IP (a, c) ; des cellules mortes

apparaissent négatives si elles ne sont pas marquées à l'IP (b) et positives une fois marquées (d). Pour le cFDA, les bactéries possédant des activités enzymatiques sont positives une fois marquées (e) et négatives si elles ne possèdent plus d'activité (f).

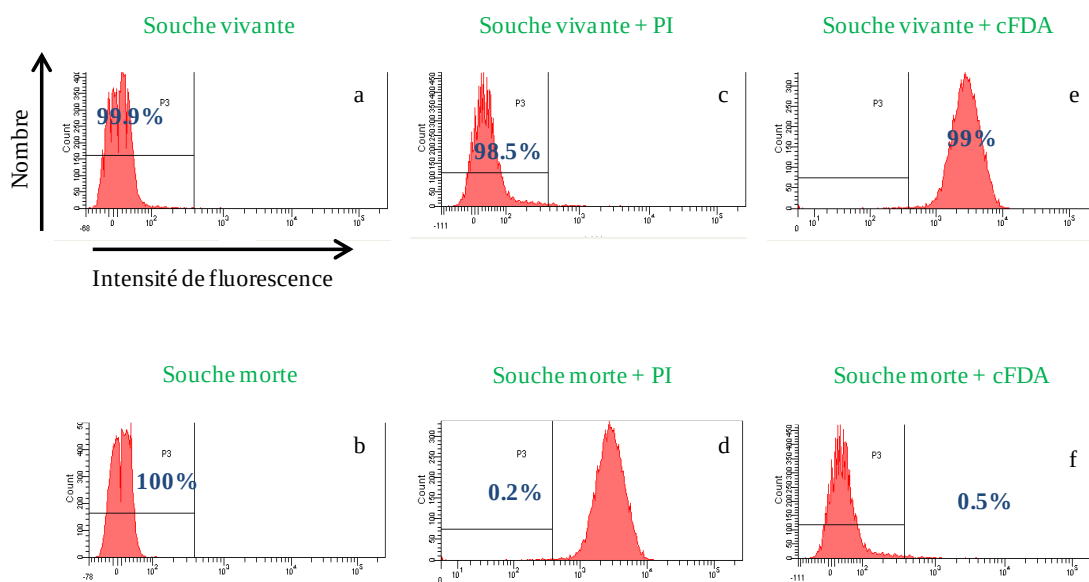


Figure 34 : Marquages des témoins positifs et négatifs à l'IP et au cFDA.

Différents stress ont été retenus pour permettre la sélection d'une bactérie probiotique fonctionnelle et résistante :

- stress du tractus gastro-intestinal : Estomac (pH2, pepsine), Colon (pH8, pancréatine), Sels biliaires, Stress oxydant (H_2O_2 ou ménadione) ;
- stress du procédé : Congélation, Stress osmotique (NaCl), Lyophilisation, Séchage aérien, Stress « yaourt » (attente à froid 24 h en présence de lactate) et Stress oxydant (H_2O_2 et ménadione).

Ces stress ont été élaborés pour avoir des réponses graduées des souches et non uniquement une réponse binaire 0 ou 100% (Figure 35).

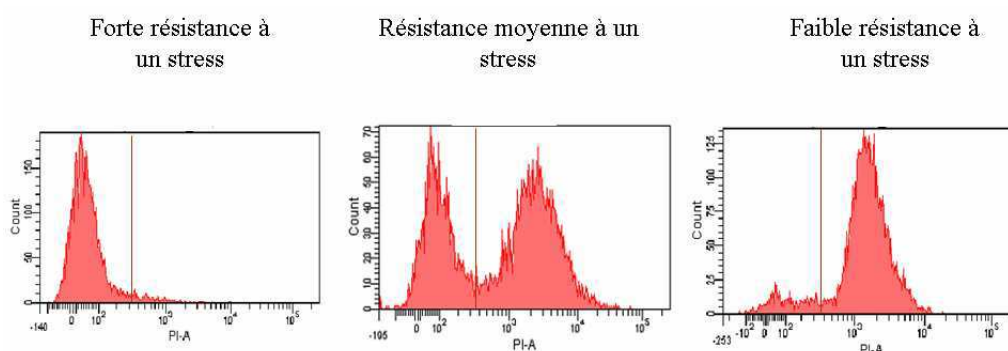


Figure 35 : Effet d'un stress sur la viabilité de 3 souches probiotiques (mono-marquage à l'IP).

Ainsi, le stress « yaourt » et le stress oxydant avec l'H₂O₂ ont été éliminés puisqu'ils ne permettaient pas une discrimination des souches.

1.1.1. Simulation du passage dans l'estomac

Pour ce test de screening, les souches ont été plongées pendant une heure dans une solution isotonique à pH 2 avec 3g/L de pepsine à 37 °C (Masco *et al.*, 2007). Les résultats de la [Figure 36](#) montrent une tolérance souche-spécifique à l'acidité stomacale. Des traitements statistiques ont été réalisés afin de différencier les souches entre elles pour chaque stress. Ils sont présentés [Tableau 14](#) et [Tableau 15](#).

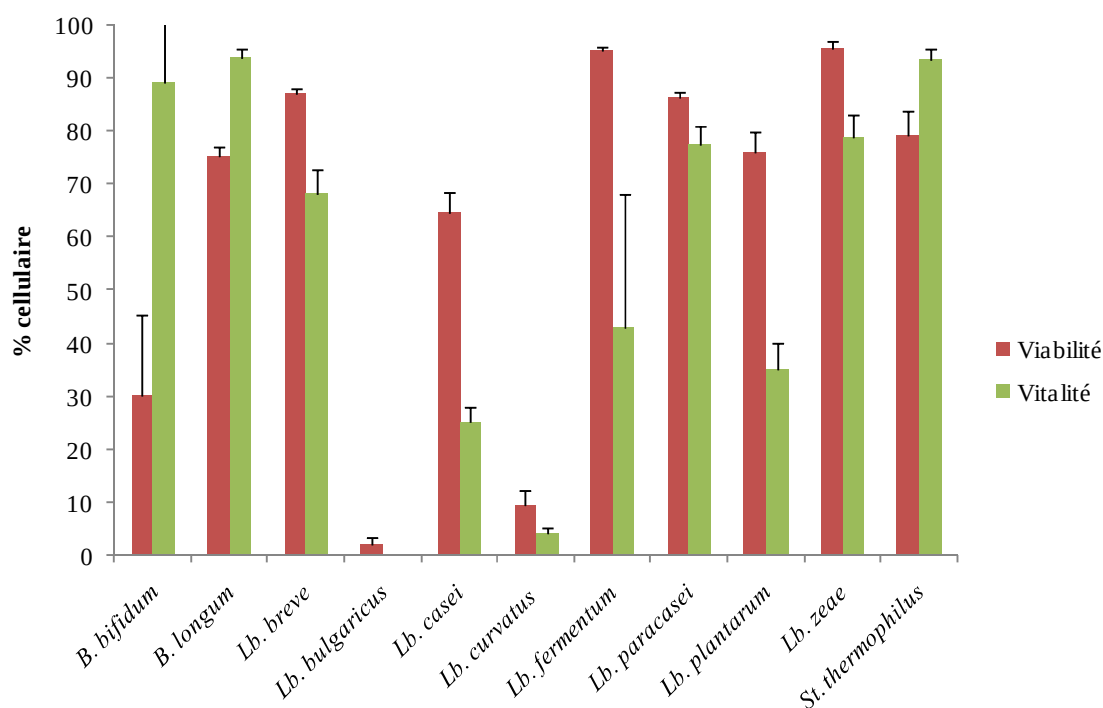


Figure 36 : Effet d'un fluide gastrique artificiel sur la viabilité et la vitalité des souches probiotiques.

Ce test est très discriminant et permet d'éliminer les souches les plus fragiles. Les trois souches présentant le meilleur taux de survie sont *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. zeae*. En effet, après le traitement, ces souches perdent moins de 10% de viabilité. Parmi ces trois souches, seule la *Lb. zeae* présente également une forte activité enzymatique après le traitement, avec une vitalité de plus de 80%. Deux autres souches présentent également une bonne vitalité après le stress acide, ce sont les souches *B. longum* et *St. thermophilus* (plus de 90% de vitalité). Au contraire, les souches les moins résistantes et présentant la moins bonne vitalité après le stress sont *Lb. bulgaricus*, *B. bifidum* et *Lb. curvatus*.

1.1.2. Simulation du passage dans le côlon

Afin de caractériser et de comparer la résistance au passage du tube digestif des onze souches sélectionnées, les probiotiques ont été plongées pendant vingt quatre heures dans une solution binaire isotonique pH 8 avec 1g/L de pancréatine à 39 °C (Masco *et al.*, 2007). Puis, le taux de survie des souches probiotiques a été mesuré par cytométrie de flux. Les résultats sont présentés Figure 37.

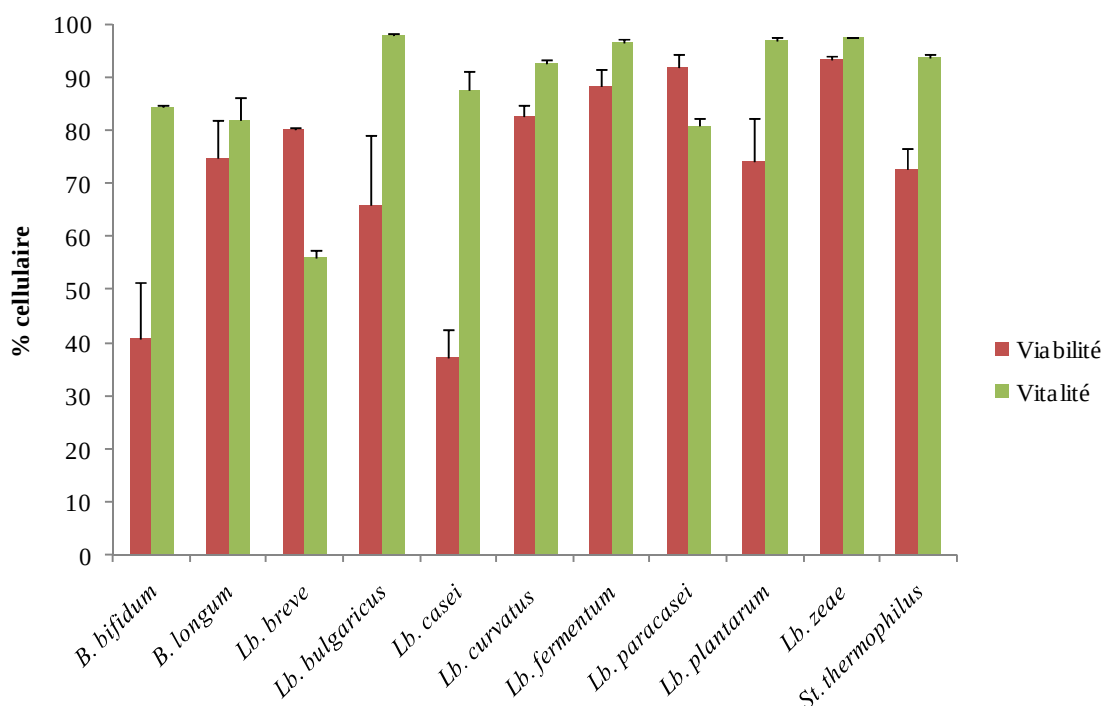


Figure 37 : Effet d'un fluide intestinal artificiel sur la viabilité et la vitalité des souches probiotiques.

Les résultats obtenus montrent une bonne résistance de l'ensemble des micro-organismes à ce test de screening puisque presque toutes les souches ont un taux de survie supérieur à 70%. Cependant, seules trois souches présentent un taux de survie supérieur à 90%. Ce sont les souches *Lb. fermentum*, *Lb. paracasei* et *Lb. zae*. Deux souches présentent une viabilité plus faible ; il s'agit de *B. bifidum* et *L. casei*. Le paramètre vitalité ne permet pas de faire ressortir une souche en particulier puisqu'elles ont toutes une vitalité supérieure à 80%. Seule la souche *L. breve* présente une vitalité inférieure à 60% après le stress représentatif du côlon.

1.1.3. Effet des sels biliaires

La viabilité et la vitalité des souches probiotiques après un stress biliaire 0,1% pendant 1 h sont présentées [Figure 38](#).

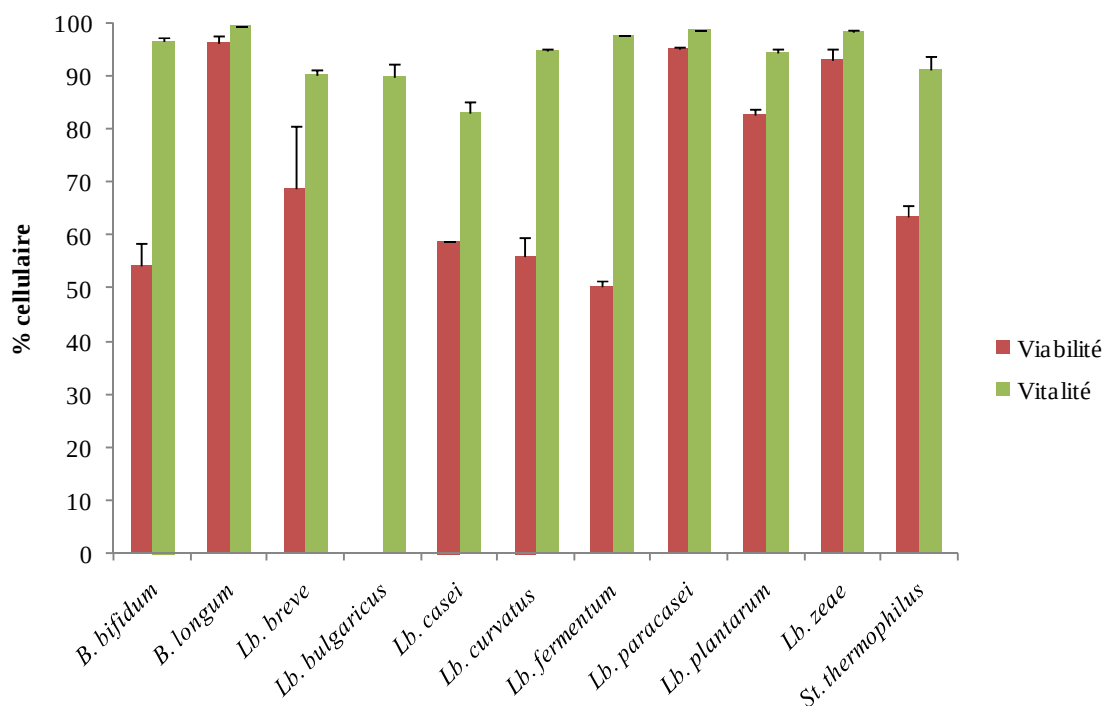


Figure 38 : Effet des sels biliaires sur la viabilité et la vitalité des souches probiotiques.

Les onze souches testées présentent une résistance très différente à l'exposition aux sels biliaires. Ainsi, les souches *B. longum*, *Lb. paracasei* et *Lb. zae* présentent une très bonne résistance. Les autres souches testées présentent une faible survie après le stress acides biliaires, en particulier les souches *B. bifidum*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. curvatus* et *Lb. fermentum*. Comme pour le stress côlon, la vitalité des souches après traitement avec les sels biliaires est très élevée (>80%).

1.1.4. Effet d'un cycle congélation / décongélation

Afin de caractériser et de comparer la résistance des onze souches sélectionnées au procédé de congélation, les probiotiques ont été soumis à un cycle congélation-décongélation. Les résultats sont présentés [Figure 39](#).

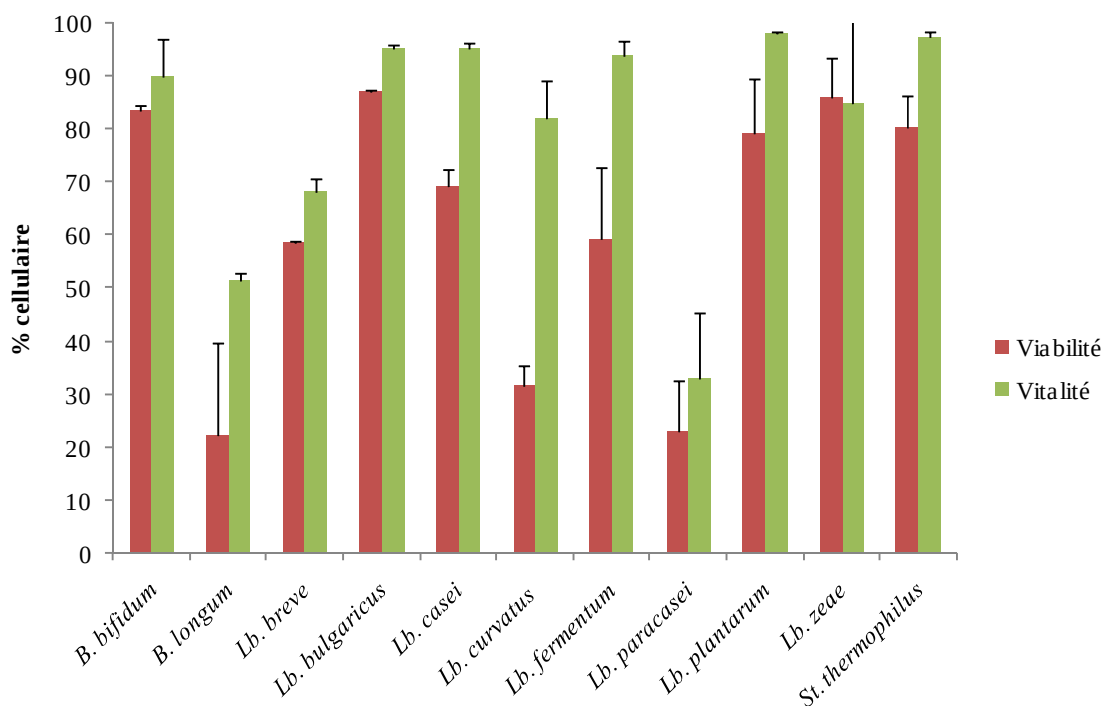


Figure 39 : Effet d'un cycle congélation / décongélation sur la viabilité et la vitalité des souches probiotiques.

Les onze probiotiques testés présentent peu de différences entre eux. La majorité des souches résistent assez bien au procédé de décongélation, avec des taux de survie supérieurs à ceux des souches industrielles. Seules trois souches présentent une très faible survie à ce stress : *B. longum*, *Lb. curvatus* et *Lb. paracasei*. Ce sont également ces souches qui présentent la moins bonne activité enzymatique après le stress. Il est à noter que les souches présentant à la fois la meilleure viabilité et vitalité sont les souches *B. bifidum*, *Lb. bulgaricus* et *Lb. zeae*.

1.1.5. Effet d'un stress oxydant

L'effet de l' H_2O_2 ne permettant pas de discriminer les souches probiotiques entre elles, la ménadione a été employée pour réaliser un stress oxydant. Cette molécule est capable de générer de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Les résultats sont présentés [Figure 40](#).

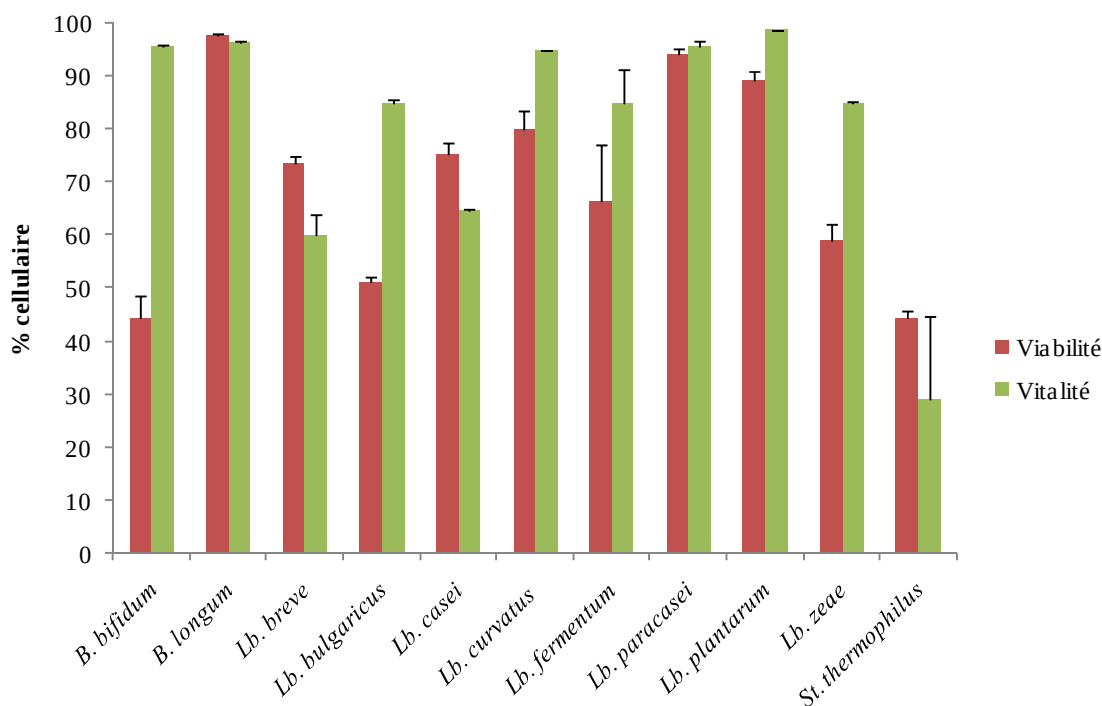


Figure 40 : Effet d'un stress oxydant sur la viabilité / vitalité des souches probiotiques.

Les souches testées présentent une viabilité et une vitalité très différentes au stress oxydant. Ainsi, seules quatre souches résistent très bien : *B. longum*, *Lb. curvatus*, *Lb. paracasei* et *Lb. plantarum*.

De plus, la résistance et la vitalité de ces souches aux procédés de séchage (lyophilisation, séchage en couche mince et séchage aérien) ont également été testées ([Tableau 14](#) & [Tableau 15](#)). Il apparaît que les souches les plus résistantes et présentant une forte activité estérasique sont *Lb. curvatus*, *Lb. paracasei* et *Lb. plantarum*. Il est très intéressant de noter que les souches les plus résistantes aux procédés de séchage et présentant la plus forte activité enzymatique sont également celles retrouvées en tête pour le stress oxydant.

Les résultats obtenus sur l'ensemble des tests de screening procédé et tractus digestif permettent de classer les souches en quatre groupes :

- les souches très résistantes : *Lb. zeae* et *Lb. paracasei*
- Les souches résistantes : *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum* et *B. longum*
- Les souches moyennement résistantes : *Lb. casei*, *Lb. curvatus* et *St. thermophilus*
- Les souches faiblement résistantes : *B. bifidum* et *Lb. bulgaricus*

Tableau 14 : Effet des stress gastro-intestinaux et procédés sur la viabilité des souches probiotiques (% de viabilité). ^{a, b, c, d, e, f, g} : Résultat d'un test de Student-Newman-Keuls (SNK) à 5%. Les valeurs dans une colonne donnée avec une même lettre ne sont pas statistiquement différentes. ND : non déterminé.

Souches	Stress osmotique	Congélation / décongélation	Lyophilisation	Séchage en couche mince	Fluide gastrique	Fluide intestinal	Sels biliaires	Stress oxydant
<i>Lb. plantarum</i>	88,2 ^a	79,3 ^a	36,1 ^b	36,3 ^a	75,9 ^c	74,1 ^{a, b}	82,8 ^b	89,2 ^{a, b, c}
<i>Lb. casei</i>	24,4 ^d	69,3 ^a	3,0 ^d	2,4 ^c	64,5 ^d	37,2 ^c	58,8 ^{c, d, e}	75,2 ^{c, d, e}
<i>Lb. zeae</i>	50,4 ^c	86,0 ^a	3,1 ^d	9,8 ^{b, c}	95,5 ^a	93,4 ^a	93,2 ^a	59,1 ^{e, f}
<i>Lb. bulgaricus</i>	76,3 ^{a, b}	87,1 ^a	2,4 ^d	13,4 ^{b, c}	2,1 ^g	66,2 ^b	ND	51,1 ^f
<i>B. bifidum</i>	54,3 ^c	83,5 ^a	28,8 ^{b, c}	10,0 ^{b, c}	30,3 ^e	40,8 ^c	54,3 ^{d, e}	44,4 ^f
<i>Lb. curvatus</i>	85,5 ^a	31,4 ^b	42,3 ^b	23,1 ^b	9,4 ^f	82,9 ^{a, b}	56,0 ^{d, e}	79,8 ^{b, c, d}
<i>Lb. paracasei</i>	90,6 ^a	23,0 ^b	54,7 ^a	19,6 ^{b, c}	86,2 ^b	91,9 ^a	95,2 ^a	94,1 ^{a, b}
<i>B. longum</i>	47,4 ^c	22,2 ^b	29,0 ^{b, c}	12,4 ^{b, c}	75,5 ^c	75,1 ^{a, b}	96,2 ^a	97,9 ^a
<i>Lb. brevis</i>	55,8 ^c	58,7 ^a	21,6 ^c	4,3 ^{b, c}	86,9 ^b	80,3 ^{a, b}	68,8 ^c	73,5 ^{c, d, e}
<i>Lb. fermentum</i>	62,3 ^{b, c}	59,4 ^a	15,7 ^c	3,7 ^{b, c}	95,3 ^a	88,4 ^{a, b}	50,6 ^e	66,5 ^{d, e}
<i>St. thermophilus</i>	27,0 ^c	80,2 ^a	41,5 ^b	14,8 ^{b, c}	79,4 ^c	72,8 ^{a, b}	63,7 ^{c, d}	44,3 ^f

Tableau 15 : Effet des stress gastro-intestinaux et procédés sur la vitalité des souches probiotiques (% de vitalité). ^{a, b, c, d, e} : Résultat d'un test de Student-Newman-Keuls (SNK) à 5%. Les valeurs dans une colonne donnée avec une même lettre ne sont pas statistiquement différentes. ND : non déterminé.

Souches	Stress osmotique	Congélation / décongélation	Lyophilisation	Séchage en couche mince	Fluide gastrique	Fluide intestinal	Sels biliaires	Stress oxydant
<i>Lb. plantarum</i>	56,4 ^d	98,2 ^a	70,6 ^a	66,1 ^a	35,1 ^b	97,2 ^{a, b}	94,6 ^b	98,8 ^a
<i>Lb. casei</i>	92,8 ^a	95,4 ^a	1,7 ^d	12,6 ^b	25,0 ^b	87,8 ^c	83,1 ^d	64,8 ^{b, c}
<i>Lb. zeae</i>	95,3 ^a	84,8 ^{a, b}	10,9 ^d	14,1 ^b	78,9 ^a	97,6 ^{a, b}	98,4 ^a	85,0 ^{a, b}
<i>Lb. bulgaricus</i>	96,9 ^a	95,1 ^a	4,4 ^d	20,9 ^b	ND	98,0 ^a	90,0 ^c	84,8 ^{a, b}
<i>B. bifidum</i>	99,8 ^a	89,8 ^a	69,1 ^a	79,6 ^a	89,2 ^a	84,5 ^{c, d}	96,6 ^{a, b}	95,5 ^a
<i>Lb. curvatus</i>	77,1 ^c	82,0 ^{a, b}	66,0 ^a	64,5 ^a	4,2 ^c	92,8 ^b	94,8 ^b	94,9 ^a
<i>Lb. paracasei</i>	85,2 ^b	33,0 ^d	49,0 ^b	19,8 ^b	77,6 ^a	80,9 ^d	98,7 ^a	95,6 ^a
<i>B. longum</i>	31,8 ^e	51,5 ^c	30,9 ^c	18,6 ^b	94,0 ^a	82,2 ^d	99,5 ^a	96,5 ^a
<i>Lb. brevis</i>	85,1 ^b	68,2 ^b	16,5 ^d	2,5 ^b	68,1 ^a	56,1 ^e	90,2 ^c	60,1 ^c
<i>Lb. fermentum</i>	96 ^a	93,9 ^a	16,2 ^d	3,7 ^b	42,9 ^b	96,7 ^{a, b}	97,6 ^{a, b}	84,9 ^{a, b}
<i>St. thermophilus</i>	76,9 ^c	97,5 ^a	44,0 ^{b, c}	74,3 ^a	93,3 ^a	93,7 ^{a, b}	91,3 ^c	28,9 ^d

Ce crible permet donc de trouver des souches plus résistantes et présentant une meilleure activité enzymatique après un stress que deux standards industriels testés (*Lb. casei* et *Lb. fermentum*). De plus, la souche de *B. bifidum* décrite dans la littérature comme étant très sensible aux stress ressort bien sur ce screening comme une souche très faiblement résistante.

1.2. Screening du pouvoir antioxydant

Un des axes santé visé dans le projet Probiotique est le pouvoir antioxydant. Les méthodes permettant de mesurer la diminution du stress oxydatif sont nombreuses (Griffiths *et al.*, 2002). Elles peuvent être divisées en trois catégories : (1) la composition (production d'enzymes, d'antioxydants) ; (2) le potentiel (capacité à diminuer l'effet de molécules oxydantes); (3) la susceptibilité à l'oxydation (résistance aux radicaux libres). Le but du screening est de confirmer les résultats obtenus par l'**INRA MICALIS** sur la susceptibilité à l'oxydation des souches probiotiques. L'INRA a en effet testé au préalable la résistance de plus de 150 souches au stress oxydant (H₂O₂) et a sélectionné les 6 meilleures. Ces souches sont *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. plantarum*, *Lb. zeae* et *St. thermophilus*. A ces souches sont également ajoutées la référence industrielle, *Lb. fermentum* ME-3, la référence académique *B. bifidum* et une souche non retenue pour ses propriétés antioxydantes, *Lb. paracasei*. La multiplication des approches *in vitro* par notre laboratoire devrait ainsi permettre de choisir les deux souches au pouvoir antioxydant le plus élevé pour mener par la suite des expériences *in vivo*. De plus, ces différents tests *in vitro* permettront de constituer le dossier EFSA. Ainsi deux tests concernent la composition et trois tests concernent le potentiel des souches.

1.2.1. Dosages biochimiques de l'activité antioxydante des bactéries

Tout d'abord afin de caractériser le pouvoir antioxydant des bactéries probiotiques, des méthodes basées sur la composition ont été mises en place. Ainsi, la présence ou l'absence d'une catalase ainsi que le dosage de la SOD ont été réalisés. Les résultats de la présence de l'activité SOD sont présentés Figure 41.

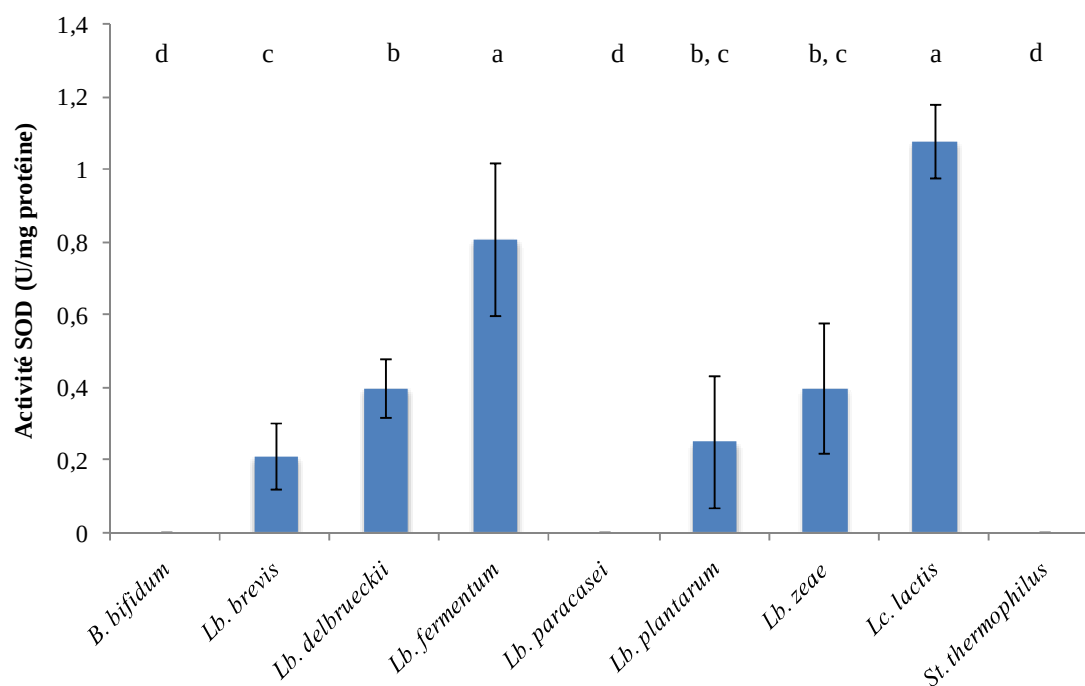


Figure 41 : Activité SOD des souches probiotiques. ^{a,b,c,d} : les colonnes portant des lettres différentes sont significativement différentes (Test SNK avec un risque α de 5%).

Ainsi, deux des souches sélectionnées par l'INRA MICALIS sur un critère de résistance au peroxyde d'hydrogène présentent également une forte activité SOD. Ce sont les souches *Lc. lactis* et *Lb. zeae*. De plus la souche *Lc. lactis* une plus grande activité enzymatique SOD que la souche de référence antioxydante, la souche *Lb. fermentum* ME-3 (résultat non significatif au risque α de 5%). La souche *Lb. paracasei*, non retenue pour ses capacités antioxydantes par l'INRA, ne présente ni activité catalase ni activité SOD.

Des méthodes permettant de caractériser le potentiel des souches probiotiques ont également été mises en place. Tout d'abord, dans la méthode TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), l'activité antioxydante totale de la bactérie probiotique est déduite de sa capacité à inhiber le radical $ABTS^{\circ+}$. Les résultats de ce test sont présentés [Figure 42](#).

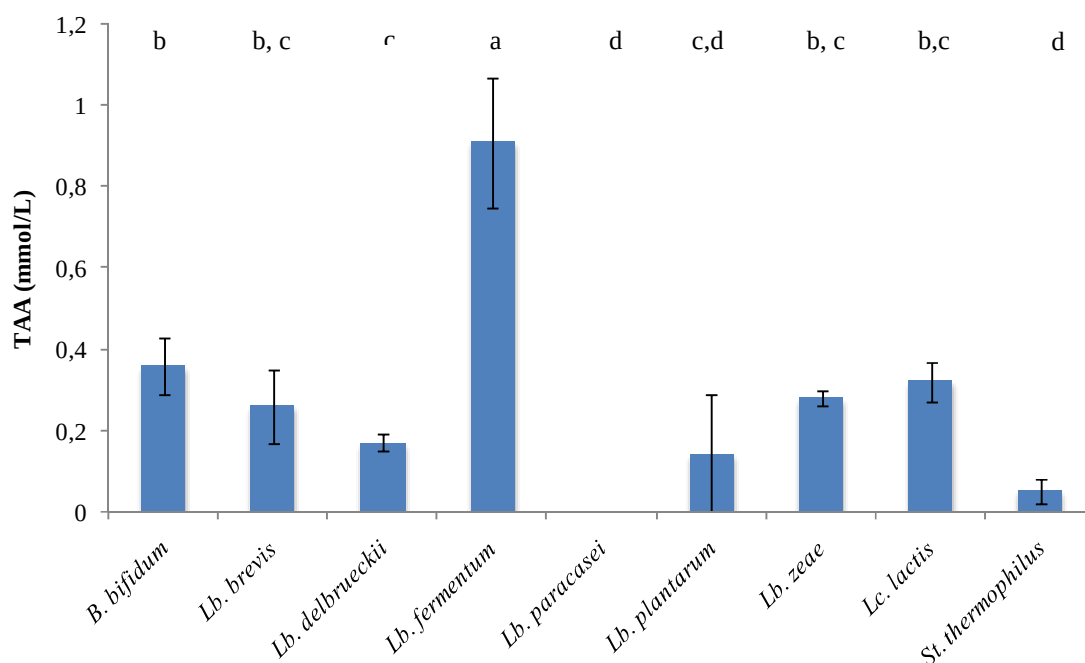


Figure 42 : Pouvoir antioxydant de souches probiotiques mesuré par l'inhibition de l'ABTS. ^{a,b,c,d} : les colonnes portant des lettres différentes sont significativement différentes (Test SNK avec un risque α de 5%).

Les souches *B. bifidum*, *Lb. brevis*, *Lb. zeae* et *Lc. lactis* présentent une capacité à diminuer la formation d'un radical libre. Cette capacité est néanmoins significativement plus faible que celle de la souche de référence, *Lb. fermentum* ME-3. Enfin, comme attendu, la souche *Lb. paracasei* ne présente aucune activité antiradicalaire.

1.2.2. Mesure de l'activité antioxydante des bactéries sur cellules animales ou humaines

Deux autres méthodes permettant de caractériser le potentiel des souches probiotiques ont été mises en place. Ces méthodes ne sont plus uniquement basées sur la quantification de molécules chimiques comme c'était le cas dans le paragraphe précédent, mais utilisent des cellules animales (KRL) ou humaines (tests des comètes). Ainsi, la première méthode mise en place permet de mesurer le potentiel global de défense anti-radicalaire, et la seconde permet de mesurer l'effet antimutagène des souches probiotiques (la mutagénicité étant très fortement corrélée au stress oxydant).

1.2.2.1. Potentiel global de défense antiradicalaire des souches

Ce test permet de caractériser le potentiel de défense anti-radicalaire d'une souche bactérienne. Des cellules sanguines subissent une attaque radicalaire et la mesure de la diminution d'absorbance permet de suivre la disparition progressive des cellules. La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des cellules sanguines. Ainsi, l'effet d'une bactérie antioxydante se traduira par une augmentation de la résistance du sang témoin à une attaque radicalaire. Les résultats du test KRL sont présentés Figure 43. Ces résultats sont exprimés en équivalent trolox.

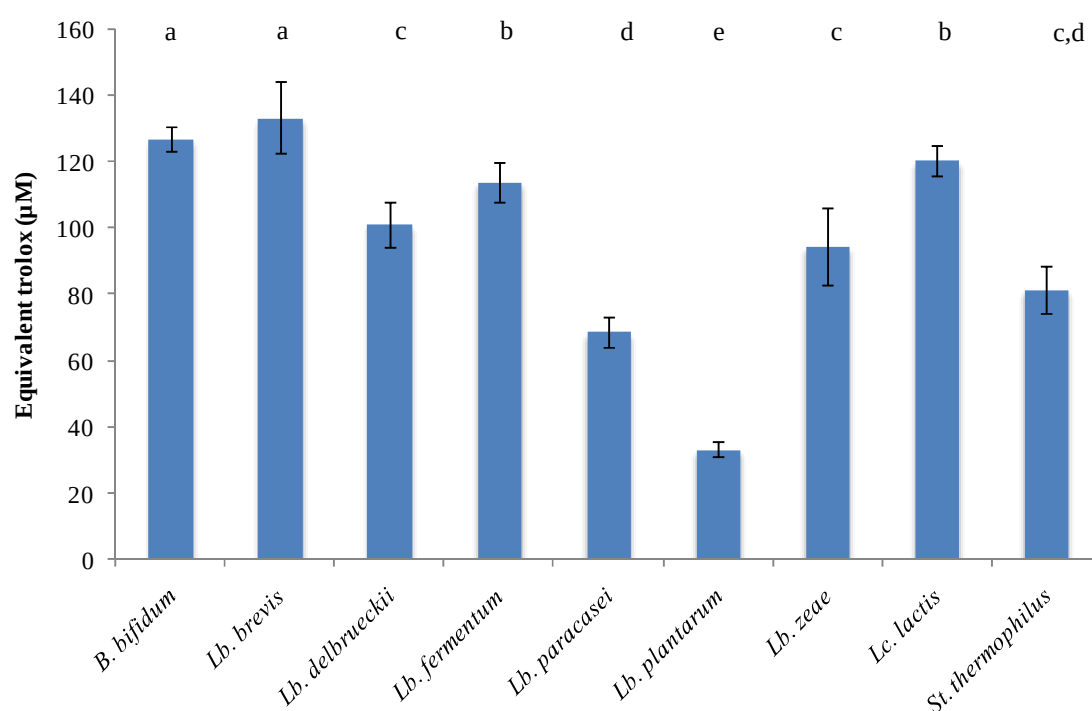


Figure 43 : Pouvoir antioxydant de souches probiotiques mesuré par le test KRL. ^{a,b,c,d,e} : les colonnes portant des lettres différentes sont significativement différentes (Test SNK avec un risque α de 5%).

Le test KRL confirme les précédents résultats, les souches *Lb. brevis*, *Lb. zeae* et *Lc. lactis* semblent posséder des capacités antioxydantes importantes. C'est également le cas de la souche *Lb. delbrueckii*. La souche non sélectionnée par l'INRA, *Lb. paracasei*, présente des faibles taux d'augmentation de la résistance du sang à une attaque radicalaire. *B. bifidum* présente également un fort potentiel de défense radicalaire.

1.2.2.2. Test des comètes

Afin de tester le pouvoir antioxydant des souches sur des cellules humaines, un test des comètes a été mis en place. Ce test bien qu'indirect, puisque les cellules bactériennes ne sont pas en contact direct avec les cellules humaines Caco-2, a l'avantage d'être réalisé sur des lignées de cellules humaines épithéliales. Il permet de décrire l'efficacité des bactéries probiotiques à diminuer la concentration d'une molécule mutagène, le 4NQO. Cette molécule est en outre capable de générer l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Le test des comètes étant difficile à mettre en place, seules les souches les plus intéressantes d'un point de vue du pouvoir antioxydant et de leur état physiologique après les stress ont été testées. Ainsi, les souches *L. zeae* et *L. breve* ont été retenues ainsi que la souche de référence industrielle *L. fermentum* ME-3. La souche *Lc. lactis*, bien que présentant de fortes capacités antioxydantes (supérieures à celle de *L. breve*) n'a pas été retenue pour ce test. En effet, cette souche étant un lactocoque, elle semble moins propice à une utilisation de type yaourt. La souche académique *B. bifidum* a également été conservée pour le test des comètes. Cette souche, bien que présentant une faible viabilité/vitalités aux stress étudiés, présente une bonne fonctionnalité. Les résultats de ce test sont ainsi présentés [Figure 44](#).

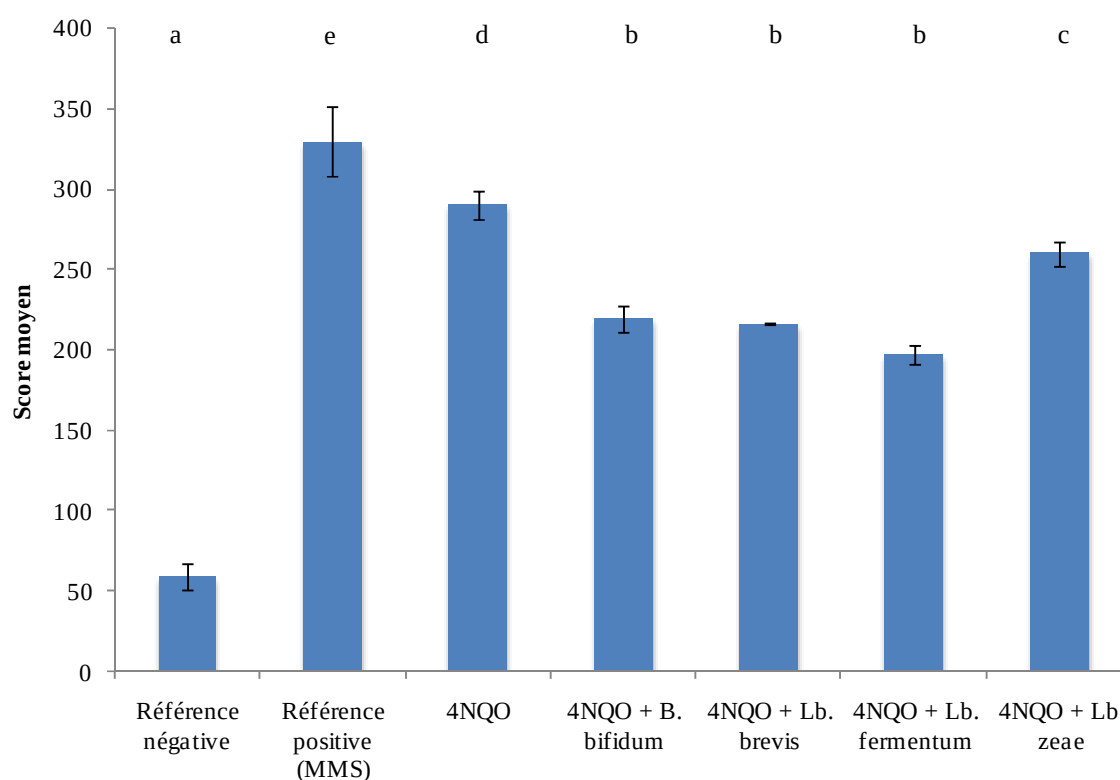


Figure 44 : Score moyen des classes (pour cent cellules). ^{a,b,c,d,e} : les colonnes portant des lettres différentes sont significativement différentes (Test SNK avec un risque α de 5%).

Deux références ont été utilisées pour s'assurer que le test des comètes sur cellules Caco-2 est bien fonctionnel. La référence négative correspond aux cellules non traitées et la référence positive aux cellules traitées avec du MMS (méthanesulfonate de méthyle, agent alkylant et cancérigène). Le MMS est connu pour assurer des dégâts au niveau de l'ADN, ce qui doit se traduire au niveau du test des comètes par un score très élevé. Ainsi, la référence négative présente un score de classe très faible (score des classes de 50) et la référence positive un score très élevé (score des classes de 329), ce qui est conforme avec la littérature (Azqueta *et al.*, 2005). Parmi les quatre bactéries testées, seule trois permettent de diminuer de façon significative l'effet mutagène du 4NQO. Ainsi la souche *B. bifidum* permet de diminuer de 25% l'effet mutagène, LBR01 de 26% et ME3 de 32% (les scores des classes correspondants étant de 219, 216 et 197). Les souches ne sont pas significativement différentes entre elles au risque α de 5%.

De plus, la répartition des différentes classes du score est présentée [Figure 45](#).

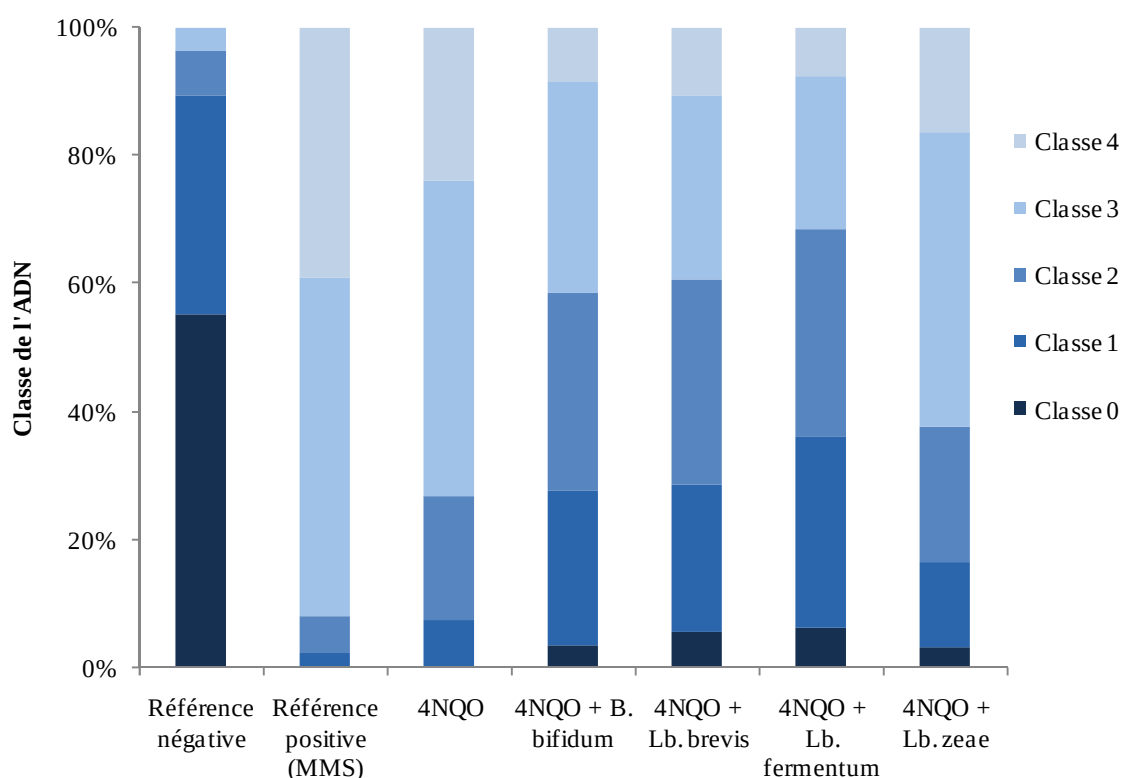


Figure 45 : Répartition des classes.

La référence négative est essentiellement constituée de classe 0 (cellules intactes) et de classe 1 (cellules très peu endommagées). Elle ne présente aucune cellule en apoptose (classe 4)

contrairement à la référence positive. Cette dernière comporte majoritairement des cellules de classe 3 (cellules très endommagées) et de classe 4. L'effet du 4NQO est moindre par rapport au MMS puisque le nombre de classe 4 est inférieur et un plus grand nombre de classe 2 y est visible. Ceci traduit un effet plus mutagène que génotoxique de cette molécule, contrairement au MMS. Au niveau de l'action des bactéries, *B. bifidum*, LBR01 et ME3 augmentent significativement le taux de classe 0, 1 et 2 et diminuent les classes 3 et 4 de façon significative également.

➔ A la vue des différents résultats, les souches *Lb. zae* et *Lb. brevis* semblent posséder de fortes capacités antioxydantes, avoisinant celle de la souche de référence, *Lb. fermentum* ME-3. Ces deux souches présentent également une très forte viabilité et vitalité par rapport aux stress du tractus gastro-intestinaux et à la congélation. La souche *Lb. zae* présente cependant une résistance et une activité enzymatique accrue par rapport à la souche *Lb. brevis* mais également par rapport aux souches industrielles de références, *Lb. casei* et *Lb. fermentum*. Ces deux souches (*Lb. brevis* et *Lb. zae*), ainsi que la souche industrielle *Lb. fermentum* ME-3, seront ainsi utilisées pour les essais menés *in vivo* par l'INRA MICALIS. La souche *B. bifidum* a également été sélectionnée comme modèle d'étude académique. En effet, cette souche présente un fort potentiel antioxydant, mais peu de systèmes actifs comme la SOD ou la catalase. Son pouvoir antioxydant doit alors provenir de systèmes de défenses non enzymatiques. Il serait donc possible de moduler ses propriétés fonctionnelles. Cependant, cette souche présentant une faible résistance aux différents stress étudiés, une technique de préservation devra être mise en place afin de l'utiliser comme probiotique dans un produit laitier fermenté.

2. Effet du Potentiel Redox sur la Viabilité de *B. bifidum* dans un Produit Laitier Fermenté

Objectif de l'étude : Cette étude a pour but d'optimiser l'intégration de *B. bifidum* dans un produit laitier fermenté par l'utilisation des gaz. Au préalable de son intégration, les cinétiques d'acidification et de réduction de cette souche ont été caractérisées. Aucune donnée dans la littérature ne renseigne sur la capacité réductrice (c'est-à-dire la capacité à abaisser le potentiel d'oxydoréduction du milieu, donc à moduler le E_{h7}) des bifidobactéries, ni sur la dynamique de l'évolution du taux d'oxygène dissous dans le milieu. Dans un second temps, l'impact de l'intégration de *B. bifidum* dans un produit laitier fermenté a été analysé. Enfin, afin d'optimiser son intégration dans un environnement hostile, l'effet de trois E_h différents a été étudié: + 440 mV (lait contrôle non bullé), + 350 mV (lait bullé sous Azote) et -300 mV (lait bullé sous Azote - Hydrogène). Au cours de l'étape d'acidification, le pH et le E_h ont été suivis. Une caractérisation de la viabilité des souches dans les trois conditions de fermentation a également été réalisée avant et après la gélification mais aussi au cours du stockage jusqu'à 28 jours. La caractérisation de la survie de *B. bifidum* après un stress oxydant et des stress représentatifs du tractus gastro-intestinal a été enfin réalisée en milieu modèle (MRS) en fonction des conditions redox de culture.

2.1. Paramètres cinétiques de *B. bifidum* et impact de son intégration dans un produit laitier fermenté

2.1.1. Paramètres cinétiques de *B. bifidum*

2.1.1.1. Croissance de *B. bifidum* en aérobiose et anaérobiose

Les expériences étant menées à la fois en aérobiose (Contrôle) et en anaérobiose (Azote et Azote – Hydrogène), il est tout d'abord important de s'assurer que la croissance de la souche n'est pas impactée par ces paramètres. Ainsi, la croissance de *B. bifidum* a été suivie en aérobiose ainsi qu'en anaérobiose et est présentée [Figure 46](#).

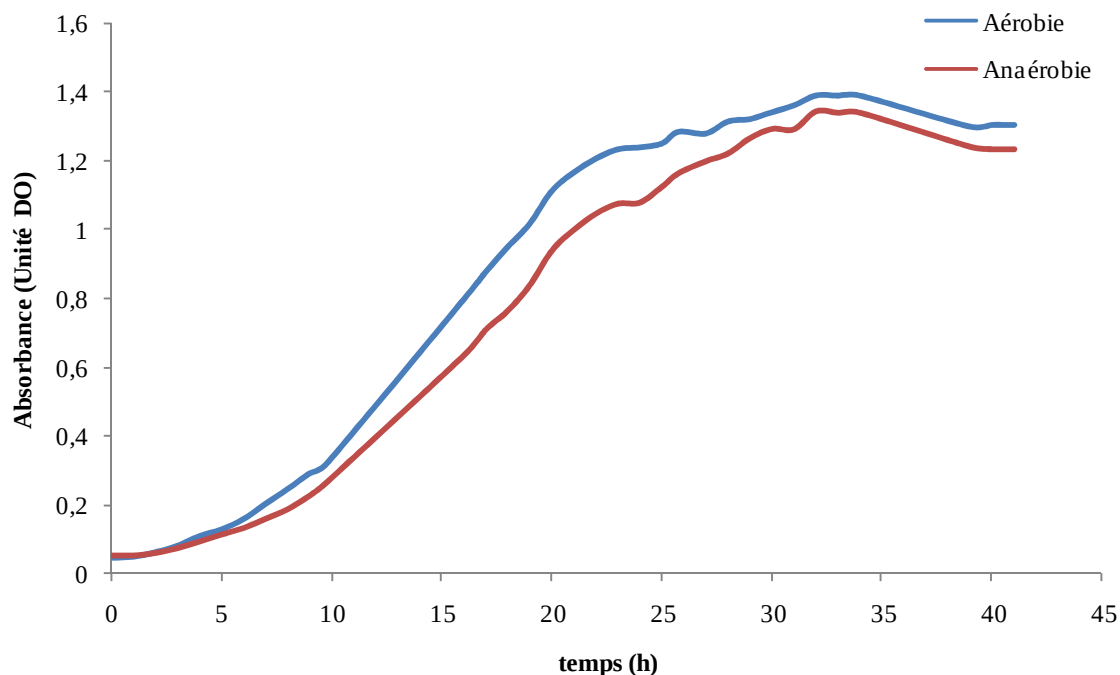


Figure 46 : Evolution de la densité optique (DO) à 600 nm de *B. bifidum* en conditions aérobie et anaérobie.

Tout d'abord, pendant les cinq premières heures, la croissance de *B. bifidum* est faible mais similaire entre les deux conditions de culture. Puis une phase de croissance active est observée et jusqu'à la fin de la mesure, une légère différence est constatée entre les deux conditions de culture (différence non significative au risque α de 5%). En effet, sous Azote, la croissance de la souche est légèrement plus faible que pour le Contrôle avec une différence moyenne de 0,1 unité DO. Le maximum de croissance est atteint au bout de 30 h avec des valeurs de 1.2 et 1.3 unités DO respectivement pour la souche Contrôle et celle ayant poussé sous Azote (différence là encore non significative au risque α de 5%).

2.1.1.2. Evolution du E_{h7} et du pH de *B. bifidum* en fonction des conditions redox

La capacité réductrice de *B. bifidum*, c'est à dire son aptitude à diminuer le E_{h7} du milieu au cours de la fermentation, en fonction des différentes conditions de cultures est présentée Figure 47.

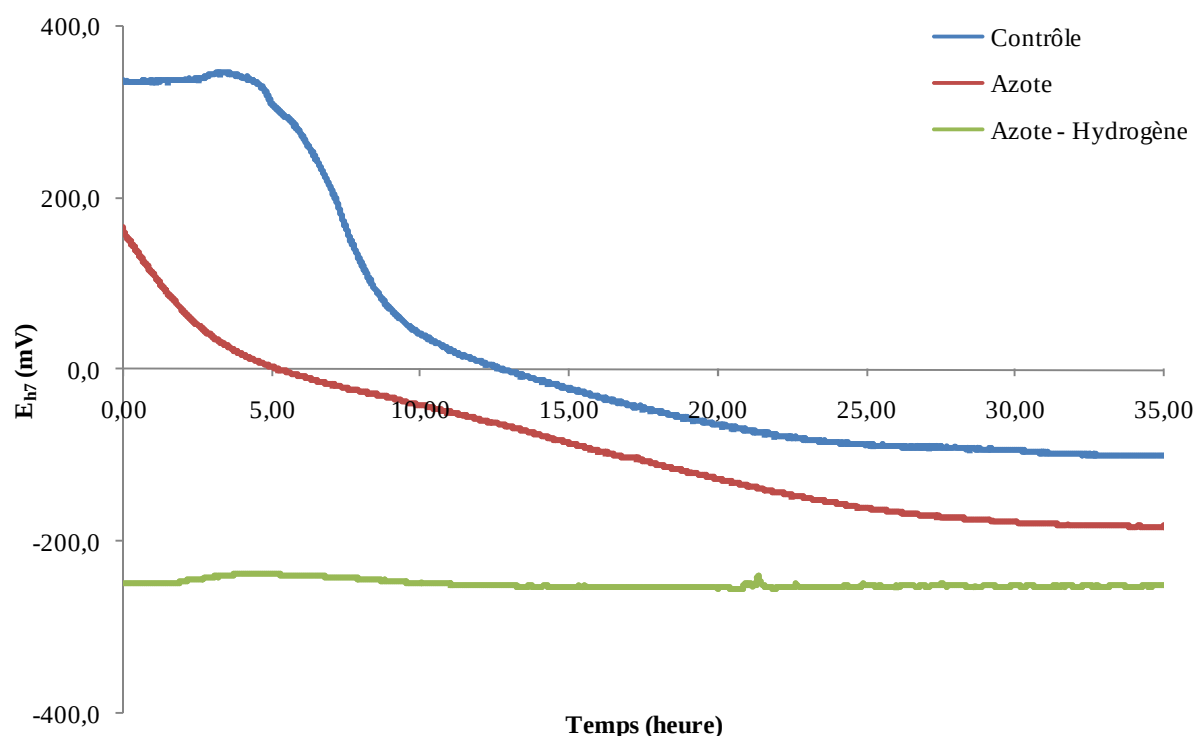


Figure 47 : Evolution du E_{h7} durant une culture de *B. bifidum*. Culture : Contrôle (Bleu), sous Azote (Rouge) et sous Azote – Hydrogène (Vert).

La valeur du potentiel redox (E_h) étant fortement influencée par celle du pH, l'équation de Leistner et Mirna permet de ramener le E_h d'un milieu à pH x à sa valeur à pH 7 ; on parle alors de E_{h7} . Le E_{h7} initial est respectivement de +330 mV et +170 mV pour les conditions Contrôle et sous Azote. Cette différence d'environ 150 mV est due à l'absence de l'oxygène dans le milieu pour la seconde condition. Pour la condition Azote, le E_{h7} diminue progressivement au cours de la fermentation, et devient relativement stable vers 25 h de culture (-165 mV à 25 h, -180 mV à 35 h de culture). Pour la condition Contrôle, le E_{h7} ne diminue qu'après 5 h de culture. On constate même une légère augmentation de ce dernier entre 4 et 5 heures de culture. Puis après ce palier de 5 h, le E_{h7} diminue progressivement au cours de la fermentation pour atteindre une valeur relativement stable vers 25 h de culture (-87 mV à 25 h, -101 mV à 35 h de culture). Concernant la condition sous Azote – Hydrogène, le E_{h7} initial est de -250 mV et ne varie pas au cours de la mesure. Ainsi, si *B. bifidum* est placé dans un environnement plus réduit que son maximum de réduction (-181 mV sous Azote), elle ne semble pas être capable de le réduire davantage. *B. bifidum* possède donc de bonnes capacités réductrices. En effet, si on compare nos résultats avec les résultats de la littérature (Cachon *et al.*, 2002 ; Brasca *et al.*, 2007), les capacités réductrice de cette souche (E_h final de -70 mV en condition aérobie) sont supérieures à celles de *St. thermophilus* (E_h final de 10

mV) ou de celles de *Lb. bulgaricus* (E_h final de 55 mV), mais inférieurs à celle de *Lc. lactis* (E_h final de -160 mV).

Même si une légère différence est observée entre le Contrôle et les conditions redox modifiées, les courbes d'acidification (Figure 48), ne sont pas significativement différentes en fonction des conditions de culture, avec une valeur de pH final de 5,6 atteinte après 35 heures de culture pour la condition Contrôle et de 5.7 pour les conditions Azote et Azote – Hydrogène.

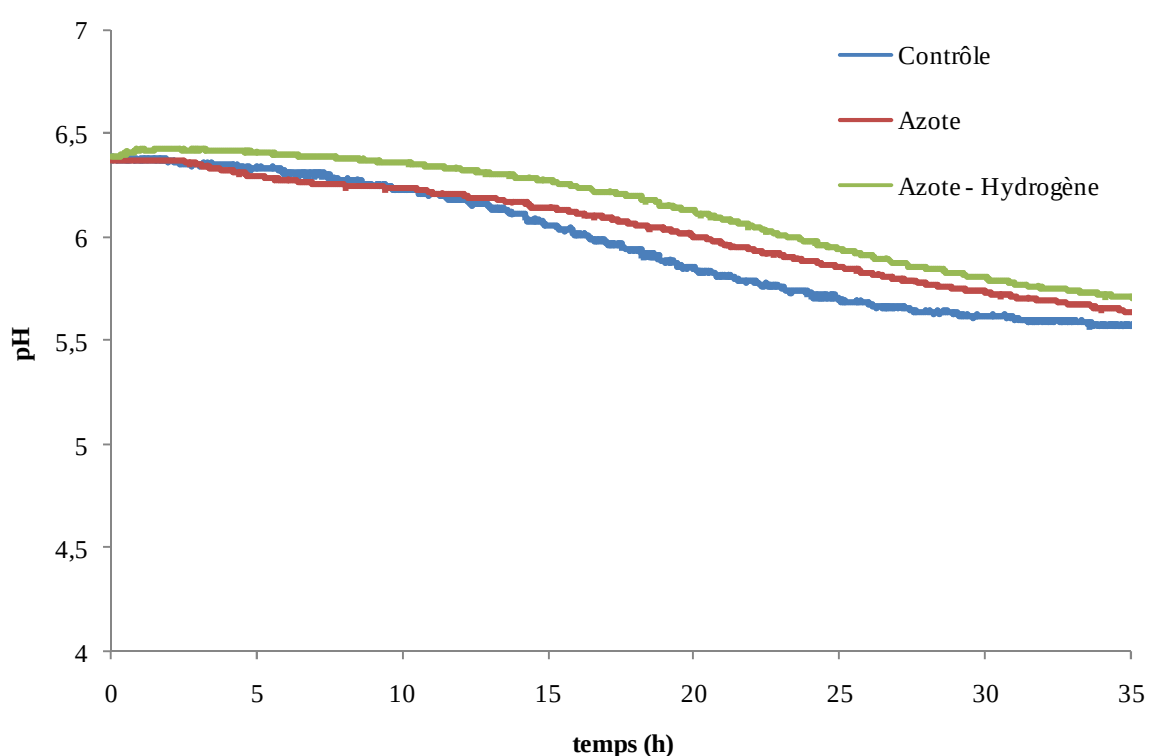


Figure 48 : Evolution du pH durant une culture de *B. bifidum*. Culture : Contrôle (Bleu), sous Azote (Rouge) et sous Azote - Hydrogène (Vert).

La modification des conditions redox de culture n'a donc pas d'impact sur la cinétique d'acidification du milieu de culture et donc sur la croissance de la souche. Ceci confirme les données obtenues par mesure de la densité optique.

2.1.1.3. Evolution de la teneur en oxygène dissous dans le milieu de culture

B. bifidum étant capable de diminuer le potentiel d'oxydoréduction vers des valeurs très réductrices, elle doit donc être capable d'interagir avec l'oxygène du milieu. Ainsi, la consommation de l'oxygène en condition Contrôle par *B. bifidum* est présentée [Figure 49](#).

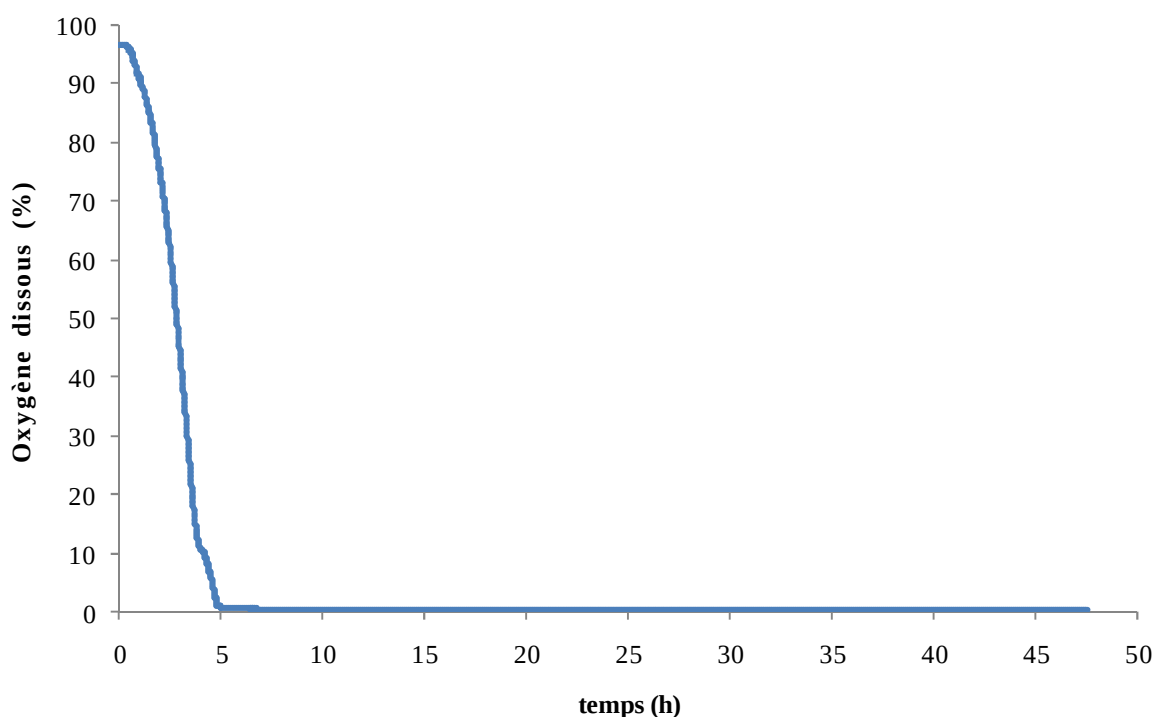


Figure 49 : Suivi de la teneur en oxygène dissous dans le milieu de culture de *B. bifidum*.

La teneur en oxygène dissous du milieu diminue très rapidement durant les premières étapes de culture. Après 5 h de culture, le taux d'oxygène dans le milieu devient nul. Cela correspond également au début de la diminution du E_{h7} pour la condition Contrôle.

2.1.2. Intégration de *B. bifidum* dans un produit laitier fermenté

La cinétique d'acidification des bactéries du yaourt avec ou sans la souche probiotique est présentée [Figure 50](#).

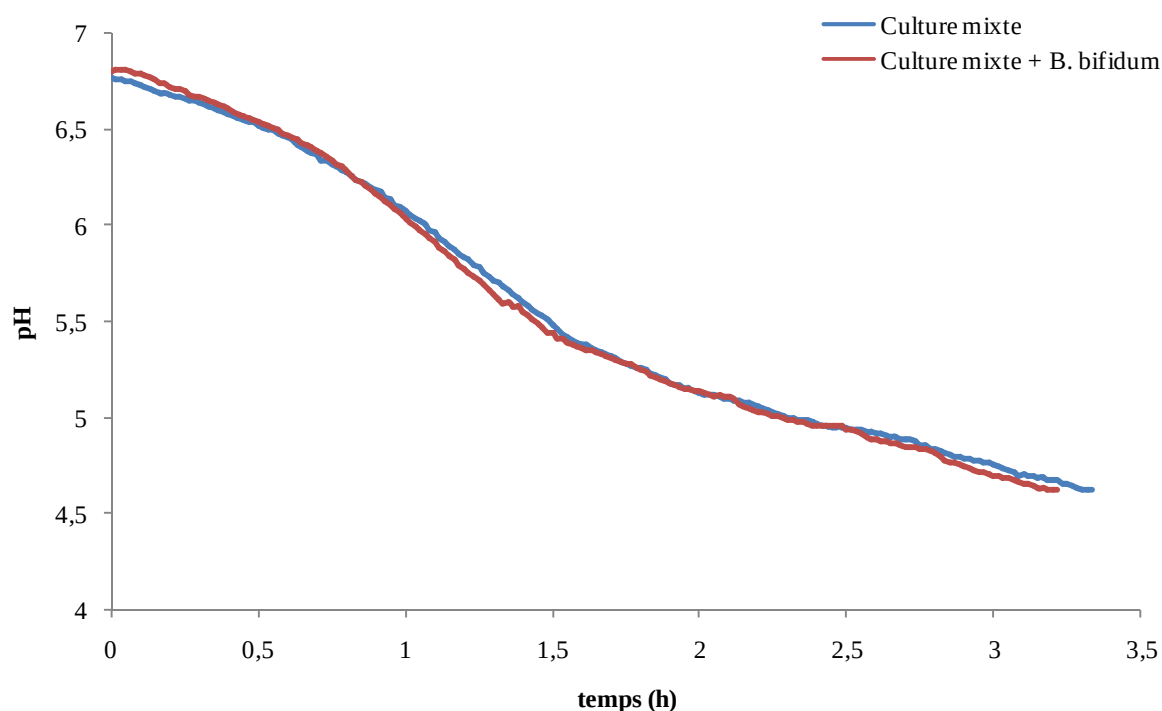


Figure 50 : Evolution du pH pendant l'acidification du lait par les bactéries lactiques avec ou sans la souche de *B. bifidum*

Avec les bactéries du yaourt seules, le temps de gélification, c'est-à-dire le temps pour atteindre une valeur de pH cible de 4,7 où la fermentation est arrêtée, est de 3,14 h (Tableau 16). Avec la souche de *B. bifidum*, la valeur obtenue n'est pas statistiquement différente (3,20 h). De même, la vitesse maximale d'acidification (V_m^a) ainsi que le temps correspondant (T_m^a) ne sont pas statistiquement différents avec l'ajout de la souche probiotique dans le lait avant fermentation. Enfin, les cinétiques de réduction ont été suivies pour la culture mixte avec ou sans le probiotique (Figure 51).

Là encore, l'incorporation de la souche probiotique ne semble pas influencer sur la cinétique de réduction des souches du yaourt. La valeur de E_{h7} obtenue au moment de la gélification est sensiblement identique (Tableau 16). La diminution du E_{h7} peut s'expliquer par l'utilisation par les bactéries lactiques lors de leur croissance de composés oxydés et par la production de composés réducteurs (Jacob, 1970; Martin *et al.*, 2010). Ces résultats sont en accord avec l'évolution de la cinétique du E_{h7} de laits fermentés par la culture mixte sans la souche probiotique (Martin *et al.*, 2010).

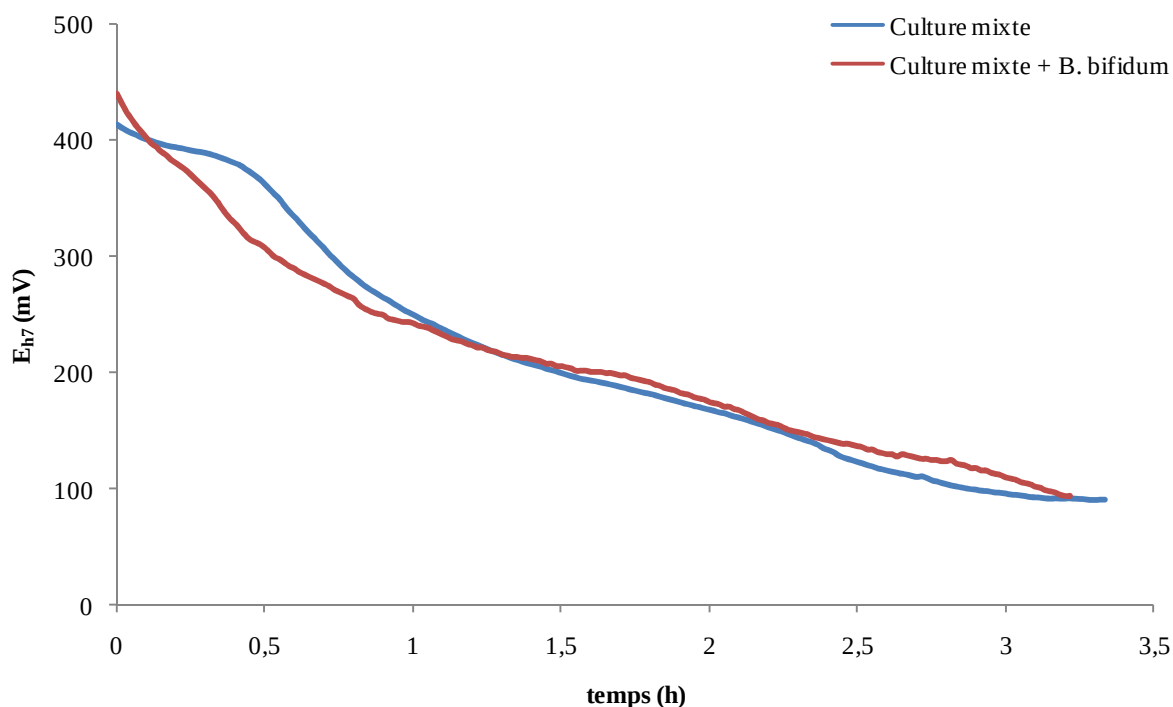


Figure 51 : Evolution du E_{H7} pendant l'acidification du lait par les bactéries lactiques avec ou sans la souche de *B. bifidum*

Tableau 16 : Evolution des paramètres cinétiques

	T_{gel} (h)	V_m^a (U pH.h ⁻¹)	T_m^a (h)	E_{H7} final (mV)
Culture mixte	3,14 (0.05) ^a	-1,35 (0.10) ^b	1,27 (0,07) ^c	94 (24) ^d
Culture mixte + <i>B. bifidum</i>	3,20 (0,03) ^a	-1,25 (0.06) ^b	1,43 (0,11) ^c	91 (3) ^d

^{a, b, c, d} : les valeurs portant une même lettre dans une même colonne ne sont pas significativement différentes (test de Student au risque α de 5%)

Culture mixte : *St. thermophilus* + *Lb. bulgaricus*

Même si la souche de *B. bifidum* présente une activité réductrice plus importante que les deux souches du yaourt, son incorporation dans le lait avant la fermentation n'influe ni sur les paramètres d'acidification ni sur les paramètres de réduction. Elle ne semble donc pas capable de se développer pendant la gélification du lait. Ceci peut s'expliquer par le fait que la fermentation se déroule à 45 °C (la température optimale de *B. bifidum* étant de 37 °C) et que le temps de fermentation est très court (<4 h).

2.2. Impact des gaz sur la survie de *B. bifidum*

2.2.1. Evolution du E_{h7}

Après conditionnement gazeux ($t=0$), les différents laits ont respectivement un E_{h7} de +440 mV, +350 mV et -300 mV respectivement pour le lait Contrôle, le lait bullé sous Azote et le lait bullé sous Azote – Hydrogène (Figure 52).

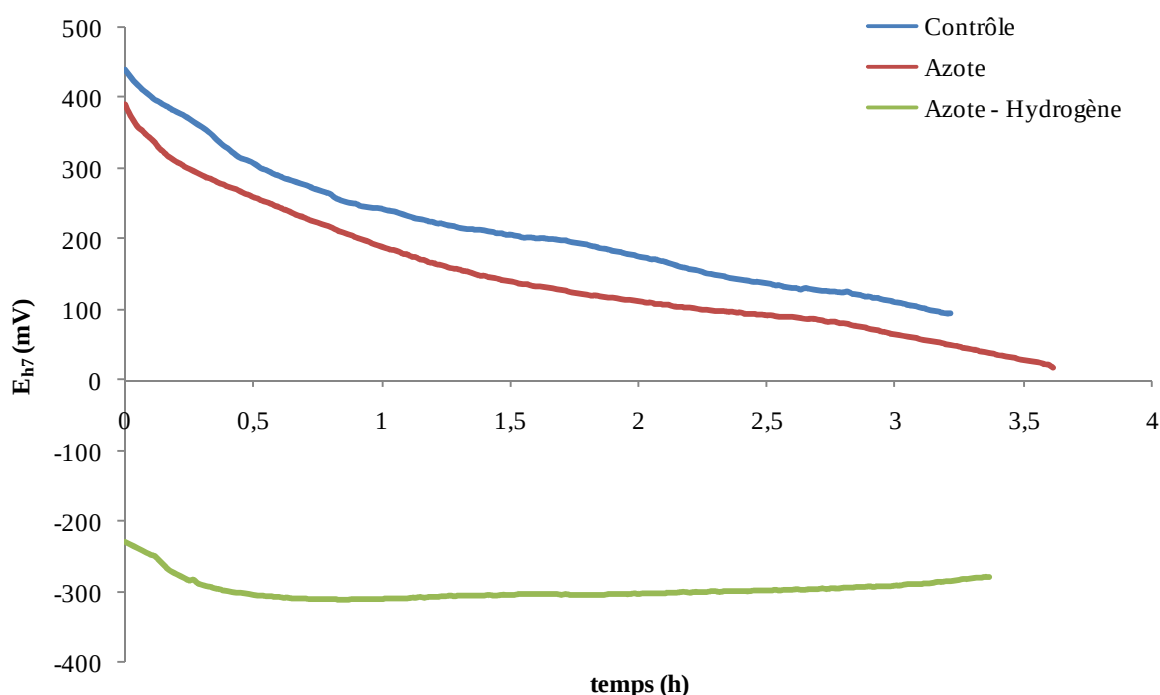


Figure 52 : Evolution du E_{h7} pendant l'acidification du lait par les bactéries lactiques et *B. bifidum* sous différentes conditions redox.

Le E_{h7} diminue pendant la fermentation du lait pour les deux premières conditions gazeuses (Contrôle et Azote) pour atteindre des valeurs de +100 mV et +20 mV respectivement. Pour la troisième condition (Azote – Hydrogène), le E_{h7} est stable pendant la fabrication du lait fermenté (-280 mV).

Les valeurs de potentiel redox ont également été mesurées à la DLC à l'aide d'une microélectrode isolée dans une cage de Faraday (Tableau 17).

Tableau 17 : Suivi du pH et du E_{h7} après fermentation (J_0) et après 28 jours de stockage (J_{28})

n=2	pH J_0	pH J_{28}	E_{h7} J_0 (mV)	E_{h7} J_{28} (mV)
Contrôle	4,7 ^a	4,7 ^a	+100 ^a	+215 ^a
Azote	4,7 ^a	4,8 ^a	+20 ^b	+178 ^b
Azote / Hydrogène	4,7 ^a	4,5 ^a	-280 ^c	-120 ^c

^a, ^b, ^c : les valeurs portant des lettres différentes dans une même colonne sont significativement différentes (test SNK au risque α de 5%)

Les valeurs de potentiel redox sont remontées dans les trois conditions testées, mais l'écart entre elles reste sensiblement identique.

2.2.2. Evolution du pH

Les profils d'acidification des laits fermentés sont présentés [Figure 53](#). Après l'addition des bactéries lactiques, le pH varie lentement pendant presque 1 heure, ce qui est en accord avec la littérature (Amice-Quemeneur *et al.*, 1995). Puis le pH diminue régulièrement jusqu'à atteindre la valeur de pH 4,7, valeur à laquelle les laits fermentés sont placés à 4 °C afin de bloquer le plus rapidement possible les activités métaboliques et enzymatiques et de limiter la post-acidification.

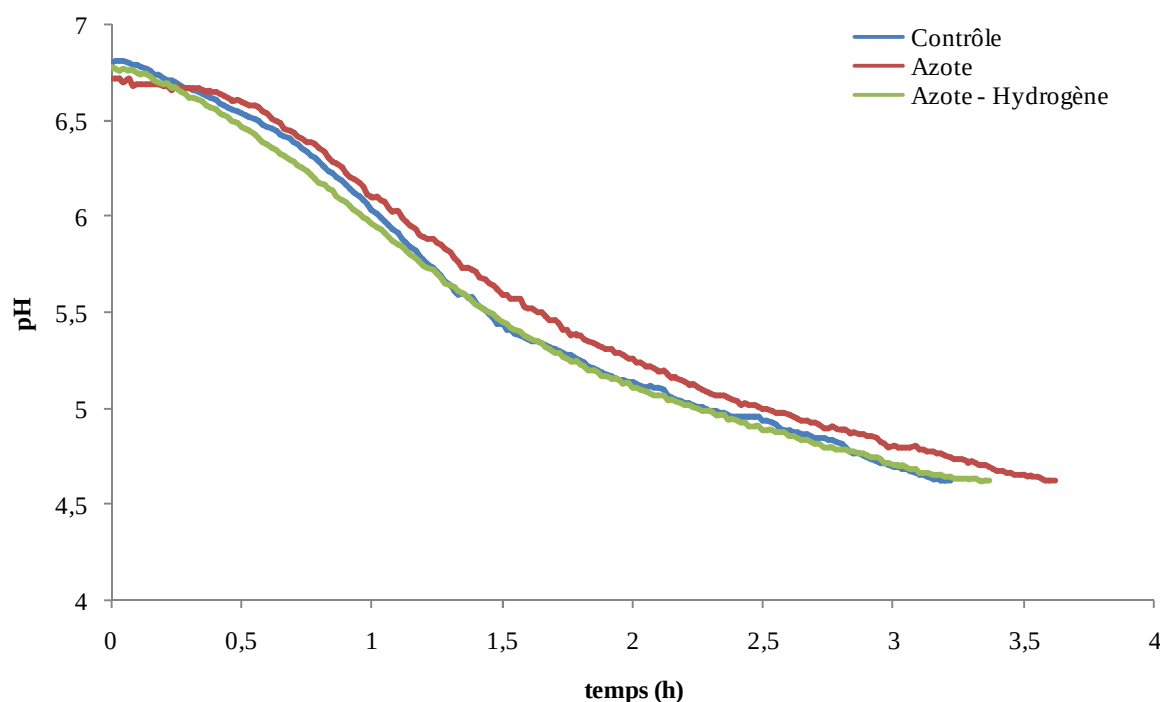


Figure 53 : Evolution du pH pendant l'acidification du lait par les bactéries lactiques et *B. bifidum* sous différentes conditions redox

Les profils d'acidification sont sensiblement identiques quelque soit le conditionnement gazeux utilisé et le pH final est atteint après environ 3,2 h (T_{gel} ou temps nécessaire pour atteindre pH 4,7). De plus, l'évolution de la vitesse d'acidification des laits fermentés sous différentes conditions gazeuses a également été évaluée (Tableau 18).

Tableau 18 : Evolution de la vitesse d'acidification des laits fermentés sous différentes conditions gazeuses.

Gaz	T_{gel} (h)	V_m^a (U pH.h ⁻¹)	T_m^a (h)
Contrôle	$3,14 \pm 0,05^a$	$-1,35 \pm 0,10^b$	$1,27 \pm 0,07^c$
Azote	$3,33 \pm 0,28^a$	$-1,16 \pm 0,08^b$	$1,17 \pm 0,03^c$
Azote / Hydrogène	$3,22 \pm 0,12^a$	$-1,17 \pm 0,00^b$	$1,32 \pm 0,13^c$

^{a, b, c, d} : les valeurs portant une même lettre dans une même colonne ne sont pas significativement différentes (test SNK au risque α de 5%)

Ainsi, la vitesse maximum d'acidification ($V_m^a = \delta pH / \delta t \text{ max}$) et le temps correspondant à V_m^a (T_m^a) ne sont pas affectés par l'utilisation de gaz.

2.2.3. Survie des bactéries lactiques dans les laits fermentés

La population de *St. thermophilus*, *Lb. bulgaricus* et *B. bifidum* est estimée avant fabrication du lait fermenté sous différentes conditions gazeuses (c'est-à-dire au moment de l'ensemencement), après fabrication et leur survie est suivie pendant le stockage (à un jour (J+1), 14 jours (J+14) et à DLC (J+28)). Les résultats sont représentés respectivement [Figure 54](#), [Figure 55](#) et [Figure 56](#). Ces derniers montrent tout d'abord que la croissance des deux ferments lactiques est importante pendant la phase de fermentation du lait (environ 2 log) et que la croissance de *B. bifidum* est quant à elle nulle, et ceci indépendamment du conditionnement gazeux ; la durée de fermentation étant trop courte pour que la souche probiotique puisse se développer et développer une activité fermentaire. De plus, pendant le stockage, la viabilité des trois espèces diminue quelque soit le conditionnement utilisé. Cependant, la résistance des ferments du yaourt est plus importante que celle de la souche probiotique.

La viabilité de la souche *St. thermophilus* n'est pas affectée par le conditionnement gazeux des laits ([Figure 54](#)).

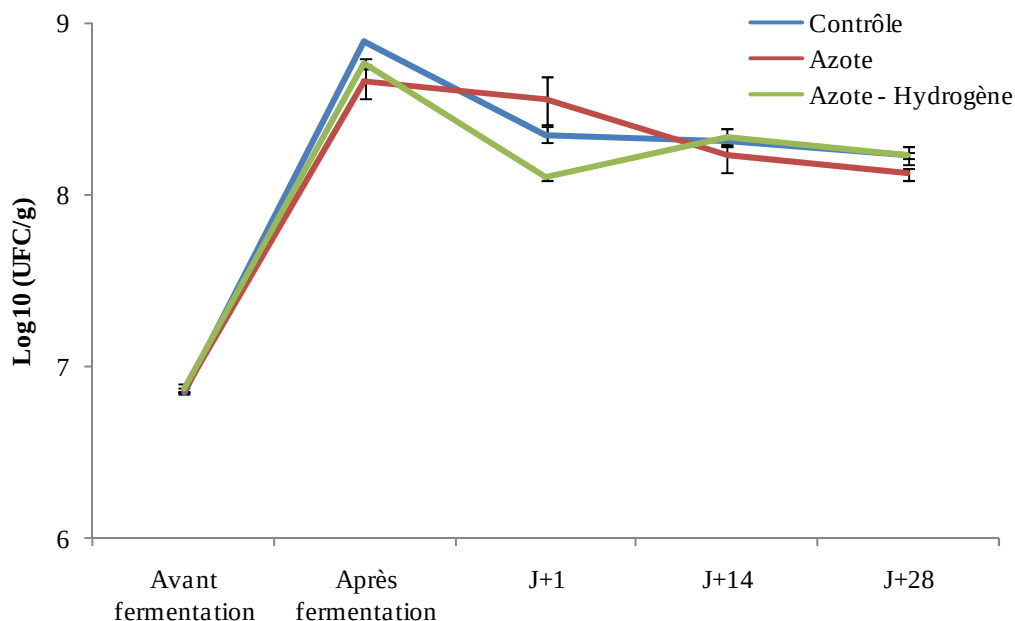


Figure 54 : Evolution de la viabilité de *St. thermophilus* lors de la fabrication et du stockage de laits fermentés sous différentes conditions redox

En effet, pour le lait Contrôle, sous Azote ou sous Azote – Hydrogène, il y a la même croissance pendant la phase de fermentation (1,9 log) et la même perte pendant le stockage (0,6 log).

La viabilité de la souche *Lb. bulgaricus* n'est, elle non plus, pas affectée par le conditionnement gazeux des laits (Figure 55).

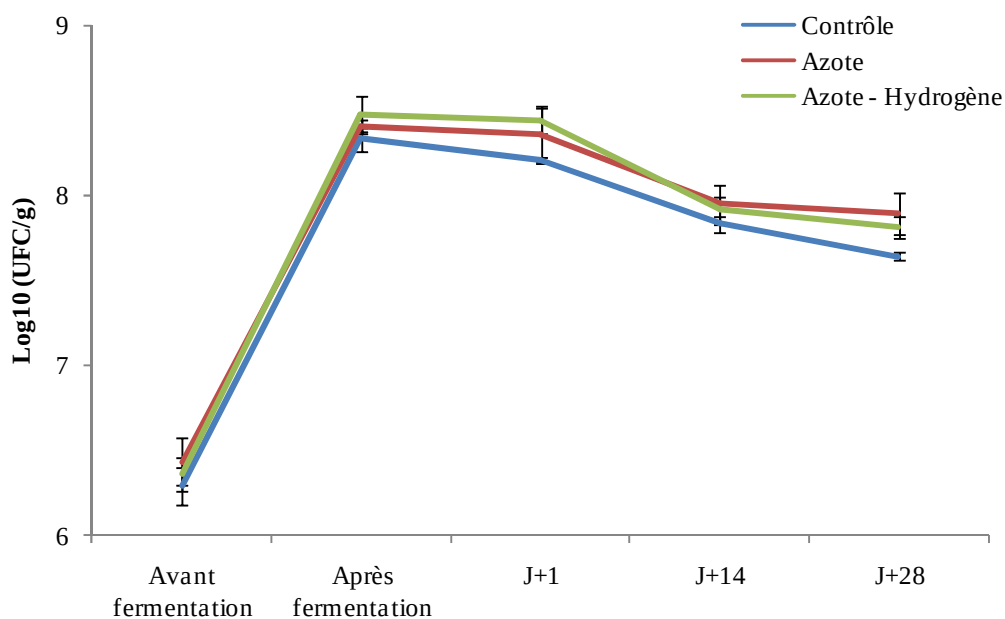


Figure 55 : Evolution de la viabilité de *Lb. bulgaricus* lors de la fabrication et du stockage de laits fermentés sous différentes conditions redox

En effet, pour le lait Contrôle, sous Azote ou sous Azote / Hydrogène, il y a la même croissance pendant la phase de fermentation (2 log) et la même perte pendant le stockage (0,6 log). Ces résultats sont conformes à la littérature puisque ces deux souches sont anaérobies facultatives.

La viabilité de la souche probiotique *B. bifidum*, bien que n'étant pas affectée par le conditionnement gazeux pendant sa phase de croissance, l'est pendant le stockage (Figure 56).

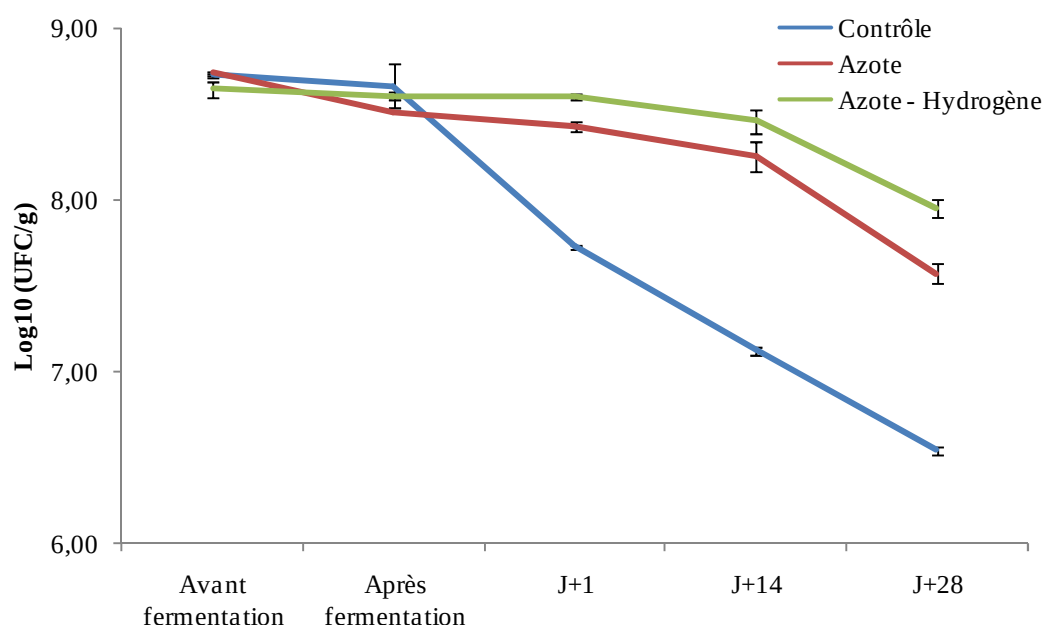


Figure 56 : Evolution de la viabilité de *B. bifidum* lors de la fabrication et du stockage de laits fermentés sous différentes conditions redox

En effet, dans le lait Contrôle, la souche perd au cours du stockage de 28 jours 2,12 log contrairement à un conditionnement sous Azote qui n'entraîne qu'une perte de 0,94 log. Le conditionnement sous Azote / Hydrogène permet également une meilleure viabilité lors du stockage puisque la perte de viabilité à J+28 n'est que de 0,66 log. Ces résultats sont en accords avec la littérature quant à l'intérêt de modifier le potentiel redox (Bolduc *et al.*, 2006b).

2.2.4. Effet du conditionnement redox sur la résistance de *B. bifidum* aux stress

2.2.4.1. Résistance au stress oxydant

La croissance des cellules issues des trois conditions de culture redox est analysée avec ou sans ajout d' H_2O_2 et les résultats sont présentés [Figure 57](#).

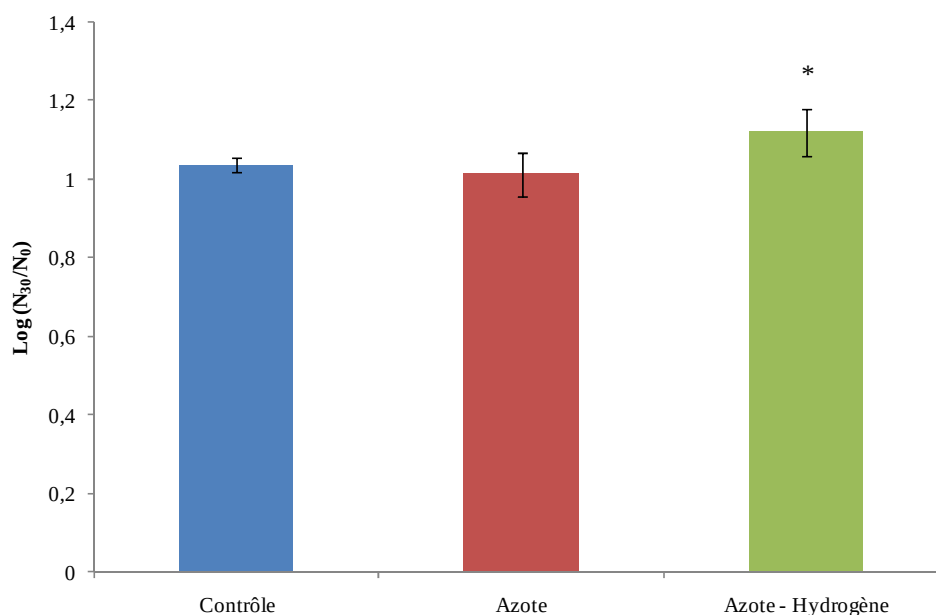


Figure 57 : Mesure de la croissance de *B. bifidum* en fonction des conditions de culture après un stress oxydant de 0,1 de H_2O_2 . Culture : Contrôle, sous Azote et sous Azote - Hydrogène. * : Groupe significativement différent au risque α de 5% (Test Anova).

Pour un stress oxydant de 0,1 mM, le rapport entre la concentration cellulaire à 30 h et la concentration au temps 0 est plus élevé pour les cultures effectuées sous Azote - Hydrogène ($p < 0,05$). A cette concentration, les bactéries initialement cultivées en conditions réductrices forment plus de biomasse et se développent donc davantage par rapport aux bactéries issues des deux autres cultures. D'après ces résultats, à de faibles concentrations en oxydant la croissance de *B. bifidum* est moins affectée lorsque la culture est réalisée dans des conditions réductrices.

2.2.4.2. Résistance aux stress du tractus gastro-intestinal

La résistance de *B. bifidum* aux sels biliaries ainsi qu'à un stress représentatif du côlon (cf. chapitre 1.1 des résultats) a été évaluée en fonction des conditions redox de culture. Les résultats sont présentés Figure 58.

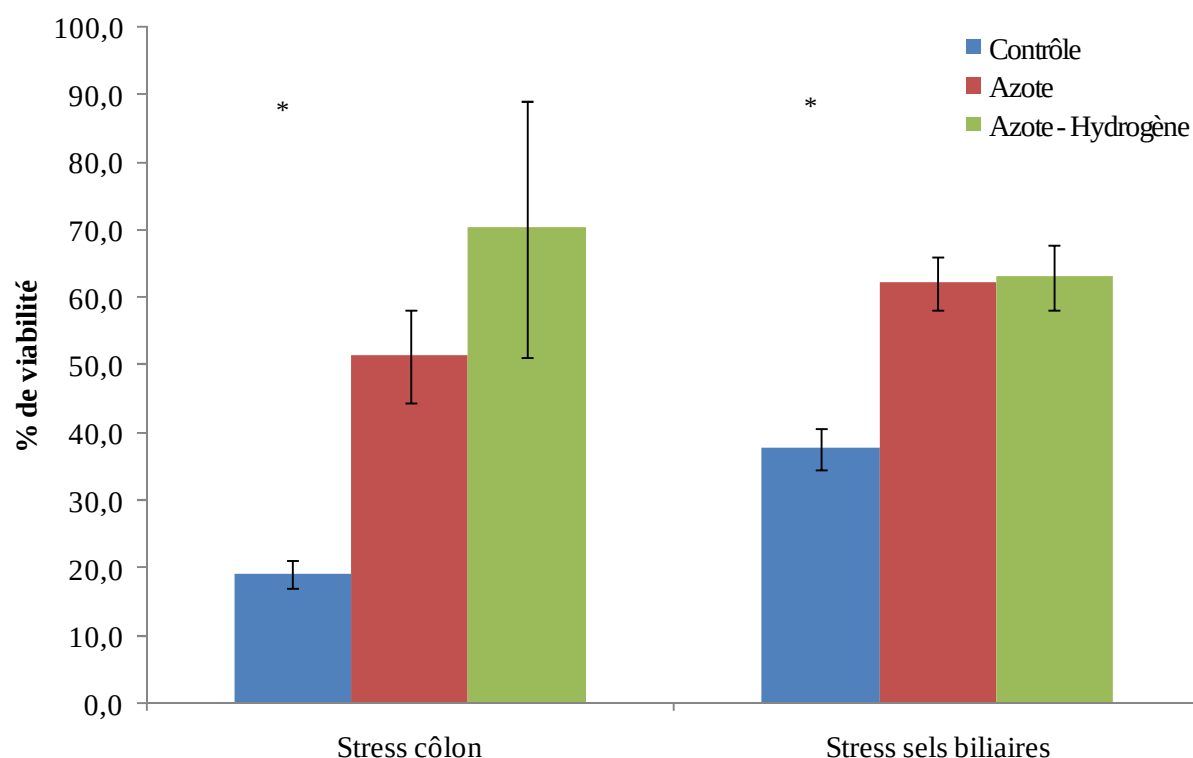


Figure 58 : Résistance de *B. bifidum* aux stress représentatifs du TGI en fonction des conditions redox de culture. * : Groupe significativement différent au risque α de 5% (Test Anova).

La viabilité de *B. bifidum* après un stress représentatif du passage dans le côlon est augmentée de façon significative lorsque la bactérie est cultivée au préalable sous Azote et Azote – Hydrogène. En effet, pour la condition Contrôle, la viabilité est de 19% contre 51% et 70% respectivement pour les conditions Azote et Azote – Hydrogène. Il en est de même pour le stress sels biliaries, puisque pour la condition Contrôle la viabilité après le stress est de 38% alors que sous Azote et sous Azote – Hydrogène, elle est respectivement de 62% et 63% (résultats significatifs au risque α de 5%). Pour ces deux stress, les différences observées entre les conditions Azote et Azote – Hydrogène ne sont pas statistiquement différentes au risque α de 5%.

➔ Les bifidobactéries sont souvent décrites comme étant des bactéries anaérobies strictes. Cependant, leur sensibilité à l'oxygène diffère suivant les espèces. La souche de *B. bifidum* utilisée pour ce travail est capable de se développer en milieu liquide, aussi bien en milieu aérobie qu'en milieu anaérobie. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette souche consomme très rapidement l'oxygène du milieu. De plus cette souche est capable de diminuer le potentiel d'oxydoréduction vers des valeurs négatives. Elle ne possède cependant que très peu de propriété acidifiante. Son incorporation dans un produit laitier n'aura aucun impact, notamment en raison de la température élevée de fermentation utilisée et du temps court mis par les bactéries lactiques à acidifier le milieu. De plus, l'utilisation de gaz pour conditionner les laits fermentés permet d'augmenter la viabilité de *B. bifidum* lors du stockage. Elle n'entraîne cependant aucune modification sur la survie des deux starters du yaourt *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* ni de modifications des cinétiques d'acidification et de réduction. L'augmentation de la survie de *B. bifidum* lors du stockage ne peut pas être attribuée uniquement à l'absence d'oxygène puisqu'une différence de viabilité a également été observée entre le milieu anaérobie (Azote) et le milieu anaérobie et réducteur (Azote – Hydrogène). Lors du stockage à 4 °C les activités métaboliques étant fortement ralenties voire stoppées, l'hypothèse d'une adaptation passive, membranaire par exemple, peut être avancée. De plus, les conditions de culture sous Azote et sous Azote – Hydrogène permettent d'augmenter la résistance de *B. bifidum* au stress oxydant de faible intensité ainsi qu'à des stress représentatifs du tractus gastro-intestinal.

3. Effet de l'Environnement Redox sur les Propriétés de *B. bifidum*

Objectif de l'étude : Dans cette troisième partie du travail, nous nous sommes intéressés à étudier si l'effet positif des gaz sur la survie de *B. bifidum* dans un lait fermenté pouvait également se traduire positivement sur la fonctionnalité de *B. bifidum*. Ainsi, la capacité de la souche à adhérer aux cellules épithéliales et son pouvoir réducteur (c'est-à-dire son aptitude à réduire des composés plus ou moins difficiles à réduire), antioxydant et anti-mutagène a été évalué en fonction de l'environnement redox de culture. Nous avons également analysé d'un point de vue biochimique l'effet de la modulation du potentiel redox sur la structure cellulaire de *B. bifidum*. Cette étude a pour but de comprendre les améliorations apportées à *B. bifidum* par les gaz au niveau de la viabilité ainsi que de la fonctionnalité. La composition lipidique membranaire ainsi que la teneur en thiols exofaciaux ont été analysées en fonction de l'environnement redox dans lequel s'est développé la bactérie.

3.1. Effet des gaz sur la fonctionnalité de *B. bifidum*

3.1.1. Propriété de surface et adhésion cellulaire

Les propriétés de surface de *B. bifidum* en fonction des différentes conditions redox employées ont également été analysées (Tableau 19). Pour ce faire, la méthode MATS (Microbial Adhesion To Solvent) a été utilisée. Trois solvants ont été utilisés : le chloroforme (solvant apolaire traduisant le coté donneur d'électron (basique)), l'acétate d'éthyle (solvant apolaire traduisant le coté accepteur d'électron (acide)) et l'héxadécane (solvant traduisant l'hydrophobicité).

Tableau 19 : Adhésion aux solvants et autoagrégation de *B. bifidum* en fonction des conditions redox.

	Contrôle	Azote	Azote – Hydrogène
Chloroforme	98% ^a	99% ^a	100% ^a
Acétate d'éthyle	37% ^a	35% ^a	42% ^a
Héxadécane	29% ^a	26% ^a	15% ^b
Auto-agrégation (260 min)	30% ^a	30% ^a	22% ^b

^{a, b} : Résultat d'un test de Student-Newman-Keuls (SNK) à 5%. Les valeurs dans une ligne données avec une même lettre ne sont pas statistiquement différentes.

B. bifidum présente dans les trois conditions testées une très forte affinité pour le chloroforme. Au contraire, l'affinité pour l'acétate d'éthyle est faible. La souche de *B. bifidum* serait plutôt électrophile. Au risque α de 5%, il n'y a pas de différence significative entre les trois conditions testées. Cependant, l'affinité pour l'héxadécane diminue de façon significative pour la culture sous Azote-Hydrogène. La souche devient donc moins hydrophobe dans ces conditions. Sous cette condition, la souche diminue également son auto-aggrégation.

Les capacités d'adhésion de *B. bifidum* ont été évaluées par mise en contact des bactéries avec des cellules humaines Caco-2 pendant 1 h. Les bactéries adhésives aux cellules sont ensuite « décrochées » puis dénombrées. Une numération préalable à l'adhésion est également effectuée (Figure 59).

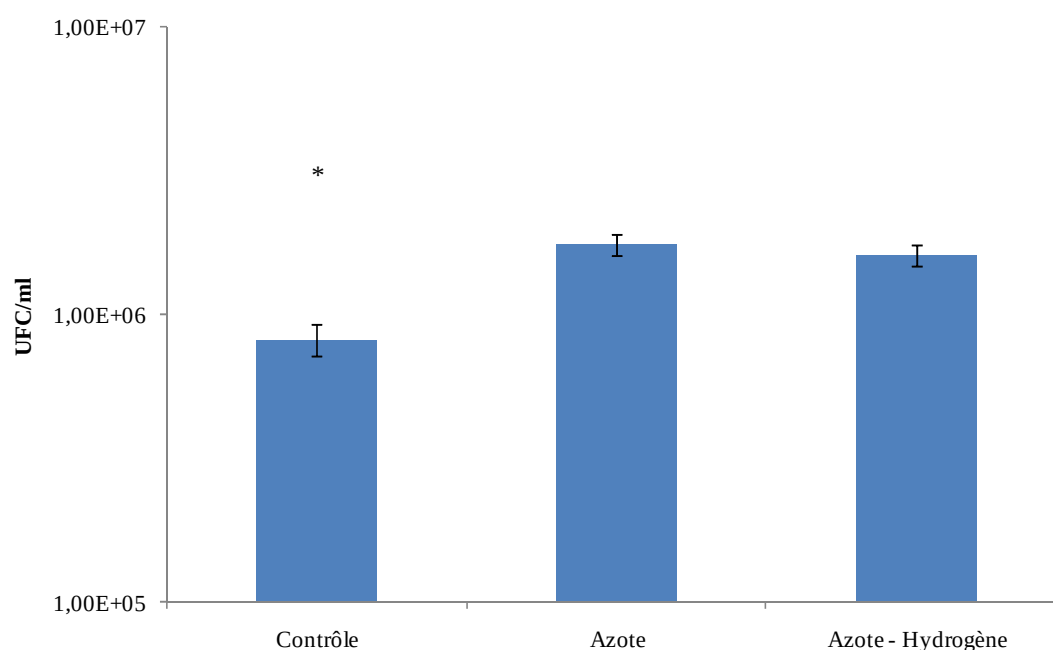


Figure 59 : Adhésion de *B. bifidum* aux cellules Caco-2 sous différentes conditions redox. * : Groupe significativement différent au risque α de 5% (Test Anova).

Pour la condition Contrôle, *B. bifidum* ne présente pas une capacité d'adhésion aux cellules très élevée puisqu'une perte de 3 log est constatée ($8,2 \times 10^5$ cellules adhésives contre $7,9 \times 10^8$ cellules avant l'adhésion). Cependant, sous Azote et également sous Azote-Hydrogène, le nombre de cellules adhésives peut être doublé significativement ($1,8 \times 10^6$ et $1,6 \times 10^6$ cellules adhésives respectivement). Mais même sous ces deux conditions, *B. bifidum* reste une souche faiblement adhérente.

3.1.2. Pouvoir réducteur

Afin d'étudier l'impact des ambiances gazeuses de culture sur le pouvoir réducteur de *B. bifidum* lors de cultures en milieux solides ou liquides, des milieux discriminants redox solides et liquides ont été utilisés.

3.1.2.1. Mesure en milieu solide

L'usage de milieux discriminants redox, initialement mis au point et validé par Michelon (Michelon, 2010) utilise des milieux gélosés supplémentés en différents sels de tétrazolium (MTT, TV, TTC et BT) sélectionnés pour leur difficulté plus ou moins importante à être réduits. Ce test est réalisé en aérobiose (Air) et en anaérobiose (N_2) afin d'observer si les modifications environnementales ont aussi un impact sur les capacités réductrices de la bactérie. Les résultats obtenus après 48 h d'incubation à 37 °C pour chaque condition de culture sont présentés Figure 60.

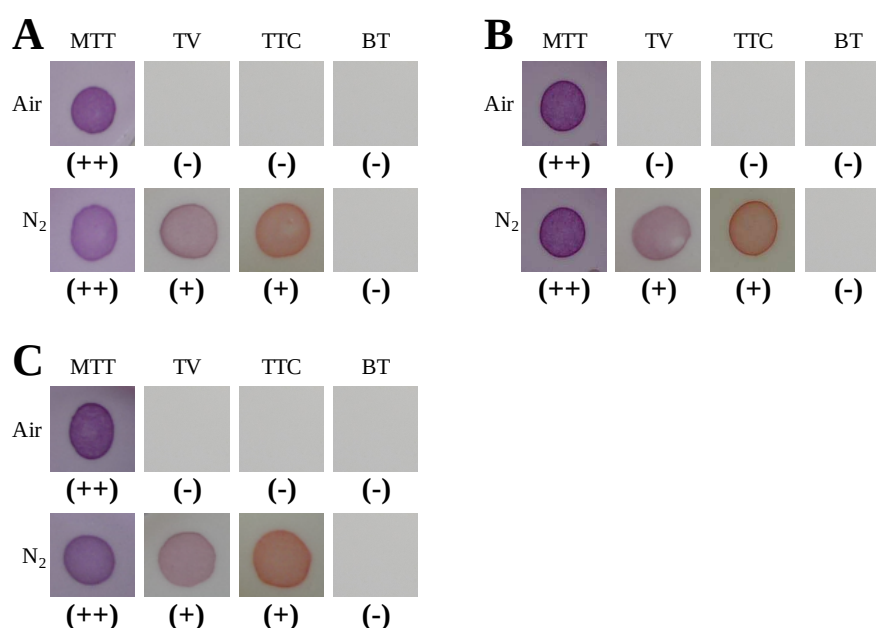


Figure 60 : Culture de *B. bifidum* en spots sur gélose aux sels de tétrazolium MTT, TV, TTC et BT en condition aérobiose (Air) et anaérobiose (N_2). Cultures : Contrôle (A), sous Azote (B) et sous Azote – Hydrogène (C).

D'après la Figure 60, une réduction du MTT apparaît en aérobiose et en anaérobiose (spots de coloration violette intense) pour les trois conditions de culture de *B. bifidum*. Ce sel ne permet pas de distinguer de modification du pouvoir réducteur entre les trois modes de culture. Les

sels TV et TTC ne sont réduits qu'en anaérobiose, mais d'intensité équivalente entre les trois conditions de culture. Ces sels ne permettent pas non plus de détecter de modification du pouvoir réducteur de *B. bifidum* en fonction des conditions gazeuses de culture. Enfin, le sel BT n'est ni réduit en aérobiose ni en anaérobiose, ceci quelque soit les conditions de culture.

Un score est calculé pour chaque condition selon la méthode suivante : les sels de tétrazolum hormis le MTT sont classés du plus facile vers le plus difficile à réduire (TV < TTC < BT). Pour chaque condition (sel et atmosphère d'incubation), un score binaire est attribué : 0 pour l'absence de réduction (-) ou 1 pour la réduction du sel de tétrazolum (+ ou ++). L'ensemble des scores obtenus pour une souche permet d'établir un score final et d'estimer son pouvoir réducteur. Par exemple, pour la condition de culture Contrôle, le calcul est le suivant : $1 \cdot 2^0$ (TV N₂) + $0 \cdot 2^1$ (TV Air) + $1 \cdot 2^2$ (TTC N₂) + $0 \cdot 2^3$ (TTC Air) + $0 \cdot 2^4$ (BT N₂) + $0 \cdot 2^5$ (BT Air) = 5. Les résultats obtenus sur gélose étant identiques quelque soit les conditions de culture testées, le score final est de 5 dans les trois cas. Par rapport à d'autres bactéries lactiques criblées sur le pouvoir réducteur, *B. bifidum* possède un meilleur score que *Lb. bulgaricus* mais plus faible que *St. thermophilus* ou *Lc. lactis*. Cependant, ces souches étant anaérobies facultatives, les résultats restent néanmoins difficilement comparables.

La méthode des sels de tétrazolum a permis de confirmer le pouvoir réducteur de *B. bifidum*. En revanche, aucune différence en fonction des conditions gazeuses de culture n'est mise en évidence.

3.1.2.2. Mesure en milieu liquide

Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, nous avons réalisé le test en milieu liquide. En effet, en milieu liquide, l'accessibilité aux sels de tétrazolum va être facilitée. De plus, en milieu solide, les sels de tétrazolum peuvent précipiter. Les résultats obtenus pour chaque sel de tétrazolum et chaque condition de culture sont présentés [Figure 61](#). Les milieux liquides n'étant pas dégazés, seules les conditions d'incubation en aérobiose sont considérées.

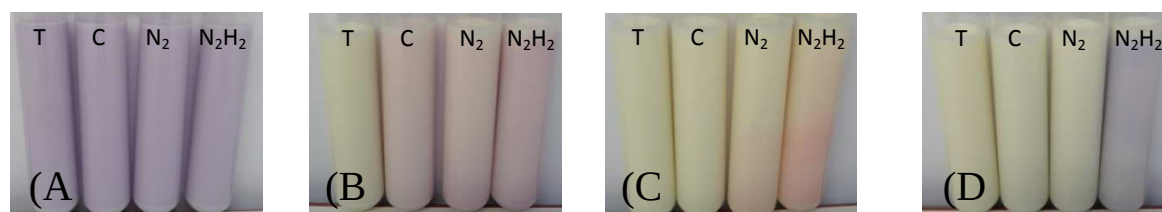


Figure 61 : Mesure du pouvoir réducteur de *B. bifidum* en fonction des conditions de Culture en milieu liquide supplémentés en sels de tétrazolum MTT (A), TV (B), TTC (C) et BT (D). Témoignage : T. Cultures condition Contrôle (C), sous Azote (N₂) ou sous Azote – Hydrogène (N₂-H₂).

En milieu liquide, le MTT et le TV sont réduits par la souche quelque soit le mode de culture ([Figure 61A](#) et [Figure 61B](#)). On observe de plus que le milieu lui-même présente la capacité à réduire le MTT. En revanche, le TTC n'est réduit que par les cultures effectuées sous Azote et sous Azote – Hydrogène, avec une coloration plus intense pour la dernière condition ([Figure 61C](#)). Enfin, le BT n'est réduit que par la culture réalisée sous Azote - Hydrogène ([Figure 61D](#)). Un score propre à chaque condition de culture de *B. bifidum* permet de les classer en fonction du pouvoir réducteur. Par exemple, pour la condition Azote, le calcul est le suivant : 1×2^1 (TV) + 1×2^3 (TTC) + 0×2^5 (BT) = 10. Les résultats sont présentés [Tableau 20](#).

Tableau 20 : Scores obtenus après réduction des milieux liquides supplémentés en sels de tétrazolium par *B. bifidum* cultivée en condition Contrôle, sous Azote ou sous Azote – Hydrogène.

Mode de culture	TV	TTC	BT	Score
Contrôle	+	-	-	2
Azote	+	+	-	10
Azote - Hydrogène	+	+	+	42

Les cellules de la culture sous Azote – Hydrogène semblent posséder un pouvoir réducteur plus important que celles sous Azote avec un score respectif de 42 contre 10. La culture sous Air présente un pouvoir réducteur plus restreint en milieu liquide avec un score de 2. Il semblerait alors que cultiver *B. bifidum* en anaérobiose (Azote et Azote – Hydrogène) augmente son pouvoir réducteur, effet d'autant plus important lorsque l'ambiance gazeuse de la culture est réductrice (Azote – Hydrogène).

3.1.3. Pouvoir antioxydant

Le potentiel antioxydant de *B. bifidum* en fonction des trois conditions redox a été évalué par la méthode KRL ([Figure 62](#)). Les résultats sont exprimés en équivalent trolox (μM). Dans le cas du Contrôle, à une concentration de 1×10^8 UFC/ml, une augmentation de 38% de la résistance du sang témoin aux attaques radicalaires est observée. Cette augmentation dans la résistance du sang témoin induite par la bactérie représente une activité antioxydante qui est équivalente à 125 μM de Trolox. Ainsi, parmi les souches testées pour leur pouvoir antioxydant, *B. bifidum* (en condition Contrôle) fait partie des souches possédant une activité antioxydante importante. De plus, le potentiel global de défense anti-radicalaire de *B. bifidum* est supérieur à la souche de référence *Lb. fermentum* ME-3.

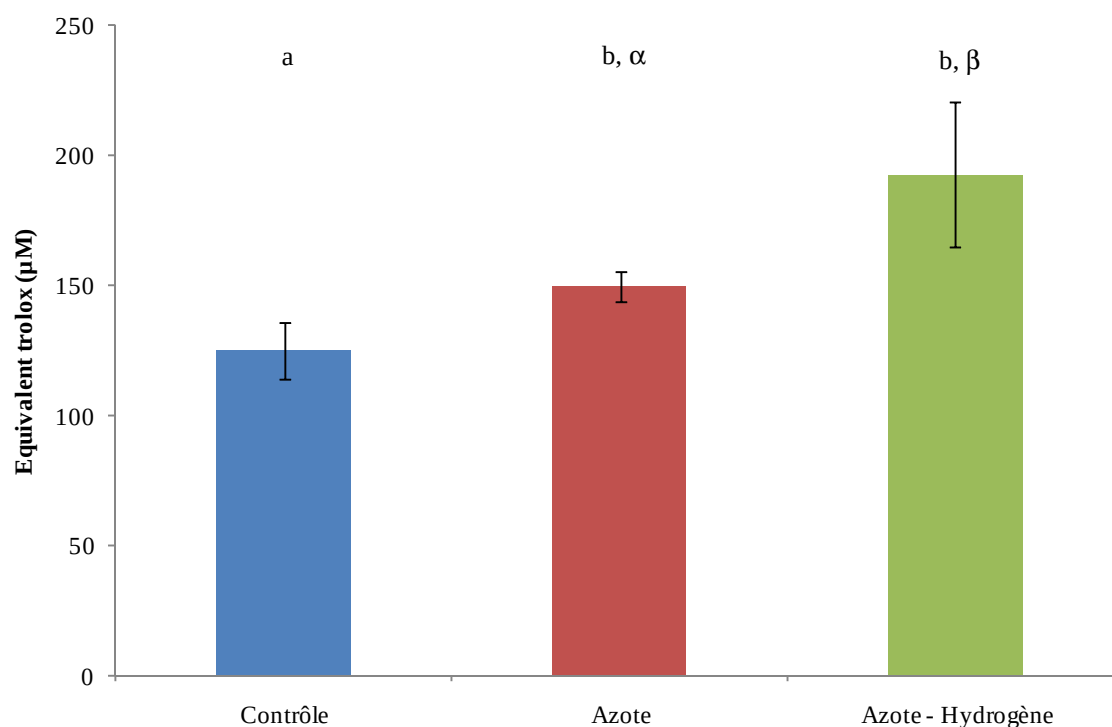


Figure 62 : Effet de l'environnement redox sur le potentiel global de défense anti-radicalaire (Test KRL) de *B. bifidum*. ^{a,b} : les colonnes portant des lettres différentes sont significativement différentes (Test SNK avec un risque α de 5%). ^{α,β} : les colonnes portant des lettres différentes sont significativement différentes (Test SNK avec un risque α de 10%).

Dans le cas du Contrôle, à une concentration de 1×10^8 UFC/ml, une augmentation de 38% de la résistance du sang témoin aux attaques radicalaires est observée. Cette augmentation dans la résistance du sang témoin induite par la bactérie représente une activité antioxydante qui est équivalente à 125 µM de Trolox. Ainsi, parmi les souches testées pour leur pouvoir antioxydant, *B. bifidum* (en condition Contrôle) fait partie des souches possédant une activité antioxydante importante. De plus, le potentiel global de défense anti-radicalaire de *B. bifidum* est supérieur à la souche de référence *Lb. fermentum* ME-3.

Le développement de *B. bifidum* sous conditions redox modifiées permet d'augmenter significativement ce potentiel global de défense anti-radicalaire. En effet, sous Azote, l'augmentation de la résistance du sang témoin est de 46%, ce qui correspond à une activité antioxydante équivalente à 150 µM de Trolox (x1,2 par rapport au Contrôle). De plus, sous environnement réducteur (Azote – Hydrogène), le potentiel global de défense anti-radicalaire de *B. bifidum* est encore amélioré puisque l'augmentation de la résistance du sang témoin est de 59%, ce qui équivaut à 193 µM de Trolox (x1,55 par rapport au Contrôle). Enfin, le pouvoir antioxydant de *B. bifidum* est amélioré sous Azote – Hydrogène par rapport à sous Azote. Cette différence est significative au risque α de 10% (x1,3 en équivalent Trolox).

Ainsi, en cultivant *B. bifidum* sous Azote ou Azote – Hydrogène, son pouvoir antioxydant est considérablement augmenté. Sous ces conditions, cette souche devient la souche ayant le plus fort potentiel de défense anti-radicalaire.

3.1.4. Pouvoir antimutagène

Afin d'évaluer l'impact de la modulation de l'environnement redox par les gaz sur le pouvoir antimutagène de *B. bifidum*, un test des comètes a été mis en place. Tout d'abord, après avoir mis en contact les cellules avec le 4NQO, le spectre d'absorbance (300 - 400 nm) est analysé au spectrophotomètre (Figure 63).

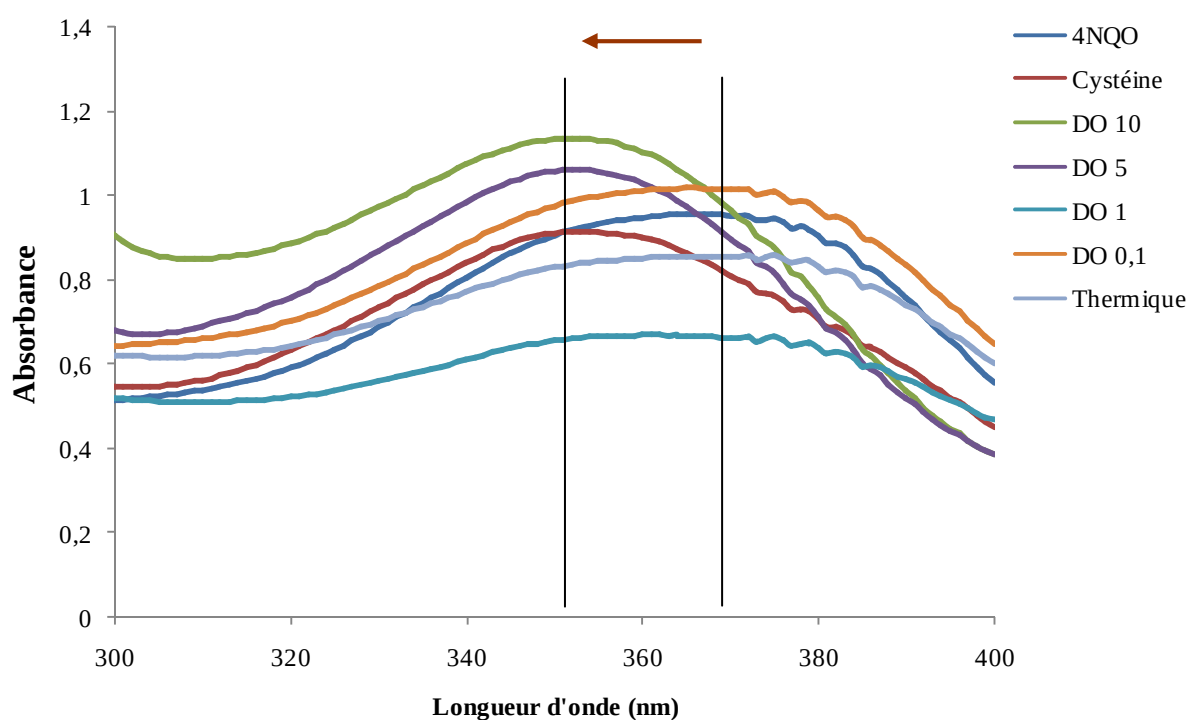


Figure 63 : Effet de la concentration cellulaire de *B. bifidum* sur le spectre d'absorption du 4NQO.

Le spectre natif du 4NQO présente un maximum d'absorbance à 365 nm. Le décalage de ce pic vers 350-355 nm traduit une transformation du 4NQO en 4-aminoquinoline, composé non toxique. La bibliographie s'accordant sur l'implication des groupements thiols dans la bioconversion du 4NQO, nous avons testé l'effet de la cystéine sur le décalage du spectre du 4NQO. A une concentration de 10 g/L (82 mM), elle est ainsi capable de décaler le pic du 4NQO. De plus, le décalage du maximum d'absorption nous a permis de définir la

concentration minimale de cellules à utiliser pour le test des comètes. Ainsi, *B. bifidum* ne semble pouvoir décaler le spectre, et donc agir sur la molécule, qu'à partir d'une concentration cellulaire de 5×10^8 UFC.mL⁻¹. De plus, les cellules traitées thermiquement (100 °C / 15 min) n'ont plus aucun effet sur la 4NQO. De même, la co-incubation du 4NQO avec le surnageant n'entraîne pas de modification du spectre. Ce sont donc la présence des cellules vivantes qui permettent la modification du spectre du 4NQO. Enfin des essais ont été menés avec le NEM (molécule bloquant les thiols exofaciaux) pour regarder l'implication des thiols exofaciaux, mais le spectre du 4NQO n'était alors plus analysable.

C'est donc la concentration cellulaire de 5×10^8 UFC.mL⁻¹ qui a été utilisée pour le test des comètes avec le 4NQO (Figure 64).

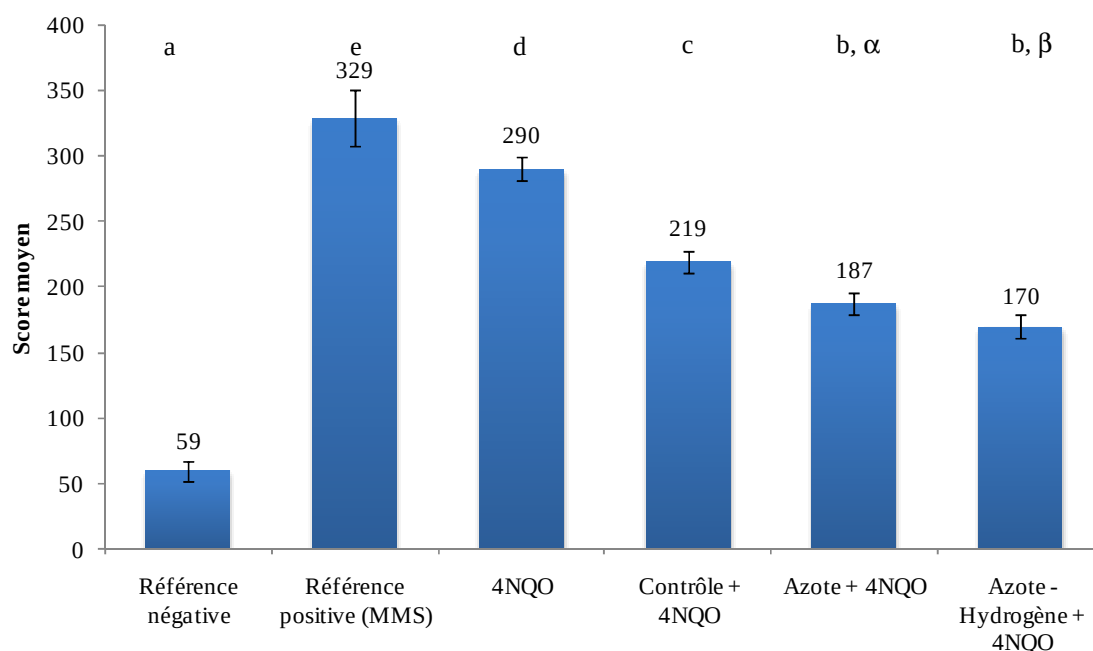


Figure 64 : Score moyen (pour cent cellules). ^{a,b,c,d,e} : les colonnes portant des lettres différentes sont significativement différentes (Test SNK avec un risque α de 5%). ^{αβ} : les colonnes portant des lettres différentes sont significativement différentes (Test SNK avec un risque α de 10%).

Ainsi, la mise en contact préalable de *B. bifidum* avec le 4NQO pendant 3 h à 37 °C permet de diminuer significativement son effet mutagène (condition Contrôle). En effet, le score des classes pour une moyenne de 100 cellules pour la 4NQO est de 290, et il est diminué de 25% après mise en contact au préalable de la réalisation du test de la molécule avec *B. bifidum* (score de 219). Ce score est d'autant plus diminué lorsque *B. bifidum* s'est développée sous Azote (-36%) et sous Azote – Hydrogène (-41%) ; les scores respectifs étant de 187 et de 170 pour l'Azote et l'Azote – Hydrogène. Ainsi, par rapport au Contrôle, la diminution du pouvoir

mutagène de la 4NQO est de 15% pour l’Azote et de 22% pour l’Azote – Hydrogène (résultats significatifs, risque α de 5%). Cependant, les différences observées entre l’azote et l’Azote – Hydrogène ne sont pas significatives au risque α de 5% mais de 10% (diminution de 9% de la mutagenicité entre ces deux conditions).

Afin de voir quelles sont les cellules touchées par la 4NQO, les résultats sont également présentés en répartition des classes ([Figure 65](#)).

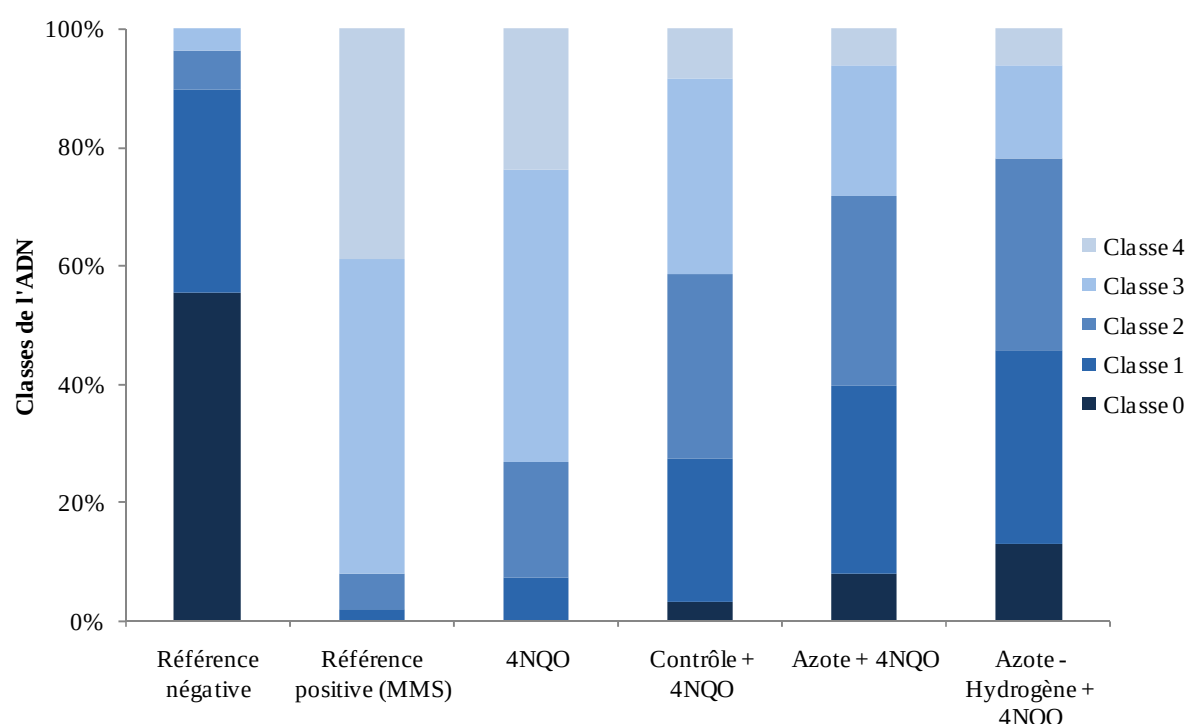


Figure 65 : Répartition des classes.

En détaillant les classes, il est intéressant de constater que la mise en contact préalable au test des comètes de *B. bifidum* et du 4NQO permet de diminuer les comètes de classe 4, c'est-à-dire les cellules en apoptose (résultats significatifs au risque α de 5% ; [Tableau 21](#)). Les comètes de classe 4 restent cependant significativement plus nombreuses que dans le cas de la référence négative (c'est-à-dire sans 4NQO ou MMS). L'effet du conditionnement redox n'a également aucun effet significatif sur ce nombre. De plus, *B. bifidum* permet de diminuer de façon significative les classes 3 et d'augmenter significativement les classes 0, 1 et 2 c'est-à-dire la proportion de cellules respectivement pas du tout, très peu ou moyennement affectée par le 4NQO. Ce résultat est d'autant plus marqué pour les cellules sous Azote et sous Azote

– Hydrogène (Figure 65 & Tableau 21). Enfin, uniquement sous Azote et Azote – Hydrogène, les comètes de classe 2 sont au niveau de la référence négative.

Tableau 21 : Test statistique sur les classes. NS : non statistiquement différent au risque α de 5% ; résultats statistiquement différents au seuil de 5% (*), 1% () ou 1‰ (***).**

	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Référence négative vs. 4NQO	***	***	***	***	***
Référence négative vs. Contrôle	***	**	***	***	***
Référence négative vs. Azote	***	*	NS	***	***
Référence négative vs. Azote – Hydrogène	***	*	NS	***	**
4NQO vs. Contrôle	***	***	***	***	***
4NQO vs. Azote	***	***	***	***	***
4NQO vs. Azote - Hydrogène	***	***	***	***	***
Contrôle vs. Azote	**	*	NS	**	NS
Contrôle vs. Azote - Hydrogène	***	*	NS	***	NS
Azote vs. Azote - Hydrogène	*	NS	NS	**	NS

3.2. Impact des gaz sur la structure cellulaire de *B. bifidum*

3.2.1. Composition lipidique

La composition en acide gras de la membrane de *B. bifidum* a été analysée par chromatographie en phase gazeuse pour les trois conditions redox de culture (Tableau 22). La composition lipidique de *B. bifidum* en condition Contrôle est constituée majoritairement d'acide myristique (16,4%), d'acide palmitique (46,4%), d'acide stéarique (8,5%) et d'acide oléique (15,6%). Ces quatre acides gras constituent presque 90% des acides gras membranaires totaux. Trois de ces quatre acides gras restent majoritaires lorsque *B. bifidum* s'est développée sous Azote ou sous Azote – Hydrogène. Cependant, leur proportion est très différente. En effet, sous Azote la proportion d'acide palmitique est de 21,9%, celle de l'acide stéarique de 15,5% et celle de l'acide oléique de 30,2%. Sous Azote – Hydrogène, l'acide palmitique constitue 25,1% des acides gras totaux, l'acide stéarique 16,5% et l'acide oléique 28,9%.

Tableau 22 : Composition lipidique membranaire

Nom usuel	Nomenclature physiologique	Contrôle	Azote	Azote - Hydrogène
Acide laurique	C 12:0	1.1	<1	<1
Acide myristique	C 14:0	16.4	2.5	2.7
Acide pentadécylique	C 15:0	1.2	2.3	2.8
Acide palmitique	C 16:0	46.4	21.9	25.1
Acide palmitoléique	C 16:1 n-7	1.4	3.0	3.2
Acide hypogéique	C 16:1 n-9	3.1	1.1	1.6
Acide margarique	C 17:0	<1	1.6	1.8
Acide stéarique	C 18:0	8.5	15.5	16.5
Acide cis-vaccénique	C 18:1 c n-7	<1	2.6	1.8
Acide vaccénique	C 18:1 t n-7	<1	2.0	1.3
Acide oléique	C 18:1 n-9	15.6	30.2	28.9
Acide α -linolénique	C 18:3 n-3	<1	1.6	1.5
Acide lactobacillique	Cyc-C 19:0	1.1	3.9	2.9
Acide arachidique	C 20:0	<1	1.1	1.0
Acide gondoïque	C 20:1 n-9	<1	<1	<1
Acide béhénique	C 22:0	<1	1.4	1.0
Acide érucique	C 22:1 n-9	2.1	6.5	5.1
Acide lignocérique	C 24:0	<1	1.2	<1
	Total AGS	75.0	48.0	52.5
	Total AGI	25.0	52.0	47.5
	Anisotropie à 37 °C	0.13	0.13	0.13

AGS : acides gras saturés

AGI : acides gras insaturés

Sous Azote ou sous Azote – Hydrogène, ces trois acides gras ne constituent plus que 70% des acides gras totaux. En effet, la proportion de nombreux acides gras non détectables pour le Contrôle, notamment insaturés, augmente dans ces conditions. En particulier, la proportion en acide lactobacillique, un acide gras cyclique, est triplée sous Azote et Azote – Hydrogène par rapport au Contrôle.

De plus, la longueur moyenne des chaînes d'acides gras augmente de façon significative sous Azote et sous Azote – Hydrogène par rapport au Contrôle (Figure 66A).

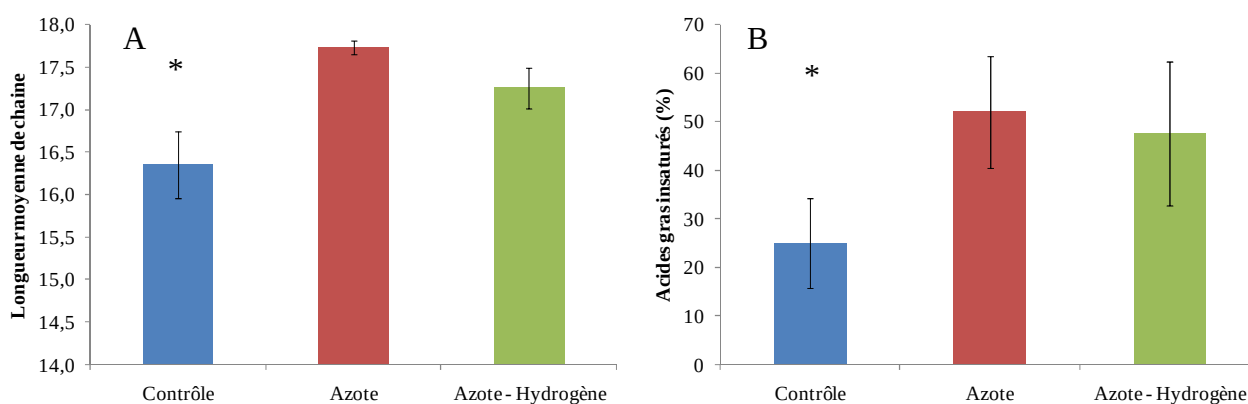


Figure 66 : Longueur moyenne des chaînes d'acides gras (A) et pourcentage d'insaturation (B). * : Groupe significativement différent au risque α de 5% (Test Anova).

En effet, la longueur moyenne est de 16,3 carbones pour le Contrôle et de 17,7 et 17,3 carbones sous Azote et Azote – Hydrogène. Les différences entre ces deux dernières conditions ne sont pas significatives. Enfin, parallèlement à cette augmentation de la longueur moyenne de chaîne, le pourcentage d'acides gras insaturés augmente également de façon significative sous Azote et Azote – Hydrogène (Figure 66B). Ce pourcentage est de 25% pour le Contrôle et respectivement de 52% et 47,5% sous Azote et Azote – Hydrogène. Cependant, aucun changement dans la fluidité membranaire n'a été observé entre les trois conditions de culture (Tableau 22).

Le E_h du milieu a donc un effet drastique sur la composition en acides gras de la membrane de *B. bifidum*. En effet, pour la condition Contrôle, *B. bifidum* possède majoritairement des acides gras à chaîne courte et principalement saturés. Au contraire, sous Azote et Azote – Hydrogène, les acides gras sont à chaîne longue et insaturés.

3.2.2. Thiols exofaciaux

3.2.2.1. Implication des thiols exofaciaux dans la capacité réductrice de *B. bifidum*

D'après les résultats précédents, *B. bifidum* est capable de réduire son milieu. La réincorporation rapide d'oxygène dans la condition Contrôle ainsi que la présence d'une molécule réductrice dans la condition Azote – Hydrogène peuvent avoir des effets sur la mesure du E_h . C'est pourquoi, la mise en évidence des mécanismes impliqués dans les

capacités réductrices de la souche par filtration et ajout de NEM est réalisée uniquement sous Azote. Dans cette condition *B. bifidum* réduit son milieu jusqu'à des valeurs réductrices ($E_h = -129 \text{ mV}$; $E_{h7} = -181 \text{ mV}$). Les résultats sont présentés Figure 67.

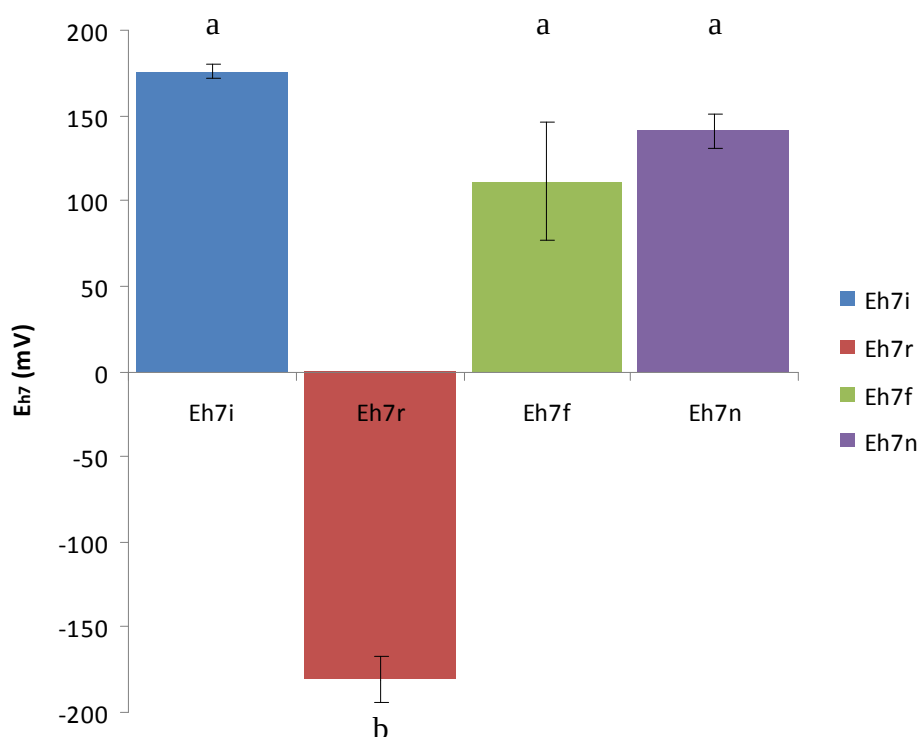


Figure 67 : Effet de la filtration et de l'ajout de NEM sur le maintien du E_{h7} réducteur de cultures de *B. bifidum* (Bleu : E_{h7} initial ; Rouge : E_{h7} final ; Vert : E_{h7} après filtration ; Violet : E_{h7} après ajout de NEM). ^{a,b} : les colonnes portant des lettres différentes sont significativement différentes (Test SNK avec un risque α de 5%).

La filtration provoque une augmentation du E_{h7} du milieu de +292 mV, le filtrat retrouve ainsi une valeur oxydante de +111 mV. Ce résultat indique que la diminution du E_{h7} de conditions oxydantes vers des valeurs réductrices est dépendante de la présence physique des cellules. La neutralisation des thiols exofaciaux de la bactérie par ajout de NEM après réduction du milieu fait augmenter le E_{h7} final du milieu de -181 mV à +141 mV (augmentation de 322 mV). Ce résultat montre qu'une grande part de la contribution des cellules au E_{h7} final (90%) impliquerait les thiols.

3.2.2.2. Visualisation des groupements thiols exofaciaux

Les expériences présentées au chapitre précédent ont permis de mettre en évidence une implication des groupements thiols dans l'activité réductrice de *B. bifidum*. C'est un

mécanisme « passif » peu décrit dans la littérature, c'est pourquoi l'étude est focalisée sur les groupements thiols et la possibilité de les moduler par des conditions gazeuses de culture différentes.

La mise en évidence de groupements thiols des cellules de *B. bifidum* issues des trois conditions de culture différentes est réalisée en premier lieu par une observation en microscopie confocale grâce à la sonde fluorescente Oregon green 488 maléimide. Les résultats sont présentés [Figure 68](#).

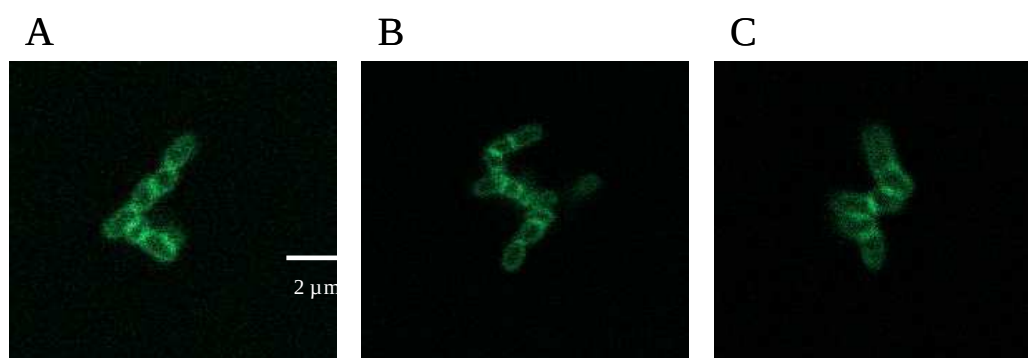


Figure 68 : Observation par microscopie confocale de la fluorescence verte de cellules de *B. bifidum* marquées avec l'Oregon green 488 maléimide. Cellules issues de cultures sous : Contrôle (A), Azote (B) et Azote - Hydrogène (C).

Toutes les cellules visibles en lumière blanche présentent en confocal une fluorescence verte sur la totalité de leur membrane. Ces observations viennent confirmer la présence de nombreux groupements thiols exofaciaux potentiellement impliqués dans l'obtention d'un E_{h7} réducteur par *B. bifidum*. Cependant, aucune différence d'intensité de fluorescence n'apparaît entre les trois conditions gazeuses. Ainsi, cette technique d'observation nous indique que les thiols sont répartis uniformément aussi bien au niveau de la membrane d'une seule bactérie qu'au sein de la population entière de *B. bifidum*. Mais cette méthode ne semble pas être suffisamment sensible pour obtenir une quantification précise des thiols marqués.

3.2.2.3. Dosage quantitatif des groupements thiols exofaciaux et totaux

Afin de mesurer plus précisément la quantité de groupements thiols exofaciaux en fonction des conditions initiales de culture, la technique de dosage d'Ellman a été utilisée. Cette méthode a également permis de doser les groupements thiols totaux. Les résultats sont présentés [Figure 69](#).

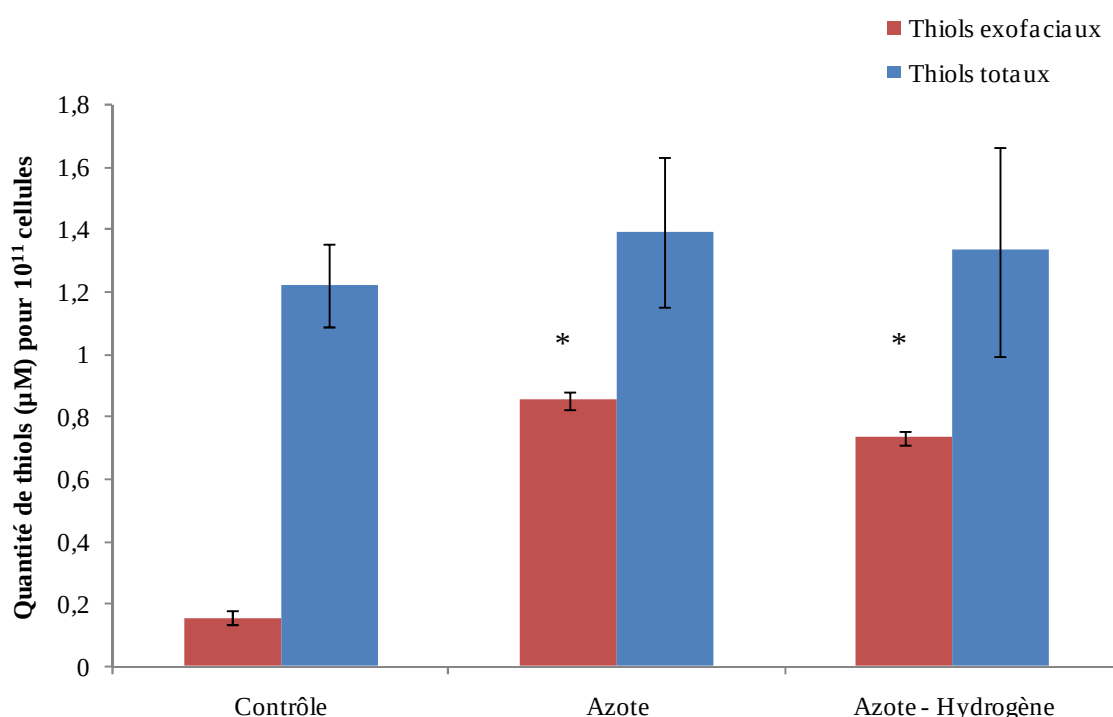


Figure 69 : Représentation de la quantité de thiols exofaciaux et totaux en fonction des conditions de culture. Cellules issues de cultures : Contrôle, sous Azote et sous Azote - Hydrogène. * : Groupes significativement différents au risque α de 5% (Test Anova).

La concentration de groupements thiols exofaciaux est environ 5 fois plus élevée lorsque la souche est initialement cultivée en anaérobiose avec des valeurs de 0,85 μM (Azote) et 0,75 μM (Azote – Hydrogène) pour 10^{11} cellules contre 0,15 μM pour 10^{11} cellules concernant la culture Contrôle ($p < 0,05$). En revanche, aucune différence significative entre les cultures réalisées sous Azote et Azote – Hydrogène n'est observée.

Une fois les thiols intracellulaires libérés par un traitement de casse cellulaire, la proportion de groupements thiols totaux est environ 10 fois plus élevée que celle des thiols de surface pour la condition Contrôle ($p < 0,05$). On remarque que les concentrations de groupements thiols totaux ne sont pas significativement différentes en fonction des conditions de culture avec des quantités de 1,22 ; 1,39 et 1,33 μM pour 10^{11} cellules de *B. bifidum*, respectivement pour les cellules issues de cultures Contrôle, sous Azote et sous Azote – Hydrogène.

Ces résultats montrent que l'absence d'oxygène dans le milieu de culture permet à *B. bifidum* d'accroître sa proportion de thiols présents à la surface.

➔ La modification de l'environnement redox du milieu de croissance de *B. bifidum* permet d'augmenter de façon significative ses propriétés fonctionnelles en tant que probiotique. En effet, bien que *B. bifidum* ne possède pas une forte capacité d'adhésion aux cellules Caco-2 *in vitro*, l'utilisation d'Azote ou d'Azote – Hydrogène permet de doubler le nombre de cellules adhérentes. De plus, le potentiel antioxydant de *B. bifidum* est également augmenté sous Azote et sous Azote – Hydrogène. En effet, les expériences menées ont pu montrer une amélioration du pouvoir réducteur, du pouvoir antimutagène et également du potentiel global de défense anti-radicalaire. La fonctionnalité antioxydante de *B. bifidum* est la plus améliorée pour le cas des cellules produites sous Azote – Hydrogène. *B. bifidum* ne disposant que de très peu de système antioxydant actif (SOD, catalase,...), là encore, l'hypothèse d'un mécanisme passif, membranaire, pourrait permettre d'expliquer cette meilleure fonctionnalité. La modulation des thiols exofaciaux pourraient contribuer à cette explication puisqu'ils sont à la fois impliqués dans la capacité réductrice de *L. lactis* et dans la détoxification du 4NQO.

Le E_h du milieu de culture peut également induire des différences significatives au niveau de la surface cellulaire de *B. bifidum*. En effet, la composition en acide gras entre la condition Contrôle et les deux conditions redox est très différente. La proportion d'acides gras insaturés ainsi que la longueur moyenne de chaîne augmentent de façon significative sous Azote et sous Azote – Hydrogène. La fluidité membranaire reste cependant inchangée. Bien que la quantité de thiols totaux soit équivalente entre les trois conditions, la quantité de thiols exofaciaux est plus importante sous Azote et Azote – Hydrogène. Tout comme chez *L. lactis*, ces thiols exofaciaux sont impliqués dans la capacité réductrice de la souche.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Les phénomènes d'oxydoréduction jouent un rôle primordial sur la qualité des produits laitiers fermentés. En effet, ils peuvent intervenir aussi bien négativement que positivement à la fois sur le développement des qualités organoleptiques et sur la flore microbienne. Néanmoins, le potentiel d'oxydoréduction (E_h) demeure très peu utilisé dans les procédés de fabrication. Les raisons à ce manque d'intérêt peuvent être imputées aux difficultés associées à sa mesure et à sa maîtrise. Des auteurs préconisent cependant la modification de l'environnement redox pour maintenir la viabilité des souches probiotiques sensibles à l'oxygène (Talwalkar and Kailasapathy, 2004b). Une souche de *Bifidobacterium bifidum* a été choisie comme modèle probiotique académique à l'issue des screening viabilité/vitalité et fonctionnalité. Cette souche présente un fort pouvoir antioxydant, certainement basé sur des mécanismes passifs puisque dépourvue de défenses actives (SOD, catalase) mais une faible résistance aux stress environnementaux. Des souches d'intérêt industriel ont également été retenues pour des essais *in vivo* chez la souris. C'est donc l'impact du E_h modulé par des gaz sur *B. bifidum*, que nous avons étudié à travers ce travail. En effet, les mécanismes impliqués dans la capacité réductrice et le pouvoir réducteur de *B. bifidum* demeurent encore inconnus. Plusieurs hypothèses sont souvent avancées pour les bactéries lactiques, notamment la consommation de l'oxygène et la production de métabolites réducteurs. De même, l'effet du potentiel redox du milieu sur *B. bifidum* n'est à ce jour pas décrit dans la littérature.

Démarche de l'étude

Nous avons donc cherché à comprendre le rôle de *B. bifidum* dans la modification du potentiel d'oxydoréduction. Pour cela, nous avons analysé les capacités réductrices (capacité à abaisser le potentiel d'oxydoréduction du milieu, donc à moduler le E_{h7}) ainsi que le pouvoir réducteur (aptitude à réduire des composés plus ou moins difficiles à réduire) de cette souche. En effet, nous avons identifié deux étapes distinctes dans la réduction du milieu par *B. bifidum*. La première correspond à la consommation totale de l'oxygène en milieu aérobie ; la deuxième se déroule en anaérobiose et se caractérise par une diminution du E_{h7} vers des valeurs très réductrices. Nous avons donc concentré dans un premier temps nos recherches sur cette seconde étape ce qui nous a permis de nous soustraire de l'impact de l'oxygène sur la mesure

du E_h. Cette approche a permis d'identifier les composés responsable du E_h réducteur établi par *B. bifidum*.

De plus, afin de caractériser et de comprendre l'impact du potentiel redox sur *B. bifidum* et par delà, les mécanismes impliqués dans la survie et la fonctionnalité de cette souche probiotique, nous avons élaboré deux approches biochimiques : l'une lipidique et l'autre protéique. L'approche lipidique conduite en collaboration avec la plate-forme lipidique de Dijon était basée sur la comparaison de la composition en acides gras membranaire en condition aérobie ou anaérobie et/ou réductrice. L'approche protéique a consisté à déterminer la nature de l'activité réductrice de *B. bifidum* en anaérobiose.

Valorisation des souches sélectionnées sur le screening

Deux souches ont été sélectionnées à l'issue du screening fonctionnalité « pouvoir antioxydant » mais également du screening viabilité/vitalité. Il s'agit des souches *Lb. zae* et *Lb. brevis*. Les résultats *in vitro* ont montré que ces deux souches possédaient des propriétés antioxydantes, la souche de *Lb. zae* montrant de meilleurs résultats que la souche *Lb. brevis*. Leur intégration dans une matrice laitière de type lait fermenté a été validée au stade pilote au sein de l'entreprise Senoble (aspect technologique et organoleptique). Par la suite, la capacité antioxydante de ces deux souches a été testée sur un modèle murin mis en place par l'INRA de Jouy-en-Josas en collaboration avec notre laboratoire et Senoble. La souche de référence *Lb. fermentum* ME-3 a également été utilisée pour l'essai *in vivo* (Songisepp *et al.*, 2005). Un modèle de stress oxydant modéré induit chez la souris par l'administration d'un régime alimentaire carencé en sélénium et en vitamine E a été employé (Kaizu *et al.*, 1993; Mazur *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2007). Après 6 semaines de carence alimentaire, les souris ont été gavées pendant 4 semaines soit avec les différents probiotiques (resuspendus dans du PBS), soit avec du PBS seul. Pendant le gavage, les souris subissent toujours le régime carencé. Un test KRL a été effectué sur le sang et le foie ; la peroxydation lipidique a été mesurée par quantification des MDA et les dosages du glutathion oxydé et du glutathion réduit ont également été analysés dans le foie. Ainsi, les souches testées sont efficaces *in vivo*, avec des résultats proches de la souche de référence ME-3 pour la souche de *Lb. zae*. Cet essai *in vivo* permet de valider la transposition des tests de screening *in vitro* mis en place. Pour confirmer l'efficacité antioxydante des souches, il paraît néanmoins indispensable de refaire cet essai *in vivo*, en incluant de nouveaux marqueurs tels que les PCOOH, les lipoprotéines et l'activité

GPx. Cet essai est actuellement en cours. La souche qui sera identifiée suite à cet essai, devrait être utilisée pour la commercialisation d'un produit fermenté. Une étude clinique en double aveugle contre placebo devra confirmer les effets antioxydants de cette souche chez l'homme. Ceci devra être basée sur l'utilisation de plusieurs critères montrant une protection des cellules ou des molécules (lipides, protéines ou ADN) contre le stress oxydant.

Caractérisation de la capacité réductrice de *Bifidobacterium bifidum*

Les bifidobactéries sont des bactéries probiotiques isolées du tractus digestif de l'homme. Elles sont considérées comme des bactéries anaérobies strictes bien que la tolérance à l'oxygène soit dépendante de l'espèce étudiée (Simpson *et al.*, 2005). Ainsi, Talwalkar *et al.* ont trouvé que *B. animalis* et *B. pseudolongum* ont une faible croissance sous condition aérobie (Talwalkar and Kailasapathy, 2003). Au contraire, *B. infantis* possède une bonne croissance en condition aérobie. Le premier objectif de ce travail a donc été de comparer les capacités de croissance de *B. bifidum* dans des conditions de culture aérobie et anaérobie. La souche est ainsi capable de se développer dans les deux conditions employées. De façon surprenante, cette étude a montré que *B. bifidum* a tendance à pousser légèrement moins vite sous Azote (condition anaérobie) par rapport au Contrôle (condition aérobie). Il en est de même pour les capacités d'acidification de la souche, un léger retard est également constaté en condition anaérobie. Les capacités acidifiantes de cette bactérie restent néanmoins relativement faibles. Des études précédentes ont montré la difficulté de différentes espèces de *Bifidobacterium* de se développer sous forme de colonies quand l'air est saturé uniquement en azote (Kawasaki *et al.*, 2007). Ces auteurs ont montré qu'un mélange gazeux CO₂-N₂ (1%-99%) était suffisant pour assurer un bon développement des colonies bactériennes. En conséquence, la condition anaérobie engendrée par bullage d'azote ou d'azote – hydrogène peut avoir un léger impact négatif sur la croissance et les capacités acidifiantes de la souche en éliminant le CO₂ du milieu. Dans un second temps, le suivi du taux d'oxygène dissous dans le milieu pendant la croissance de la souche en condition Contrôle a permis de mettre en évidence que *B. bifidum* consommait l'oxygène dissous pendant la phase initiale de croissance (consommation de la totalité de l'oxygène en moins de 5 h de culture). Ces données sont en adéquation avec les travaux de Altieri *et al.* qui ont montré que *B. bifidum* était capable de réduire la teneur en oxygène dissous d'un produit laitier durant le stockage à 4 °C aussi bien en culture pure qu'en culture mixte (Altieri *et al.*, 2008). Des études antérieures ont montré la présence de gènes analogues codant pour l'enzyme NADH oxydase (Kawasaki *et al.*, 2006).

Cette enzyme, retrouvée chez de nombreuses bactéries lactiques, utilise le NADH pour réduire l'oxygène en un composé oxydant, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ainsi, l'accumulation d' H_2O_2 dans le milieu pourrait expliquer la légère augmentation du E_{h7} mesurée dans notre étude pendant les cinq premières heures de culture en condition Contrôle. Cependant, l'accumulation d' H_2O_2 représente un danger létal pour *Bifidobacterium*. La plupart des bactéries lactiques utilisent des enzymes spécifiques comme la catalase ou la NADH peroxydase pour l'éliminer. Des études précédentes ont montré que l' H_2O_2 n'était pas accumulé chez *Bifidobacterium* en présence d'oxygène malgré que ces bactéries ne possèdent pas d'activité catalase ou NADH peroxydase (Shimamura *et al.*, 1992). Ces données témoignent de l'existence d'autres mécanismes intervenant dans la réduction de l' H_2O_2 chez les bifidobactéries. Ainsi, l'alkyl hydroperoxyde réductase (enzyme de la famille des peroxiredoxines) est impliquée dans la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau chez *Escherichia coli* et *Streptococcus mutans* (Higuchi *et al.*, 1999). Lee *et al.* ont rapporté la présence de gènes analogues de cette enzyme spécifique chez les bifidobactéries (Lee and O'Sullivan, 2010). Cette enzyme pourrait ainsi être un mécanisme alternatif dans l'élimination de l' H_2O_2 chez *B. bifidum*. Des composés thiols pourraient également permettre la réduction de l' H_2O_2 en eau (Grant *et al.*, 1996). En effet, la diminution des groupements thiols exofaciaux observée en condition aérobie pourrait résulter de leur oxydation par le peroxyde d'hydrogène en acide sulfénique (Figure 70).

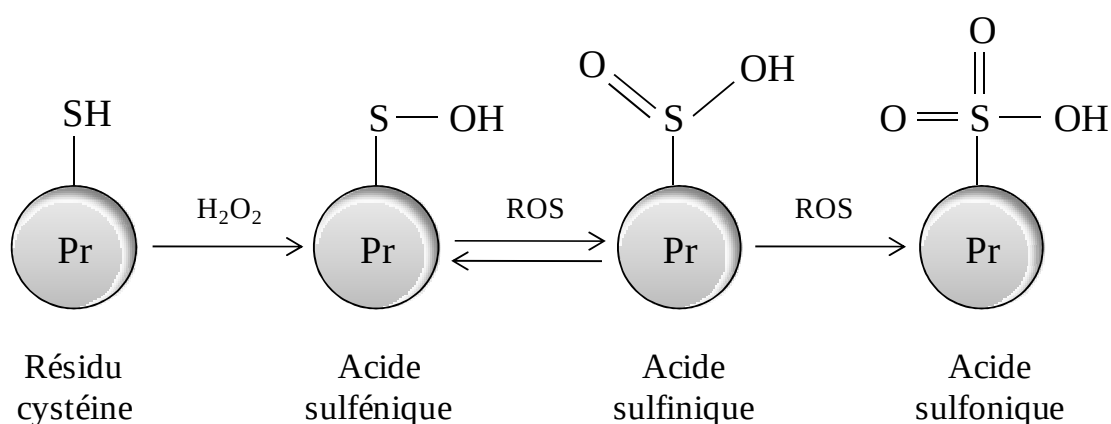


Figure 70 : Oxydation des résidus cystéines en acides sulféniques, sulfiniques et sulfoniques.

Ces produits d'oxydation restent néanmoins difficile à doser, notamment en raison de la grande instabilité de l'acide sulfénique. Ces données soulignent la capacité de *B. bifidum* à neutraliser l'oxygène dissous présent dans le milieu de culture, et ceci dès les première heures de croissance.

La seconde partie de cette étude s'est intéressée à la capacité réductrice de *B. bifidum*. En effet, les bifidobactéries sont parmi les premières espèces à coloniser le tractus digestif de l'homme et deviennent rapidement les bactéries les plus importantes dans le côlon (Kerckhoffs *et al.*, 2006). Le côlon est un environnement anaérobie et réducteur (valeur estimée entre -200 et -300 mV au niveau de la lumière intestinale) (Wilson, 2008). Ainsi, en connaissant l'environnement naturel de *B. bifidum*, le second objectif de cette étude est de caractériser plus précisément la capacité réductrice de cette souche. A ce jour, aucune donnée n'est disponible dans ce domaine sur *Bifidobacterium*. Les résultats obtenus montrent que *B. bifidum* est capable de diminuer le potentiel redox du milieu jusqu'à des valeurs réductrices (-101 mV en condition aérobie et -181 mV en condition anaérobie) pendant sa croissance. De plus, en comparaison avec l'évaluation des capacités réductrices de plusieurs bactéries lactiques réalisée par Brasca *et al.*, *B. bifidum* peut être classée parmi les souches réductrices (Brasca *et al.*, 2007). Dans cette étude, des espèces telles que *Lb. bulgaricus* sont incapables d'établir un E_h réducteur (E_h final de +23 mV), contrairement à d'autres espèces très réductrices comme *Enterococcus faecalis* (E_h final de -196 mV) ou *Lc. Lactis* (-220 mV). Il est intéressant de noter que les entérocoques sont retrouvés dans la même niche écologique que les bifidobactéries, dans le côlon, et à des proportions équivalentes (2 à 3%) (Wilson, 2008). En conséquence, ces résultats nous permettent de penser que *B. bifidum* pourrait être impliquée dans le maintien d'un environnement anaérobie et réducteur dans le côlon.

La dernière partie de cette étude concerne plus précisément l'identification des mécanismes impliqués dans la capacité réductrice de *B. bifidum*. Chez certaines espèces bactériennes, la réduction de l'environnement est principalement due à la production de molécules réductrices dans le milieu (Penfold *et al.*, 2003). Cependant, selon nos résultats, la diminution du E_{h7} du milieu de valeurs oxydantes vers des valeurs réductrices par *B. bifidum* semble être principalement due à la présence des cellules dans le milieu et plus précisément à la présence de composés thiols retrouvés sur la surface externe des bactéries (thiols exofaciaux). Des études précédentes ont montré l'importance des composés thiols exofaciaux dans la capacité réductrice de certaines souches. En effet, chez *L. lactis*, les groupements thiols localisés sur la surface cellulaire bactérienne apparaissent comme étant les composés principaux impliqués dans la réduction du milieu (Michelon *et al.*, 2010). Chez *E. coli* et *B. subtilis*, il a également été montré que l'augmentation du nombre de groupements thiols dans le milieu et sur la surface cellulaire est corrélée avec une diminution importante du E_{h7} durant la transition entre

la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance (Oktyabrsky and Smirnova, 1988). Enfin, une étude très récente menée au laboratoire montre l'importance des thiols exofaciaux chez *B. subtilis* dans les variations de potentiel redox observées entre spores et cellules végétatives (De Coninck *et al.*). Il aurait été intéressant d'étudier les relations dynamiques entre la concentration en thiols exofaciaux et respectivement l'augmentation de la biomasse de *B. bifidum* et la diminution du E_{h7} . En effet, chez *Lc. lactis* une corrélation entre l'évolution du E_{h7} et la concentration de groupements thiols exofaciaux a été démontrée. Ainsi, la diminution du E_{h7} est accompagnée d'une augmentation de la concentration de groupements thiols exofaciaux et un E_{h7} réducteur stabilisé est atteint lorsque la concentration de groupements thiols exofaciaux atteint sa concentration maximale dans le milieu (Michelon *et al.*, 2010). Les différentes étapes de réduction du milieu par *B. bifidum* en milieu aérobie ou anaérobie sont récapitulées [Figure 71](#).

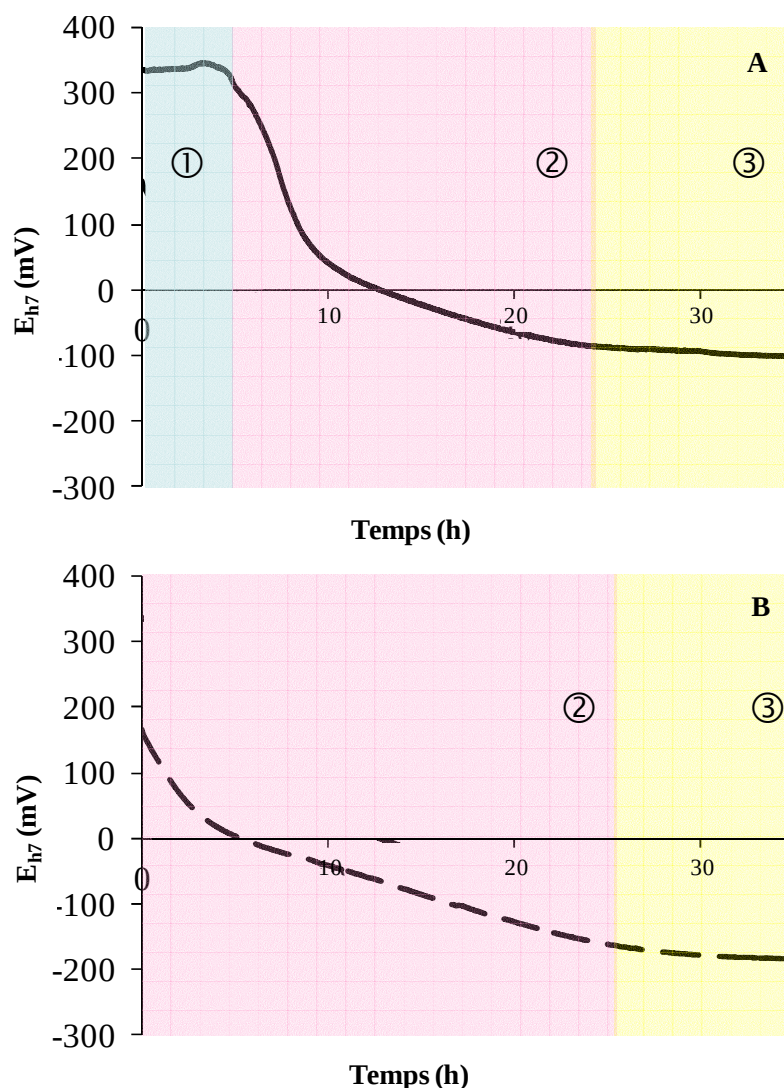


Figure 71 : Identification des différentes phases au cours de la cinétique de réduction de *B. bifidum* en présence (A) et en absence (B) d'O₂. ① : phase de latence, ② : phase de réduction, ③ : stabilisation finale.

Pour résumer, durant la phase de latence en condition aérobie, la totalité de l'oxygène est métabolisé par *B. bifidum*. Cette phase correspondrait donc au temps nécessaire à la bactérie pour éliminer les composés oxydants exogènes par exemple par la réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène *via* la NADH oxydase puis par la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau *via* l'alkyl hydroperoxyde réductase (processus actif) ou les thiols (processus passif). La deuxième phase se déroule en anaérobiose et se caractérise par une diminution rapide du E_h vers une valeur très réductrice. La présence des thiols exofaciaux serait à l'origine de ce phénomène. L'ultime phase correspond à une phase de stabilisation du E_{h7} minimal atteint suite à la phase de réduction. Cependant, contrairement à de précédents résultats (Abraham, 2007; Michelon, 2010), la valeur finale de réduction n'est pas la même en condition aérobie qu'en condition anaérobie. Le pouvoir réducteur de *B. bifidum* doit donc différer entre ces deux conditions. La différence de concentration de groupements thiols exofaciaux observée entre la condition Contrôle et les conditions anaérobies pourrait expliquer ce résultat.

Caractérisation et mécanismes impliqués dans le pouvoir réducteur de *B. bifidum*

Les indicateurs colorés de type indophénols auraient pu être utilisés comme agent de discrimination redox. Cependant, ces molécules sont très sensibles aux variations de pH, ce qui modifie d'une part leurs fenêtres de virage redox, et d'autre part leur couleur. Ils s'avéraient donc inadaptés pour une utilisation appliquée aux bifidobactéries capables d'acidifier leur environnement. Nous nous sommes donc basés sur la méthode développée par Michelon *et al.* utilisant quatre sels de tétrazolium différents et représentatifs d'une large échelle redox (Michelon *et al.*, ; Sollod *et al.*, 1992). Les résultats obtenus avec le test de discrimination redox ont confirmé la difficulté des sels choisis à être réduits : MTT facilement réduit puis dans l'ordre croissant TV, TTC et BT.

Les milieux de discrimination aux sels de tétrazolium nous ont confirmé que *B. bifidum* (condition Contrôle) est une souche réductrice. En effet, bien que *B. bifidum* ne soit pas capable de réduire les sels de tétrazolium en condition aérobie (mis à part le MTT), cette bactérie est capable de réduire quasiment tous les sels en condition anaérobie sauf le BT qui est le sel le plus difficile à réduire. *B. bifidum* possède donc un pouvoir réducteur plus important que *Lb. bulgaricus*, considérée comme faiblement réductrice puisqu'elle ne réduit

que le TV en condition anaérobie (Michelon, 2010). De plus, *B. bifidum* est capable de réduire les mêmes sels que *Lb. plantarum* mais possède un pouvoir réducteur plus faible que *Lc. lactis*, souche très réductrice, qui est capable de réduire tous les sels en condition anaérobie et tous les sels sauf le BT en condition aérobie (Michelon, 2010). Ces données sont également en adéquation avec les capacités réductrices de ces souches (Brasca *et al.*, 2007). Ces résultats restent néanmoins difficiles à interpréter dans la mesure où aucun travail ne concerne le pouvoir réducteur de bactéries anaérobies strictes. Cependant, des travaux précédents impliquant une banque de mutants de *Lc. lactis* ont montré que la ménaquinone est le principal site de réduction des sels de tétrazolum en condition aérobie (Tachon *et al.*, 2009). Bien que l'analyse du génome de *B. bifidum* S17 (CP002220.1) permette de retrouver un gène *menA* codant pour une protéine (ADO53639.1) impliquée dans la formation du précurseur de la ménaquinone, aucune donnée dans la littérature n'indique la présence d'une voie de biosynthèse de la ménaquinone chez *B. bifidum*, même incomplète. Ceci pourrait donc expliquer que *B. bifidum* ne soit pas capable de réduire les sels de tétrazolum en condition aérobie en milieu solide. Par contre, en condition anaérobie la mutation des gènes impliqués dans la biosynthèse de la ménaquinone chez *Lc. lactis* n'a aucun effet sur la réduction de ces sels. Chez *Lc. lactis* et chez *B. bifidum* il doit donc y avoir un autre mécanisme qui intervient dans la réduction des sels de tétrazolum. L'approche biochimique exposée précédemment (utilisation du NEM), ainsi que les résultats obtenus chez *Lc. lactis*, semblent montrer l'implication de groupements thiols exofaciaux dans le pouvoir réducteur de *B. bifidum*. Les thiols exofaciaux sont en partie oxydés en condition aérobie, les empêchant donc de réduire les sels de tétrazolum de la même façon qu'en condition anaérobie. Il faut également noter qu'en milieu liquide, *B. bifidum* est capable de réduire le TV (condition Contrôle) en aérobiose. Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'en milieu liquide, la bactérie est capable de rendre son milieu anaérobie en quelques heures. Les thiols permettraient ensuite la réduction du sel de tétrazolum.

Effet du potentiel redox sur les propriétés de *B. bifidum*

Les tests de screening viabilité/vitalité mis en place ont confirmé que *B. bifidum* possède de faible capacité à résister aux stress environnementaux, en particulier les stress oxydant. En effet, cette bactérie ne possède pas d'enzymes capables de piéger les ROS et ne produit pas de composés antioxydants (Lee and O'Sullivan, 2010). En conséquence, de nombreuses techniques ont été mise en place pour protéger les bifidobactéries de la toxicité de l'oxygène.

La stratégie employée dans cette étude consisté à conditionner le lait par bullage de gaz avant fermentation avec différents environnements redox. Ainsi, l'utilisation d'un bullage de gaz (Azote ou Azote – Hydrogène) avant la fermentation, augmente la survie de *B. bifidum* pendant le stockage à froid des produits laitiers fermentés. Point important, les capacités acidifiantes et la survie des souches du yaourt ne sont pas impactées. L'utilisation d'un environnement similaire à celui retrouvé dans le côlon (absence d'oxygène et/ou condition réductrice) peut donc avoir un impact positif sur les capacités de résistances aux stress oxydants. Cependant, il est à noter que l'élimination de l'oxygène dans le milieu ne peut suffire à expliquer ces résultats. En effet, une différence de survie entre les conditions Azote et Azote – Hydrogène a également été constatée. Ainsi, en plus de l'élimination de l'oxygène (N₂) et de l'addition d'un composé réducteur (H₂), l'augmentation de la viabilité dans les conditions anaérobies et/ou réductrices peut être attribuée à des changements membranaires, par exemple un nombre plus importants de groupements thiols exofaciaux maintenus à l'état réduit. Les groupements thiols sont des composés très importants pour l'activité réductrice (Michelon *et al.*, 2010) mais également pour leur propriété antioxydante et de résistance au stress oxydant (Balcerczyk and Bartosz, 2003; Patsoukis and Georgiou, 2004). Les gaz pourraient également avoir un impact positif sur la composition lipidique et la fluidité membranaire (Ouvry *et al.*, 2002). En conséquence, un des objectifs de cette étude est de déterminer plus précisément l'impact des différentes conditions de culture redox sur les propriétés de *B. bifidum*. Les effets physiologiques, le pouvoir réducteur et la résistance au stress oxydant ont été étudiés en premier lieu en fonction des conditions redox environnementales.

Effet du redox sur le pouvoir réducteur et la résistance au stress oxydant

Tout d'abord, selon nos résultats, le pool de composés thiols semble rester stable en fonction des différentes conditions redox de croissance. Cependant, nous avons pu montrer que la proportion de thiols dans la cellule ou à la surface de la cellule diffère entre les trois cultures. En effet, sous les conditions Azote et Azote – Hydrogène, la proportion de composés thiols exofaciaux est significativement plus importante que dans le cas de la condition Contrôle. En conséquence, la majorité des composés thiols restent à l'intérieur de la bactérie lorsqu'elle est exposée à un stress oxydant. Au contraire, en condition anaérobie, la plupart des thiols sont retrouvés à la surface de la cellule et la quantité intracellulaire est donc moindre. La concentration en thiols exofaciaux de *B. bifidum* concordent avec les résultats obtenus chez *L. lactis*. En effet, *L. lactis*, souche plus réductrice que *B. bifidum* (aussi bien en capacité

réductrice qu'en pouvoir réducteur), possède également plus de thiols exofaciaux (Michelon, 2010). Pour expliquer la différence de répartition des thiols entre la condition Contrôle et les conditions Azote et Azote – Hydrogène, il a été décrit que les bifidobactéries possèdent des régulateurs protéiques spécifiques impliqués dans la détection et la résistance au stress oxydant (Klijn *et al.*, 2005). En effet, le gène du facteur sigma ARN polymérase (ADO53421.1) et la famille des gènes *lysR* (dont *oxyR*) (ADO53123.1), tous deux impliqués dans la détection et la réponse au stress oxydant, ont été retrouvés dans le génome de *B. bifidum* S17. En conséquence, les conditions aérobies (Contrôle) pourraient être responsables de l'activation de ces régulateurs chez *B. bifidum* et induire l'internalisation de certaines protéines spécifiques pour se protéger du stress oxydant. Ce phénomène peut expliquer la diminution de la quantité de composés thiols à la surface des bactéries dans ces conditions. Nous avons également montré que l'augmentation des thiols de surface sous les conditions Azote et Azote – Hydrogène coïncide avec une augmentation du pouvoir réducteur de *B. bifidum* (réduction des sels de tétrazolium en milieu liquide). En effet, sous la condition Azote *B. bifidum* peut réduire le TTC en plus du TV réduit en condition Contrôle et sous la condition Azote – Hydrogène, *B. bifidum* peut en plus réduire le BT. Ce résultat permet de confirmer le rôle des thiols exofaciaux dans le pouvoir réducteur de *B. bifidum*. Pour les cellules issues de cultures sous Azote – Hydrogène, la proportion des thiols exofaciaux est similaire aux cultures sous Azote mais le pouvoir réducteur de la souche est amélioré. Il semblerait qu'un mécanisme supplémentaire soit impliqué. Enfin, les différences de quantité de groupements thiols exofaciaux et de pouvoir réducteur observées entre la condition Azote et la condition Contrôle pourrait permettre d'expliquer que la valeur finale de E_{h7} atteinte diffère entre les deux conditions.

Les groupements thiols sont des composés importants impliqués dans la résistance au stress oxydant. En effet, Fu *et al.* ont montré que chez *Lc. lactis*, les groupements thiols sont impliqués dans la défense face au stress oxydant (Fu *et al.*, 2006a) mais également face au stress acide (Zhang *et al.*, 2007). C'est pourquoi la suite de cette étude est focalisée sur l'effet de l'augmentation des groupements thiols exofaciaux sur les capacités de résistance de *B. bifidum* au stress oxydant. Les cellules précédemment cultivées sous différentes conditions redox sont exposées à un stress oxydant et les résultats indiquent une différence dans la capacité de résistance de la bactérie. En effet, lorsque les cellules sont exposées à un stress oxydant de faible intensité (stress physiologique proche des conditions d'un produit ou « *in vivo* ») ou de courte durée, la survie la plus importante est enregistrée pour *B. bifidum* cultivée sous conditions Azote – Hydrogène (condition réductrice). La présence des groupements

thiols exofaciaux associée à un fort pouvoir réducteur pourrait être responsable de la protection des bactéries face à un stress oxydant d'ordre physiologique. Dans un produit laitier, la concentration en peroxyde d'hydrogène étant comprise entre 0,06 et 0,3 mM, la concentration utilisée pour établir un stress d'ordre physiologique (0,1 mM) correspond à la quantité d'H₂O₂ que l'on peut retrouver dans le yaourt après fermentation (Dave and Shah, 1997a). Ces mêmes auteurs ont également montré que la mise en place d'un environnement réducteur avec de la cystéine ne permettait pas d'éliminer l'H₂O₂ présent dans le milieu. Ainsi, on peut penser que dans le cas de *B. bifidum* cultivée dans la condition Contrôle, *B. bifidum* est exposée à un stress oxydant endogène (du à son métabolisme) et exogène (lié au milieu extérieur) ; en condition Azote *B. bifidum* ne serait uniquement exposée qu'à un stress oxydant exogène mais de plus forte intensité qu'en condition Azote – Hydrogène. Ceci pourrait donc expliquer en partie les différences de viabilité observée dans les produits laitiers fermentés, notamment entre Azote et Azote – Hydrogène. L'environnement redox de *B. bifidum* fluctuant de façon très importante entre sa production en fermenteur, son intégration dans un produit laitier fermenté et son ingestion, *B. bifidum* va être confrontée à des environnements fortement oxydants mais également fortement réducteurs. L'effet cumulatif de toutes ces étapes ne seront pas sans conséquence sur la physiologie de cette bactérie.

Effet du potentiel redox sur les propriétés de surface de B. bifidum

Comme exposé précédemment, l'utilisation de gaz pourrait avoir un impact positif sur la viabilité de *B. bifidum* en modulant la composition lipidique et la fluidité membranaire. Ainsi, sur le plan des acides gras membranaires, la croissance de *B. bifidum* sous Azote ou sous Azote – Hydrogène a comme principal impact une augmentation de la proportion d'acides gras insaturés ainsi que de la longueur moyenne de chaîne. Ainsi la proportion d'acides stéariques (C18:0) et oléiques (C18:1n-9) augmente et celle des acides myristiques (C14:0) et palmitiques (C16:0) diminue sous Azote et sous Azote - Hydrogène. Des modifications similaires ont été mises en évidence chez *Streptococcus pneumoniae* où un changement dans la proportion en acides vaccéniques (C18:1n-7) est couplé avec un changement dans la proportion en acides palmitiques (C16:0) sous conditions aérobie ou anaérobie (Pesakhov *et al.*, 2007). Donc, bloquer le métabolisme carboné oxydatif par le développement de la bactérie dans des conditions anaérobies entraîne une augmentation de la proportion d'acides gras insaturés. Ces auteurs ont également montré que la réduction du niveau de radicaux hydroxyles par l'utilisation de l'acide salicylique permettait d'augmenter la proportion d'acides gras insaturés, similairement aux résultats obtenus en condition anaérobie (Pesakhov

et al., 2007). De plus, l'analyse de la composition en acide gras a montré qu'en conditions anaérobie et/ou réductrice la proportion en acide lactobacillique (Cyc-C19:0) augmente de manière significative. La modulation de cet acide cyclique sous différentes conditions de stress a déjà été décrite chez les bactéries, et notamment chez des espèces de bifidobactéries (Gomez-Zavaglia *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2007). Certains auteurs pensent que la modulation de ce cyclopropane est un paramètre clé dans la résistance au stress (Teixeira *et al.*, 2002). De plus, même si la composition en acides gras membranaire est modifiée sous Azote et sous Azote-Hydrogène par rapport à la condition Contrôle, la fluidité membranaire, mesurée par anisotropie de fluorescence, n'est pas altérée. En effet, quelque soit les conditions redox appliquées à la culture, la valeur d'anisotropie est identique. Nous avons donc montré que la croissance en condition aérobie, qui permet la formation de peroxyde d'hydrogène et par conséquent la formation du radical hydroxyle s'accompagne d'une modification de la composition en acide gras membranaire chez *B. bifidum*, principalement une diminution de la teneur en acides oléiques, stéariques et lactobacilliques au profit d'une augmentation en acides palmitiques et myristiques. Ces changements visent à maintenir l'homéostasie cellulaire, de telle sorte que l'état physique membranaire soit maintenu dans les limites compatibles avec les fonctions métaboliques optimales. En effet, les modifications dans la composition en acide gras permettent à la cellule de maintenir une fluidité membranaire constante (Sinensky, 1974). Cette adaptation, appelée adaptation homéovisqueuse, est essentielle pour les fonctions cellulaires (Veld *et al.*, 1993; Murga *et al.*, 2000). Ainsi, notamment pendant les premières phases de croissance en condition Contrôle, la diminution de la proportion en acide lactobacillique pourrait contribuer à maintenir la fluidité membranaire chez *B. bifidum*. En effet, cet acide gras cyclique est considéré comme étant un rigidifiant des membranes cellulaires et la diminution de ce dernier entrainerait une protection face au stress oxydant en contrebalançant la diminution de la fluidité membranaire attribué aux ROS (les ROS ayant tendance à rigidifier les membranes) (Teixeira *et al.*, 2002; Cazzola *et al.*, 2003). Sous l'effet d'un stress oxydant, le gène codant pour la CFA synthase (enzyme permettant la production du Cyc-C19:0) pourrait ainsi être réprimé. Cependant, cette adaptation de *B. bifidum*, bactérie anaérobie, à un environnement oxydant a des effets délétères sur la survie à d'autres stress (Li *et al.*, 2009). Ainsi, les différences de viabilité observées après des stress représentatifs du tractus gastro-intestinal entre les différentes conditions redox de culture pourraient être expliquées par la modification des acides gras membranaires.

Enfin, la modulation de ces acides gras semble également avoir un rôle dans les propriétés de surface de *B. bifidum*. En effet, le passage d'acides gras saturés à chaînes courtes (conditions Contrôle) vers des acides gras insaturés et à longues chaînes (conditions Azote et Azote – Hydrogène) entraîne notamment une diminution de l'adhérence à l'héxadecane, c'est-à-dire une diminution de l'hydrophobicité de surface (d'autant plus marquée sous Azote – Hydrogène). Ce phénomène a déjà été observée chez *Lb. salivarius*. Après un stress osmotique, la concentration en acides gras insaturés diminue et l'hydrophobicité de surface augmente (Gong *et al.*, 2012). L'auto-agrégation est, elle augmentée. Dans notre étude, les cellules sous conditions Azote – Hydrogène présentent une auto-agrégation qui diffère de la condition Contrôle et Azote (diminution du phénomène d'auto-agrégation). La composition lipidique ne peut donc expliquer totalement ces phénomènes. De plus, il est intéressant de noter que les phénomènes d'auto-agrégation sont sous la dépendance de *oxyR* et correspondent à des mécanismes de défense face au stress oxydant (McLean *et al.*, 2008). Ceci confirme que les cellules sous condition Contrôle et sous Azote subissent un stress oxydant plus important que celle sous Azote – Hydrogène. Les phénomènes précédemment observés avec *Lb. plantarum* en condition réductrice, à savoir une diminution de l'affinité pour le chloroforme et une augmentation de l'affinité pour l'acétate d'éthyle, n'ont pas été retrouvés chez *B. bifidum* (Ouvry *et al.*, 2002). De plus, des données de la littérature montrent que les acides gras insaturés à longues chaînes permettraient d'augmenter l'adhésion des bactéries à la surface épithéliale (Das and Fams, 2002). Ces données pourraient ainsi expliquer la meilleure adhérence aux cellules épithéliales Caco2 de *B. bifidum* en conditions Azote et Azote – Hydrogène. De plus, aucune donnée ne reliant les affinités pour les solvants avec les propriétés d'adhésion des souches probiotiques, les différences d'hydrophobicité observées au niveau de la membrane de *B. bifidum* ne semble pas pouvoir être corrélées avec les modifications notées au niveau de l'adhésion aux cellules Caco-2. Néanmoins, dans notre cas, une diminution de l'hydrophobicité s'accompagne d'une meilleure adhésion cellulaire.

Effet du redox sur la fonctionnalité de B. bifidum

Il a été précédemment montré que la présence de groupements thiols exofaciaux peut participer aux capacités antioxydantes de certains microorganismes. En effet, une étude menée chez la levure *S. cerevisiae* indique que les groupements thiols ont une contribution majeure dans la capacité antioxydante de cette levure (Balcerzyk and Bartosz, 2003). Nos résultats sont en accord avec la littérature puisque sous Azote et Azote – Hydrogène, lorsque la quantité de thiols exofaciaux est plus importante, le potentiel global anti-radicalaire de *B.*

bifidum est augmenté. Néanmoins, les quantités de thiols exofaciaux entre les conditions Azote et Azote – Hydrogène étant identiques, la différence observée au niveau du test KRL entre ces deux conditions montre l'existence d'un second mécanisme impliqué dans le pouvoir global anti-radicalaire de *B. bifidum*. Concernant le test des comètes, les différences de composés thiols à la surface de *B. bifidum* en fonction des conditions redox peuvent également expliquer le meilleur pouvoir anti-mutagène observé. En effet, le 4NQO, molécule mutagène intervenant également dans le stress oxydant, peut être détoxiqué en 4-aminoquinoline ; ceci se traduit par un décalage du maximum d'absorption de la molécule de 365 nm à 355 nm (Caldini *et al.*, 2002). Des auteurs ont également rapporté dans la littérature un effet des bactéries probiotiques sur la mutagénicité de cette molécule, mais aucun mécanisme d'action n'est pour le moment établi (Cenci *et al.*, 2002; Caldini *et al.*, 2005). Il est à noter que le surnageant bactérien étant inefficace, c'est la bactérie elle-même qui semble avoir un effet. De nombreux auteurs s'accordent sur le rôle des molécules thiols dans la réduction du 4NQO en 4-aminoquinoline (Borob'eva *et al.*, 1995; Srinivasan *et al.*, 2004). L'inactivation de l'effet de *B. bifidum* sur le 4NQO par traitement thermique confirme également une implication des thiols. Les résultats obtenus dans ce travail vont dans ce sens, puisque l'augmentation des thiols exofaciaux en conditions Azote et Azote – Hydrogène s'accompagne d'un pouvoir anti-mutagène plus important. C'est donc la première fois qu'une preuve directe montre que les groupements thiols exofaciaux permettent aux bactéries de réduire le pouvoir mutagène du 4NQO. La différence observée entre les conditions Azote et Azote – Hydrogène ne pouvant s'expliquer par la différence de groupements thiols à la surface des cellules, implique soit un autre mécanisme d'action soit le meilleur pouvoir réducteur observé sous condition Azote – Hydrogène.

De plus, la plus grande proportion d'acides gras insaturés et à longues chaînes peut être un atout majeur pour utiliser *B. bifidum* en tant que souche probiotique. En effet, les acides gras insaturés sont un moyen pour éliminer les ROS. La peroxydation lipidique par les radicaux libres consiste en une oxydation des acides gras insaturés (Halliwell and Chirico, 1993). Sous Azote et sous Azote – Hydrogène, *B. bifidum* possédant plus de ces acides gras, elle pourra ainsi mieux résister à un stress oxydant physiologique mais elle pourra également détoxiquer de manière plus efficace le milieu dans lequel elle se trouve. Ces données confirment donc en partie à la fois la meilleure résistance de *B. bifidum* dans ces conditions mais également les résultats obtenus sur le potentiel global de défense anti-radicalaire (test KRL). Aucune donnée bibliographique n'implique cependant la composition lipidique et le détoxication du 4NQO. De plus, les acides gras insaturés ont également un rôle dans l'immuno-modulation (Mills *et*

al., 2005). En modulant le potentiel d'oxydoréduction, des réponses différentes en terme de production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires pourraient ainsi être enregistrées. Cependant, dans nos essais de mise en contact de *B. bifidum*, cultivé sous les trois environnements redox, avec des cellules Caco-2, aucune différence n'a été démontrée en termes de production de cytokines (résultats non exposé dans ce mémoire). Cependant, ces tests ont nécessité de laver plusieurs fois les cellules et de les resuspendre dans un tampon phosphate qui n'a pas été dégazé à l'Azote ou à l'Azote – Hydrogène. De plus, les cellules Caco-2 nécessitant de l'oxygène, *B. bifidum* est co-cultivée en condition aérobie. Ceci pourrait avoir pour effet d'amenuiser voir d'éliminer les différences biochimiques observées lors de cette étude. Il faudrait ainsi imaginer une co-culture plus proche de ce qui se passe dans le tractus gastro-intestinal, c'est-à-dire alimenter les cellules Caco-2 au niveau basal et générer un environnement redox modulable au niveau apical.

CONCLUSION – PERSPECTIVES

CONCLUSION – PERSPECTIVES

En conclusion, grâce aux screening mis en place dans ce travail, nous avons pu sélectionner deux souches probiotiques, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus zeae*, dont l'état physiologique est peu affecté après des stress représentatifs du procédé de fabrication et du tractus gastro-intestinal mais également présentant un fort potentiel antioxydant. L'efficacité *in vitro* de ces souches a été confirmée *in vivo* sur un modèle de souris carencées en sélénium et vitamine E. Ainsi, la prise de probiotique permet de combler le stress oxydant engendré par la carence nutritionnelle. Cependant, des essais complémentaires chez l'animal sont nécessaires pour choisir la souche qui servira à l'essai clinique chez l'Homme.

Nous avons démontré que *Bifidobacterium bifidum*, bien que ne possédant que peu de propriété d'acidification du milieu, était capable d'établir un environnement réducteur (Figure 72). Ceci pourrait ainsi participer au maintien d'un redox négatif au niveau du côlon. La présence de groupement thiols exofaciaux est principalement responsable du E_h réducteur atteint au cours de la croissance de *B. bifidum*. En aérobiose, cette réduction est précédée par la consommation de tout l'oxygène du milieu par *B. bifidum*. Lors de cette phase, la concentration en thiols exofaciaux diminue ce qui pourrait être dû à leur participation à la réduction d'espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2). Des travaux complémentaires permettraient d'identifier plus précisément les protéines impliquées dans la diminution du E_h et également le devenir des groupements thiols en condition aérobie.

La modulation des ces groupements thiols exofaciaux par l'utilisation de gaz neutre (Azote) et/ou réducteur (Azote – Hydrogène) a un effet sur la viabilité et la fonctionnalité de *B. bifidum*. En effet, la conservation de *B. bifidum* dans un produit laitier fermenté est améliorée par l'utilisation de ces gaz. En milieu modèle, la résistance aux stress (stress oxydant d'ordre physiologique, stress sels biliaires et stress du côlon) de *B. bifidum* est également améliorée lorsque la bactérie est préalablement cultivée sous Azote et sous Azote – Hydrogène. De plus, en milieu modèle, le pouvoir antioxydant, le pouvoir réducteur, le pouvoir antimutagène et l'adhésion aux cellules Caco-2 sont également améliorés par rapport à la condition Contrôle. Une contribution de la modulation des acides gras membranaires est également à prendre en compte dans l'amélioration de la viabilité et de la fonctionnalité sous Azote et sous Azote – Hydrogène.

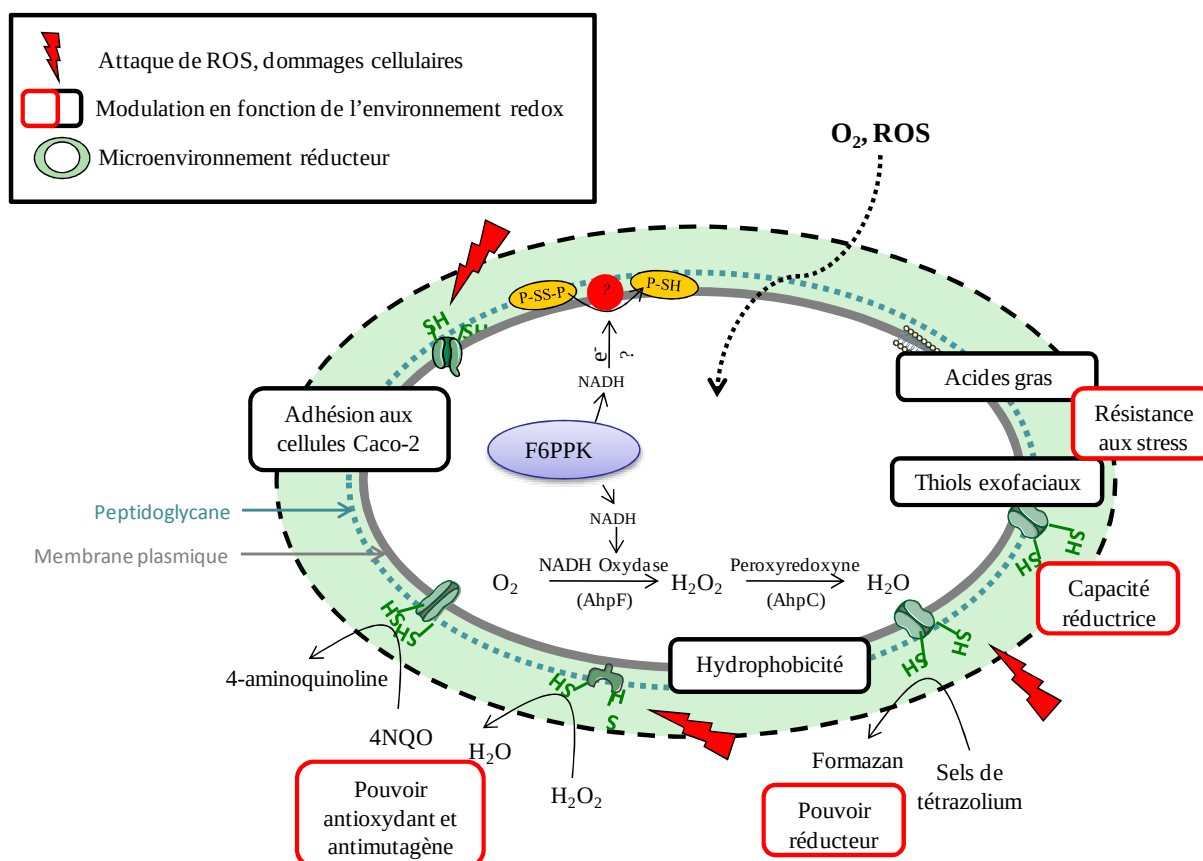


Figure 72 : Schéma récapitulatif de l'effet de la modulation du E_h sur *B. bifidum*

Comme perspectives de travail, il serait intéressant d'identifier la dynamique d'apparition et de disparition des thiols en fonction des conditions redox appliquées mais également la dynamique de la peroxydation lipidique. Le séquençage de cette souche est également en cours. Une fois le génome connu, il sera alors possible de réaliser des puces à ADN. Celles-ci permettront de comparer l'expression ou la répression de gènes cibles en fonction des conditions redox de culture. De plus, en utilisant une enzyme spécifique au stress oxydant (FpG) il serait possible d'utiliser le test des comètes non seulement dans un but de déceler un effet des bactéries sur le pouvoir anti-mutagène, mais également sur le pouvoir antioxydant.

Application industrielle : L'utilisation des gaz afin de diminuer le potentiel d'oxydoréduction du milieu semble très prometteuse d'un point de vue industriel. En effet, outre l'amélioration des qualités organoleptiques du produit, cela permettrait de maintenir une viabilité élevée pour des bactéries probiotiques fragiles comme c'est le cas pour les bifidobactéries. Même si l'effet des gaz sur la fonctionnalité d'une culture mixte n'a pas été évalué, ils ont permis d'améliorer le pouvoir antioxydant de la bactérie probiotique testée.

Afin d'industrialiser ce procédé, il serait intéressant de suivre la viabilité de *B. bifidum* non plus dans des tubes de Hungate imperméables aux gaz, mais dans des pots en PET. Ainsi, seule la phase de fabrication du lait fermenté nécessiterait une modification du procédé de fabrication. Un dégazage entre le camion et l'entrée en cuve (perte de 80% de l'oxygène) pourrait être réalisé, puis une boucle de recyclage adaptée au liquide pourrait être mise en place dans la cuve préalablement inertée (perte de 80% de l'oxygène résiduel). La consommation de gaz est de 2 à 4 volume pour un volume à traiter. Une seconde perspective industrielle consisterait à produire *B. bifidum* sous redox modifié, pour lui permettre d'acquérir une meilleure résistance et une meilleure fonctionnalité, puis de l'encapsuler à l'aide de matériaux imperméable aux gaz et résistant aux pH avant son intégration dans une matrice laitière afin qu'elle garde ses propriétés. De plus, l'utilisation de l'azote semble plus aisée dans un premier temps, mais le mélange Azote – Hydrogène reste celui qui apporte le plus de perspectives en terme de viabilité et de fonctionnalité de *Bifidobacterium bifidum*.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abraham, S. (2007). Evolution du potentiel d'oxydoréduction dans le lait au cours de la transformation fromagère : Impact des composants intrinsèques et des bactéries lactiques. University of Burgundy, France, PhD thesis.

Abraham, S., R. Cachon, B. Colas, G. Feron and J. De Coninck (2007). "E_h and pH gradients in camembert cheese during ripening: Measurements using microelectrodes and correlations with texture." International Dairy Journal **17**(8): 954-960.

Adhikari, K., A. Mustapha and I. U. Grün (2003). "Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt." Journal of Food Science **68**(1): 275-280.

Adlerberth, I., E. Lindberg, N. Aberg, B. Hesselmar, R. Saalman, I. Strannegard and A. Wold (2006). "Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle." Pediatrics Research **59**: 96-101.

Ahn, J. B., H. J. Hwang and J. H. Park (2001). "Physiological responses of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen." Journal of Microbiological and Biotechnology **11**(3): 443-451.

Akahoshi, R. and Y. Takahashi (1996). Yoghurt containing *Bifidobacterium* and process for producing the same. Yakult. Japan. **WO/1996/037113**.

Alander, M., J. Matto, W. Kneifel, M. Johansson, B. Kogler, R. Crittenden, T. Mattila-Sandholm and M. Saarela (2001). "Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract." International Dairy Journal **11**(10): 817-825.

Alp, G. and B. Aslim (2010). "Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk." Anaerobe **16**(2): 101-105.

Altieri, C., A. Bevilacqua, D. D'Amato, M. A. D. Nobile and M. Sinigaglia (2008). "Modelling the survival of starter lactic acid bacteria and *Bifidobacterium bifidum* in single and simultaneous cultures." Food Microbiology **25**(5): 729-734.

Alwazeer, D., C. Delbeau, C. Divies and R. Cachon (2003). "Use of redox potential modification by gas improves microbial quality, color retention, and ascorbic acid stability of pasteurized orange juice." International Journal of Food Microbiology **89**(1): 21-29.

Amice-Quemeneur, N., J. P. Haluk, J. Hardy and T. P. Kravtchenko (1995). "Influence of the acidification process on the colloidal stability of acidic milk drinks prepared from reconstituted nonfat dry milk." Journal of Dairy Science **78**(12): 2683-2690.

Amrouche, T. (2005). Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries: analyse *in vitro* et étude *ex vivo* des mécanismes moléculaires impliqués. University of Laval, Canada, PhD thesis.

Arnér, E. S. J. and A. Holmgren (2000). "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase." European Journal of Biochemistry **267**(20): 6102-6109.

Asemi, Z., S. Jazayeri, M. Najafi, M. Samimi, V. Mofid, F. Shidfar, H. Shakeri and A. Esmailzadeh (2012). "Effect of daily consumption of probiotic yogurt on oxidative stress in pregnant women: a randomized controlled clinical trial." Annals of Nutrition and Metabolism **60**(1): 62-68.

Aubert, C., N. Capelle, S. Jeanson, T. Eckert, C. Divies and R. Cachon (2002). "Le potentiel d'oxydoréduction et sa prise en compte dans les procédés d'utilisation des bactéries lactiques." Sciences des Aliments **22**: 177-187.

- Azqueta, A., G. Pachon, M. Cascante, E. E. Creppy and A. Lopez de Cerain (2005). "DNA damage induced by a quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivative (hypoxic selective agent) in Caco-2 cells evaluated by the comet assay." Mutagenesis **20**(3): 165-171.
- Babu, V., B. K. Mital and S. K. Garg (1992). "Effect of tomato juice addition on the growth and activity of *Lactobacillus acidophilus*." International Journal of Food Microbiology **17**(1): 67-70.
- Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich and J. I. Gordon (2004). "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(44): 15718-15723.
- Bäckhed, F., R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson and J. I. Gordon (2005). "Host-bacterial mutualism in the human intestine." Science **307**(5717): 1915-1920.
- Bagramyan, K., A. Galstyan and A. Trchounian (2000). "Redox potential is a determinant in the *Escherichia coli* anaerobic fermentative growth and survival: effects of impermeable oxidant." Bioelectrochemistry **51**(2): 151-156.
- Balcerzyk, A. and G. Bartosz (2003). "Thiols are main determinants of total antioxidant capacity of cellular homogenates." Free Radical Research **37**(5): 537 - 541.
- Banday, A. A. and M. F. Lokhandwala (2011). "Oxidative Stress Causes Renal Angiotensin II Type 1 Receptor Upregulation, Na⁺/H⁺ Exchanger 3 Overstimulation, and Hypertension." Hypertension **57**(3): 452-459.
- Begley, M., C. G. M. Gahan and C. Hill (2005). "The interaction between bacteria and bile." FEMS Microbiology Reviews **29**(4): 625-651.
- Begley, M., C. Hill and C. G. M. Gahan (2006). "Bile salt hydrolase activity in probiotics." Applied and Environmental Microbiology **72**(3): 1729-1738.
- Bellon-Fontaine, M. N., J. Rault and C. J. van Oss (1996). "Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **7**(1&2): 47-53.
- Beshkova, D. M., E. D. Simova, G. I. Frengova, Z. I. Simov and Z. N. Spasov (2002). "Effect of oxygen on batch yogurt cultures." World Journal of Microbiology and Biotechnology **18**(4): 365-369.
- Bhupathiraju, V. K., M. Hernandez, D. Landfear and L. Alvarez-Cohen (1999). "Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria." Journal of Microbiological Methods **37**(3): 231-243.
- Biavati, B., M. Vescovo, S. Torriani and V. Bottazzi (2000). "Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications." Annals of microbiology **50**(2): 117-131.
- Bolduc, M.-P., L. Bazinet, J. Lessard, J.-M. Chapuzet and J.-C. Vuilleumard (2006a). "Electrochemical modification of the redox potential of pasteurized milk and Its evolution during storage." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(13): 4651-4657.
- Bolduc, M.-P., Y. Raymond, P. Fustier, C. P. Champagne and J.-C. Vuilleumard (2006b). "Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk." International Dairy Journal **16**(9): 1038-1048.
- Borob'eva, L. I., T. A. Cherdyntseva and S. K. Abilev (1995). "Antimutagenic action of bacteria on mutagenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide in *Salmonella typhimurium*." Mikrobiologikiia **64**(2): 228-233.
- Boumerdassi, H., M. Desmazeaud, C. Monnet, C. Y. Boquien and G. Corrieu (1996). "Improvement of diacetyl production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 through oxygen control." Journal of Dairy Science **79**(5): 775-781.
- Brasca, M., S. Morandi, R. Lodi and A. Tamburini (2007). "Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria." Journal of Applied Microbiology **103**(5): 1516-1524.

- Bron, P. A., D. Molenaar, W. M. de Vos and M. Kleerebezem (2006). "DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*." Journal of Applied Microbiology **100**(4): 728-738.
- Bruno-Barcena, J. M., M. A. Azcarate-Peril, T. R. Klaenhammer and H. M. Hassan (2005). "Marker-free chromosomal integration of the manganese superoxide dismutase gene (*sodA*) from *Streptococcus thermophilus* into *Lactobacillus gasseri*." FEMS Microbiology Letters **246**(1): 91-101.
- Buggy, M. (1985). Comparison of the responses of a range of *Lactobacillus* strains to aeration, University College, Cork, Ireland. **PhD thesis**.
- Bühler, H. and H. Galster (1980). Mesure redox : bases et problèmes. Zurich, Switzerland, Ingold technique.
- Burgain, J., C. Gaiani, M. Linder and J. Scher (2011). "Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications." Journal of Food Engineering **104**(4): 467-483.
- Cachon, R. and J. De Coninck (2011). "Le potentiel d'oxydoréduction (E_h) des matrices alimentaires." Techniques de l'Ingénieur. **Sous presse**.
- Cachon, R., C. Divies, P. Jeannot and L. Prost (2000). Method for processing perishable products under modified atmosphere containing hydrogen and resulting packaged products. L. A. Liquide. France. **WO/2002/002409**.
- Cachon, R., S. Jeanson, M. Aldarf and C. Divies (2002). "Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities." Lait **82**(3): 281-288.
- Caldini, G., F. Trotta and G. Cenci (2002). "Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide genotoxicity by *Bacillus* strains." Research in Microbiology **153**(3): 165-171.
- Caldini, G., F. Trotta, M. Villarini, M. Moretti, R. Pasquini, G. Scassellati-Sforzolini and G. Cenci (2005). "Screening of potential lactobacilli antigenotoxicity by microbial and mammalian cell-based tests." International Journal of Food Microbiology **102**(1): 37-47.
- Calligaris, S., L. Manzocco, M. Anese and M. C. Nicoli (2004). "Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk." International Dairy Journal **14**(5): 421-427.
- Carrasco, M., H. Scarinci and A. Simonetta (2005). "Associative growth of lactic acid bacteria for cheese starters: Acidifying and proteolytic activities and redox potential development." Journal of Food, Agriculture and Environnement **3**: 116-119.
- Castellani, R. J., H. G. Lee, X. Zhu, G. Perry and M. A. Smith (2008). "Alzheimer disease pathology as a host response." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **67**(6): 523-31.
- Cazzola, R., S. Russo-Volpe, G. Cervato and B. Cestaro (2003). "Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls." European Journal of Clinical Investigation **33**(10): 924-930.
- Cenci, G., J. Rossi, F. Trotta and G. Caldini (2002). "Lactic acid bacteria Isolated from dairy products inhibit genotoxic effect of 4-nitroquinoline-1-oxide in SOS-chromotest." Systematic and Applied Microbiology **25**(4): 483-490.
- Chamari, M., A. Djazayery, M. Jalali, H. Sadrzadeh, S. Hosseini, R. Heshmat and B. B. Haeri (2008). "The effect of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on some oxidative stress factors in plasma of young healthy women." ARYA Atherosclerosis Journal **4**(4): 175-179.
- Chang, C.-K., H.-Y. Huang, H.-F. Tseng, Y.-D. Hsuuw and T. K. Tso (2007). "Interaction of vitamin E and exercise training on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in rat skeletal muscles." The Journal of nutritional biochemistry **18**(1): 39-45.
- Chung, H. S., Y. B. Kim, S. L. Chun and G. E. Ji (1999). "Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria." International Journal of Food Microbiology **47**(1&2): 25-32.

- Collado, M. C., M. Gueimonde, Y. Sanz and S. Salminen (2006). "Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance " Journal of Food Protection **69**: 1675-1679.
- Collado, M. C., J. Meriluoto and S. Salminen (2007). "In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus." Food Research International **40**(5): 629-636.
- Collado, M. C. and Y. Sanz (2006). "Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid-adaptation ability." Journal of Microbiological Methods **66**(3): 560-563.
- Collins, A. R., A. A. Oscoz, G. Brunborg, I. GaivÃ£o, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C. C. Smith and R. Å tÃªtina (2008). "The comet assay: topical issues." Mutagenesis **23**(3): 143-151.
- Condon, S. (1987). "Responses of lactic acid bacteria to oxygen." FEMS Microbiology Letters **46**(3): 269-280.
- Corrieu, G., E. Spinnler, D. Picque and Y. Jomier (1989). Procédé de mise en évidence et de contrôle de l'activité acidifiante d'agents de fermentation dans des bains de fermentation et dispositif pour sa mise en œuvre., INRA, France. **FR2629612**.
- Coşkun, Ş., B. Aslim and Z. Yuksekdağ (2010). "Effect of two strains of *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* on nitric oxide generation and antioxidant status of rat small intestine." Medicinal Chemistry Research **19**(9): 1082-1091.
- Cotter, P. D. and C. Hill (2003). "Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH." Microbiology and Molecular Biology Reviews **67**(3): 429-453.
- Crawford, R. W., D. L. Gibson, W. W. Kay and J. S. Gunn (2008). "Identification of a bile-induced exopolysaccharide required for *Salmonella* biofilm formation on gallstone surfaces." Infection and Immunity **76**(11): 5341-5349.
- Cremonini, F., S. Di Caro, E. C. Nista, F. Bartolozzi, G. Capelli, G. Gasbarrini and A. Gasbarrini (2002). "Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea." Alimentary Pharmacology & Therapeutics **16**(8): 1461-1467.
- Cummings, J. H., G. R. Gibson and G. T. Macfarlane (1989). "Quantitative estimates of fermentation in the hind gut of man." Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica **86**: 76-82.
- D'Souza, A. L., C. Rajkumar, J. Cooke and C. J. Bulpitt (2002). "Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis." BMJ **324**(7350): 1361.
- Dai, F., Q. Miao, B. Zhou, L. Yang and Z.-L. Liu (2006). "Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells." Life Sciences **78**(21): 2488-2493.
- Das, U. N. and M. D. Fams (2002). "Essential fatty acids as possible enhancers of the beneficial actions of probiotics." Nutrition **18**(9): 786-789.
- Dave, R. I. and N. P. Shah (1997a). "Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures." International Dairy Journal **7**(8-9): 537-545.
- Dave, R. I. and N. P. Shah (1997b). "Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures." International Dairy Journal **7**(6-7): 435-443.
- Dave, R. I. and N. P. Shah (1997c). "Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures." International Dairy Journal **7**(1): 31-41.
- Dave, R. I. and N. P. Shah (1998). "Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt." Journal of Dairy Science **81**(11): 2804-2816.

De Coninck, J., S. Andre, F. Fine, P. Gervais, B. Ebel and R. Cachon "Impact of *Bacillus subtilis*, vegetative cells and spores, on the redox of their medium." En soumission.

Decker, C. W. and U. S. Ashworth (1951). "The keeping quality of whole milk powder. III. The use of antioxidants: ascorbic acid and sodium citrate." Journal of Dairy Science **34**(7): 633-640.

Del Re, B., B. Sgorbati, M. Miglioli and D. Palenzona (2000). "Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*." Letters in Applied Microbiology **31**(6): 438-442.

Delbeau, C. (2005). Impacts de modifications du potentiel d'oxydoréduction par des gaz sur les aptitudes technologiques des bactéries lactiques., University of Burgundy, France. **PhD Thesis**.

Denis, C., C. Beal, M. Bouix, J. F. Chamba, J. E., J. C. Ogier, J. M. Panoff, A. Rault, B. Thammavongs and A. Thierry (2006). "Congélation de micro-organismes d'intérêt laitier : optimisation des conditions d'adaptation des souches avant congélation et des conditions de remise en culture après congélation." Les Actes du BRG **6**: 433-448.

Denou, E., R. D. Pridmore, B. Berger, J.-M. Panoff, F. Arigoni and H. Brussow (2008). "Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the probiotic *Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis." Journal of Bacteriology **190**(9): 3161-3168.

Dinamarca, M. A., F. Cereceda Balic, X. Fadic and M. Seeger (2007). "Analysis of s-triazine-degrading microbial communities in soil using most-probable-number enumeration and tetrazolium-salt detection." International Microbiology **10**: 209-215.

Dong, X., Y. Xin, W. Jian, X. Liu and D. Ling (2000). "*Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **50**(1): 119-25.

Dumont, F., P.-A. Marechal and P. Gervais (2004). "Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates." Applied and Environmental Microbiology **70**(1): 268-272.

Duwat, P., S. Sourice, B. Cesselin, G. Lamberet, K. Vido, P. Gaudu, Y. Le Loir, F. Violet, P. Loubiere and A. Gruss (2001). "Respiration Capacity of the Fermenting Bacterium *Lactococcus lactis* and Its Positive Effects on Growth and Survival." J. Bacteriol. **183**(15): 4509-4516.

Ebel, B., G. Lemetais, L. Beney, R. Cachon, H. Sokol, P. Langella and P. Gervais (2012). "Impact of probiotics on risk factors for cardiovascular diseases. A review." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **doi: 10.1080/10408398.2011.579361**.

EFSA Panel on dietetic products, n. a. a. (2011). "Guidance on the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health." EFSA Journal **9**(12): 2474.

Ejtahed, H. S., J. Mohtadi-Nia, A. Homayouni-Rad, M. Niafar, M. Asghari-Jafarabadi and V. Mofid (2011). "Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients." Nutrition **28**(5): 539-543.

Ellman, G. and H. Lysko (1979). "A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups." Analytical Biochemistry **93**(1): 98-102.

Embley, T. M. and E. Stackebrandt (1994). "The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes." Annual Review of Microbiology **48**(1): 257-289.

Emswiler, B. S., A. W. Kotula, C. M. Chesnut and E. P. Young (1976). "Dye reduction method for estimating bacterial counts in ground beef." Applied and Environmental Microbiology **31**(4): 618-620.

Erkkilä, S. and E. Petäjä (2000). "Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use." Meat Science **55**(3): 297-300.

Fabian, E. and I. Elmadfa (2007). "The effect of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on oxidant and anti-oxidant parameters in plasma of young healthy women." International Journal for Vitamin and Nutrition Research **77**(2): 79-88.

FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food in Report of a Joint FAO/WHO. C. Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture. Organization of the United Nations and World Health Organization: Ontario.

Farr, S. B. and T. Kogoma (1991). "Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." Microbiological Reviews **55**(4): 561-585.

Felis, G. E. and F. Dellaglio (2007). "Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*." Current Issues in Intestinal Microbiology **8**: 44-61.

Finette, B. A., V. Subramanian and D. T. Gibson (1984). "Isolation and characterization of *Pseudomonas putida* PpF1 mutants defective in the toluene dioxygenase enzyme system." Journal of Bacteriology **160**(3): 1003-1009.

Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." Journal of Biological Chemistry **226**(1): 497-509.

Forestier, C., C. De Champs, C. Vatoux and B. Joly (2001). "Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties." Research in Microbiology **152**(2): 167-173.

Fox, P. F. and A. L. Kelly (2006a). "Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects: Part 1." International Dairy Journal **16**(6): 500-516.

Fox, P. F. and A. L. Kelly (2006b). "Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects: Part 2." International Dairy Journal **16**(6): 517-532.

Fu, R.-Y., R. S. Bongers, I. I. van Swam, J. Chen, D. Molenaar, M. Kleerebezem, J. Hugenholtz and Y. Li (2006a). "Introducing glutathione biosynthetic capability into *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 improves the oxidative-stress resistance of the host." Metabolic Engineering **8**(6): 662-671.

Fu, R. Y., R. S. Bongers, I. I. van Swam, J. Chen, D. Molenaar, M. Kleerebezem, J. Hugenholtz and Y. Li (2006b). "Introducing glutathione biosynthetic capability into *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 improves the oxidative-stress resistance of the host." Metabolic engineering **8**: 662-671.

Fuller, R. (1991). "Probiotics in human medicine." Gut **32**(4): 439-442.

George, Richardson, Pol and Peck (1998). "Effect of oxygen concentration and redox potential on recovery of sublethally heat-damaged cells of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*." Journal of Applied Microbiology **84**: 903-909.

Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid (1995). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." Journal of Nutrition **125**(6): 1401-1412.

Gionchetti, P., F. Rizzello, U. Helwig, A. Venturi, K. M. Lammers, P. Brigidi, B. Vitali, G. Poggioli, M. Miglioli and M. Campieri (2003). "Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial." Gastroenterology **124**(5): 1202-1209.

Godward, G., K. Sultana, K. Kailasapathy, P. Peiris, R. Arumugaswamy and N. Reynolds (2000). "The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods " Milchwissenschaft **55**(8): 441-445.

Gomes, A. M. P. and F. X. Malcata (1999). "*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics." Trends in Food Science & Technology **10**(4-5): 139-157.

Gomez-Zavaglia, A., G. Kociubinski, P. Perez, E. Disalvo and G. De Antoni (2002). "Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria." Journal of Applied Microbiology **93**(5): 794-799.

Gong, X., H. Yu, J. Chen and B. Han (2012). "Cell surface properties of *Lactobacillus salivarius* under osmotic stress." European Food Research and Technology **234**(4): 671-678.

Göttel, M. (2009). The role of 17beta-estradiol on 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated oxidative DNA damage in liver cell models, Kaiserslautern University, Germany. **PhD Thesis**.

Grant, C., F. MacIver and I. Dawes (1996). "Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Current Genetics **29**(6): 511-515.

Green, M. L. and D. J. Manning (1982). "Development of texture and flavour in cheese and other fermented products." Journal of Dairy Research **49**(04): 737-748.

Greenbank, G. R. and P. A. Wright (1951). "The deaeration of raw whole milk before heat treatment as a factor in retarding the development of the tallowy flavor in its dried product." Journal of Dairy Science **34**(8): 815-818.

Griffiths, H. R., L. Møller, G. Bartosz, A. Bast, C. Bertoni-Freddari, A. Collins, M. Cooke, S. Coolen, G. Haenen, A.-M. Hoberg, S. Loft, J. Lunec, R. Olinski, J. Parry, A. Pompella, H. Poulsen, H. Verhagen and S. B. Astley (2002). "Biomarkers." Molecular Aspects of Medicine **23**(1-3): 101-208.

Gueimonde, M., C. Garrigues, D. van Sinderen, C. G. de los Reyes-Gavilan and A. Margolles (2009). "Bile-inducible efflux transporter from *Bifidobacterium longum* NCC2705, conferring bile resistance." Applied and Environmental Microbiology **75**(10): 3153-3160.

Gueimonde, M., A. Margolles, C. G. de los Reyes-Gavilan and S. Salminen (2007). "Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile - A preliminary study." International Journal of Food Microbiology **113**(2): 228-232.

Gueimonde, M., L. Noriega, A. Margolles, C. G. de los Reyes-Gavilan and S. Salminen (2005). "Ability of *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile to adhere to human intestinal mucus." International Journal of Food Microbiology **101**(3): 341-346.

Gunn, J. S. (2000). "Mechanisms of bacterial resistance and response to bile." Microbes and Infection **2**(8): 907-913.

Guo, Z., X. M. Liu, Q. X. Zhang, Z. Shen, F. W. Tian, H. Zhang, Z. H. Sun, H. P. Zhang and W. Chen (2012). "Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: A meta-analysis of randomised controlled trials." Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases **21**(11): 844-850.

Halliwell, B. and S. Chirico (1993). "Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance." The American Journal of Clinical Nutrition **57**(5): 715S-724S.

Hauville, C., S. Remita, P. Therond, D. Jore and M. Gardes-Albert (2001). "Radiation induced peroxidation of polyunsaturated fatty acids: Recent results on formation of hydroperoxides." Canadian Journal of Physiology and Pharmacology **79**(2): 176-179.

Hayashi, S., T. Kobayashi and H. Honda (2003). "Simple and rapid cell growth assay using tetrazolium violet coloring method for screening of organic solvent tolerant bacteria." The Society for Biotechnology **96**(4): 360-363.

Higuchi, M., Y. Yamamoto, L. B. Poole, M. Shimada, Y. Sato, N. Takahashi and Y. Kamio (1999). "Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidative stress of *Streptococcus mutans*." Journal of Bacteriology **181**(19): 5940-5947.

Hugenholtz, J. and M. Kleerebezem (1999). "Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations." Current Opinion in Biotechnology **10**(5): 492-497.

Hull, R. R., A. V. Roberts and J. J. Mayes (1984). "Survival of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt. ." Australian Journal of Dairy Technology **39**(4): 164-166.

Hütt, P., H. Andreson, T. Kullisaar, T. Vihalemm, E. Unt, J. Kals, P. Kampus, M. Zilmer and M. Mikelsaar (2009). "Effects of a synbiotic product on blood antioxidative activity in subjects colonized with *Helicobacter pylori*." Letters in Applied Microbiology **48**(6): 797-800.

Ignatova, M., I. Leguerinel, M. Guilbot, H. Prévost and S. Guillou (2008). "Modelling the effect of the redox potential and pH of heating media on *Listeria monocytogenes* heat resistance." Journal of Applied Microbiology **105**(3): 875-883.

Imhof, R. and J. O. Bosset (1994). "Quantitative GC-MS analysis of volatile flavour compounds in pasteurized milk and fermented milk products applying a standard addition method." LWT - Food Science and Technology **27**(3): 265-269.

Imlay, J. A. (2002). How oxygen damages microbes: Oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. Advances in Microbial Physiology, Academic Press. **Volume 46**: 111-153.

Imlay, J. A. (2003). "Pathways of oxidative damage." Annual Review of Microbiology **57**: 395-418.

Imlay, J. A. (2008). "Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide." Annual review of biochemistry **77**: 755-776.

Isolauri, E., P. V. Kirjavainen and S. Salminen (2002). "Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation?" Gut **50**(90003): 54-59.

Jacob, H. E. (1970). Redox potential. Methods in microbiology. London, Academic Press. **2**: 91-123.

Jayamanne, V. S. and M. R. Adams (2006). "Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts." Letters in Applied Microbiology **42**(3): 189-194.

Jayamanne, V. S. and M. R. Adams (2009). "Modelling the effects of pH, storage temperature and redox potential (E_h) on the survival of bifidobacteria in fermented milk." J. Food Sci. Tech. **44**(6): 1131-1138.

Jeanson, S., N. Hilgert, M. Coquillard, C. Seukpanya, M. Faiveley, P. Neveu, S. Abraham, V. Georgescu, P. Fourcassie and E. Beuvier (2009). "Milk acidification by *Lactococcus lactis* is improved by decreasing the level of dissolved oxygen rather than decreasing redox potential in the milk prior to inoculation." International Journal of Food Microbiology **131**: 75-81.

Jensen, N. B. S., C. R. Melchiorson, K. V. Jokumsen and J. Villadsen (2001). "Metabolic behavior of *Lactococcus lactis* MG1363 in microaerobic continuous cultivation at a low dilution rate." Applied and Environmental Microbiology **67**(6): 2677-2682.

Jönsson, H. and H. Pettersson (1977). "Studies on the citric acid fermentation in lactic starter cultures with special interest in alpha-aceto-lactic acid. Metabolic studies." Milchwissenschaft **32**: 587-594.

Kailasapathy, K. (2002). "Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications." Current Issues in Intestinal Microbiology **3**(2): 39-48.

Kailasapathy, K. and S. Rybka (1994). "*L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. : their therapeutic potential and survival in yogurt." Australian Journal of Dairy Technology **52**(1)(28-35).

Kailasapathy, K., D. Supriadi and J. A. Hourigan (1996). "Effect of partially replacing skim milk powder with whey protein concentrate on buffering capacity of yoghurt." Australian Journal of Dairy Technology **51**(2): 101-126.

Kaizu, H., M. Sasaki, H. Nakajima and Y. Suzuki (1993). "Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E." Journal of Dairy Science **76**(9): 2493-2499.

Kaprelyants, A. S., G. V. Mukamolova, H. M. Davey and D. B. Kell (1996). "Quantitative analysis of the physiological heterogeneity within starved cultures of *Micrococcus luteus* by flow cytometry and cell sorting." Applied and Environmental Microbiology **62**(4): 1311-6.

Kaur, S., T. Kullisaar, M. Mikelsaar, M. Eisen, A. Rehema, T. Vihalemm, K. Zilmer and M. Zilmer (2008). "Successful management of mild atopic dermatitis in adults with probiotics and emollients." Central European Journal of Medicine **3**(2): 215-220.

- Kawasaki, S., T. Mimura, T. Satoh, K. Takeda and Y. Niimura (2006). "Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to oxygen." Applied and Environmental Microbiology **72**(10): 6854-6858.
- Kawasaki, S., M. Nagasaku, T. Mimura, H. Katashima, S. Ijyuin, T. Satoh and Y. Niimura (2007). "Effect of CO₂ on Colony Development by *Bifidobacterium* Species." Applied and Environmental Microbiology **73**(23): 7796-7798.
- Keen, A. (1972). "Growth studies on lactic streptococci. IV. Some Observations on redox potential." Journal of Dairy Research **39**: 161-165.
- Kerckhoffs, A. P. M., M. Samsom and G. P. Berge Henegouwen (2006). Sampling microbiota in the human gastrointestinal tract. Gastrointestinal Microbiology. T. F. Group. New York.
- Kheadr, E., N. Dabour, C. Le Lay, C. Lacroix and I. Fliss (2007). "Antibiotic susceptibility profile of bifidobacteria as affected by oxgall, acid, and hydrogen peroxide stress." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **51**(1): 169-174.
- Klaver, F. A. M., F. Kingma and A. H. Weerkamp (1993). "Growth and survival of bifidobacteria in milk." Netherlands Milk and Dairy Journal **47**(3-4): 151-164.
- Klijn, A., A. Mercenier and F. Arigoni (2005). "Lessons from the genomes of bifidobacteria." FEMS Microbiology Reviews **29**(3): 491-509.
- Kneifel, W., D. Jaros and F. Erhard (1993). "Microflora and acidification properties of yoghurt and yoghurt-related products fermented with commercially available starter cultures." International Journal of Food Microbiology **18**: 179-189.
- Kristiansen, T. Z., J. Bunkenborg, M. Gronborg, H. Molina, P. J. Thuluvath, P. Argani, M. G. Goggins, A. Maitra and A. Pandey (2004). "A proteomic analysis of human bile." Molecular & Cellular Proteomics **3**(7): 715-728.
- Kristoffersen, T. (1967). "Interrelationships of flavor and chemical changes in cheese." Journal of Dairy Sciences **50**: 279-284.
- Kullisaar, T., J. Shepetova, K. Zilmer, E. Songisepp, A. Rehema, M. Mikelsaar and M. Zilmer (2011). "An antioxidant probiotic reduces postprandial lipemia and oxidative stress." Central European Journal of Biology **6**(1): 32-40.
- Kullisaar, T., E. Songisepp, M. Mikelsaar, K. Zilmer, T. Vihalemm and M. Zilmer (2003). "Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects." The British Journal of Nutrition **90**(2): 449-56.
- Kullisaar, T., M. Zilmer, M. Mikelsaar, T. Vihalemm, H. Annuk, C. Kairane and A. Kilk (2002). "Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics." International Journal of Food Microbiology **72**(3): 215-224.
- Kurdi, P., H. Tanaka, H. W. van Veen, K. Asano, F. Tomita and A. Yokota (2003). "Cholic acid accumulation and its diminution by short-chain fatty acids in bifidobacteria." Microbiology **149**(8): 2031-2037.
- Langeveld, L. P. M. and T. E. Galesloot (1971). "Estimation of the oxidation-reduction potential as an aid in tracing the cause of excessive openness in cheese." Netherlands Milk and Dairy Journal **25**: 15-23.
- Lankaputhra, W. E. V. and N. P. Shah (1998). "Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **397**(2): 169-182.
- Laroche, C., L. Beney, P. A. Marechal and P. Gervais (2001). "The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures." Applied Microbiology and Biotechnology **56**(1): 249-254.

Lauer, E. and O. Kandler (1983). "DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*." Systematic and Applied Microbiology **4**(1): 42-64.

Le Floch, V. (2004). Caractérisation de l'organisation moléculaire par microscopie non-linéaire cohérente et incohérente. University of Cachan, France. **PhD Thesis**.

Lebeer, S., T. L. A. Verhoeven, M. Perea Velez, J. Vanderleyden and S. C. J. De Keersmaecker (2007). "Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG." Applied and Environmental Microbiology **73**(21): 6768-6775.

Lee, J.-H. and D. J. O'Sullivan (2010). "Genomic insights into *Bifidobacteria*." Microbiology and Molecular Biology Reviews **74**(3): 378-416.

Leistner, L. and A. Mirna (1959). "Das redoxpotential von pökelladen." Die Fleischwirtschaft **8**: 659-666.

Leistner, L. and G. M. Gorris (1995). "Food preservation by hurdle technology." Trends in Food Science and Technology **6**: 41-46.

Leistner, L. and A. Mirna (1959). "Das redoxpotential von pökelladen." Die Fleischwirtschaft **8**: 659-666.

Len, A. C. L., D. W. S. Harty and N. A. Jacques (2004). "Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance." Microbiology **150**(5): 1353-1366.

Leverrier, P., D. Dimova, V. Pichereau, Y. Auffray, P. Boyaval and G. n. I. Jan (2003). "Susceptibility and adaptive response to bile salts in *Propionibacterium freudenreichii*: physiological and proteomic analysis." Applied and Environmental Microbiology **69**(7): 3809-3818.

Levri, K., K. Ketvertis, M. Deramo, J. Merenstein and F. D'Amico (2005). "Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review." The Journal of Family Practice **54**(7): 613-620.

Ley, R., F. Bäckhed, T. P. C. Lozupone, R. Knight and J. Gordon (2005). "Obesity alters gut microbial ecology." Proceedings of the National Academy of Sciences **102**(31): 11070-11075.

Li, C., J.-L. Zhao, Y.-T. Wang, X. Han and N. Liu (2009). "Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions." World Journal of Microbiology and Biotechnology **25**(9): 1659-1665.

Lilly, D. M. and R. H. Stillwell (1965). "Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms." Science **147**(3659): 747-748.

Lin, M. Y. and F. J. Chang (2000). "Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356." Digestive Diseases Sciences **45**(8): 1617-22.

Lin, M. Y. and C. L. Yen (1999). "Reactive oxygen species and lipid peroxidation product-scavenging ability of yogurt organisms." Journal of Dairy Science **82**(8): 1629-1634.

Lin, Y. C., C. N. M. Agbanyim, R. J. Miles, R. A. J. Nicholas, D. P. Kelly and A. P. Wood (2008). "Tetrazolium reduction methods for assessment of substrate oxidation and strain differentiation among mycoplasmas, with particular reference to *Mycoplasma bovigenitalium* and some members of the *Mycoplasma mycoides* cluster." Journal of Applied Microbiology **105**(2): 492-501.

Lindberg, E., I. Adlerberth, B. Hesselmar, R. Saalman, I.-L. Strannegard, N. Aberg and A. E. Wold (2004). "High rate of transfer of *Staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora." Journal of Clinical Microbiology **42**(2): 530-534.

Lourens-Hattingh, A. and B. C. Viljoen (2001). "Yogurt as probiotic carrier food." International Dairy Journal **11**(1-2): 1-17.

Lund, B. M., M. R. Knox and A. P. Sims (1984). "The effect of oxygen and redox potential on growth of *Clostridium botulinum* type E from a spore inoculum." Food Microbiology **1**: 277-287.

- Mackie, R. I., A. Sghir and H. R. Gaskins (1999). "Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract." American Journal of Clinical Nutrition **69**(5): 1035S-1045.
- Mallon, P. T., D. McKay, S. J. Kirk and K. Gardiner (2007). "Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis." Cochrane Database of Systematic Reviews **CD005573**.
- Margolles, A., A. B. Florez, J. A. Moreno, D. van Sinderen and C. G. de los Reyes-Gavilan (2006). "Two membrane proteins from *Bifidobacterium breve* UCC2003 constitute an ABC-type multidrug transporter." Microbiology **152**(12): 3497-3505.
- Margolles, A., L. Garcia, B. Sanchez, M. Gueimonde and C. G. de los Reyes-Gavilan (2003). "Characterisation of a *Bifidobacterium* strain with acquired resistance to cholerae--A preliminary study." International Journal of Food Microbiology **82**(2): 191-198.
- Marshall, V. M. (1992). "Inoculated ecosystems in a milk environment." Journal of Applied Bacteriology **73**: 127S-135S.
- Martarelli, D., M. Verdenelli, S. Scuri, M. Cocchioni, S. Silvi, C. Cecchini and P. Pompei (2011). "Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training." Current Microbiology **62**(6): 1689-1696.
- Marteau, P. and F. Shanahan (2003). "Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects." Best Practice & Research Clinical Gastroenterology **17**(5): 725-740.
- Martin, F. (2009). Impact du potentiel d'oxydoréduction et du bullage de gaz sur les propriétés rhéologiques, la microstructure et les arômes endogènes de gels laitiers acidifiés par les bactéries lactiques ou la glucono- δ -lactone, University of Burgundy, France. **PhD Thesis**.
- Martin, F., R. Cachon, K. Pernin, J. De Coninck, P. Gervais, E. Guichard and N. Cayot (2011). "Effect of oxidoreduction potential on aroma biosynthesis by lactic acid bacteria in nonfat yogurt." Journal of Dairy Science **94**(2): 614-622.
- Martin, F., N. Cayot, C. Vergoignan, L. Journaux, P. Gervais and R. Cachon (2010). "Impact of oxidoreduction potential and of gas bubbling on rheological properties of non-fat yoghurt." Food Research International **43**(1): 218-223.
- Marty-Teyssset, C., F. de la Torre and J. R. Garel (2000). "Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress." Applied and Environmental Microbiology **66**(1): 262-267.
- Masco, L., C. Crockaert, K. V. Hoorde, J. Swings and G. Huys (2007). "In Vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product Isolates of *Bifidobacterium*." Journal of dairy science **90**(8): 3572-3578.
- Matsumoto, M., H. Ohishi and Y. Benno (2004). "H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance." International Journal of Food Microbiology **93**(1): 109-113.
- Matto, J., H.-L. Alakomi, A. Vaari, I. Virkajarvi and M. Saarela (2006). "Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it." International Dairy Journal **16**(9): 1029-1037.
- Maus, J. E. and S. C. Ingham (2003). "Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria." Journal of Applied Microbiology **95**(1): 146-154.
- Mazur, A., F. Nassir, E. Gueux, C. Moundras, J. Bellanger, P. Grolier, E. Rock and Y. Rayssiguier (1996). "Diets deficient in selenium and vitamin E affect plasma lipoprotein and apolipoprotein concentrations in the rat." The British journal of nutrition **76**(6): 899-907.

McFarland, L. V. (2007). "Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea." Travel Medicine and Infectious Disease 5(2): 97-105.

McFarland, L. V. and S. Dublin (2008). "Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome." World journal of gastroenterology 14: 2650-2661.

McFarland, L. V., G. W. Elmer and M. McFarland (2006). "Meta-analysis of probiotics for the prevention and treatment of acute pediatric diarrhea." International Journal of Probiotics and Prebiotics 1(1): 63-76.

McLean, J. S., G. E. Pinchuk, O. V. Geydebrekht, C. L. Bilskis, B. A. Zakrajsek, E. A. Hill, D. A. Saffarini, M. F. Romine, Y. A. Gorby, J. K. Fredrickson and A. S. Beliaev (2008). "Oxygen-dependent autoaggregation in *Shewanella oneidensis* MR-1." Environmental Microbiology 10(7): 1861-1876.

Medard (2002). Encyclopédie des gaz de l'air liquide 3rd ed. Amsterdam, The Netherlands, Lavoisier.

Metchnikoff, E. (1907). The prolongation of life, William Heinemann, London, UK.

Michelon, D. (2010). Compréhension et caractérisation des mécanismes physiologiques impliqués dans l'activité réductrice de *Lactococcus lactis*., University of Burgundy, France. **PhD thesis**.

Michelon, D., S. Abraham, B. Ebel, J. D. Coninck, F. Husson, G. Feron, P. Gervais and R. Cachon (2010). "Contribution of exofacial thiol groups in the reducing activity of *Lactococcus* ssp. *lactis*." FEBS Journal 277(10): 2282-2290.

Michelon, D., S. Tachon, B. Ebel, J. De Coninck, G. Feron, P. Gervais, M. Yvon and R. Cachon "Use of tetrazolium salts reduction to screen lactic acid bacteria for their reducing capacity." En soumission.

Mikelsaar, M. and M. Zilmer (2009). "*Lactobacillus fermentum* ME-3 - an antimicrobial and antioxidative probiotic." Microb Ecol Health Dis 21(1): 1-27.

Miller, C. W., M. H. Nguyen, M. Rooney and K. Kailasapathy (2002). "The influence of packaging materials on the dissolved oxygen content of probiotic yoghurt." Packaging Technology and Science 15(3): 133-138.

Miller, C. W., M. H. Nguyen, M. Rooney and K. Kailasapathy (2003). "The control of dissolved oxygen content in probiotic yoghurts by alternative packaging materials." Packaging Technology and Science 16(2): 61-67.

Mills, S. C., A. C. Windsor and S. C. Knight (2005). "The potential interactions between polyunsaturated fatty acids and colonic inflammatory processes." Clinical & Experimental Immunology 142(2): 216-228.

Miyoshi, A., T. Rochat, J. J. Gratadoux, Y. Le Loir, S. C. Oliveira, P. Langella and V. Azevedo (2003). "Oxidative stress in *Lactococcus lactis*." Genetics and Molecular Research 2(4): 348-359.

Moayyedi, P., A. C. Ford, N. J. Talley, F. Cremonini, A. E. Foxx-Orenstein, L. J. Brandt and E. M. M. Quigley (2010). "The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review." Gut 59(3): 325-332.

Monnet, C., P. Schmitt and C. Divies (1994). "Method for assaying volatile compounds by headspace gas chromatography and application to growing starter cultures." Journal of Dairy Science 77(7): 1809-1815.

Moody, C. S. and H. M. Hassan (1982). "Mutagenicity of oxygen free radicals." Proceedings of the National Academy of Sciences 79(9): 2855-2859.

Moreton, R. S. (1998). Fermented milk product. Switzerland, Société des produits Nestlé S.A. **WO/1998/027824**.

Moroni, O. (2007). Contribution à l'étude des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections entériques à *Listeria monocytogenes* : analyse in vitro et étude in vivo des mécanismes d'action antimicrobien. University of Laval, Canada. **PhD Thesis**.

- Morrison, W. R. and L. M. Smith (1964). "Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol." Journal of Lipid Research **5**(4): 600-608.
- Mortazavian, A. M., M. R. Ehsani, S. M. Mousavi, J. A. Reinheimer, Z. Emamdjomeh, S. Sohrabvandi and K. Rezaei (2006). "Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment and incubation temperature on the viability of the probiotic micro-organisms in freshly made yogurt." International Journal of Dairy Technology **59**(1): 8-11.
- Mortazavian, A. M., M. R. Ehsani, S. M. Mousavi, K. Rezaei, S. Sohrabvandi and J. A. Reinheimer (2007). "Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt." International Journal of Dairy Technology **60**(2): 123-127.
- Muller, J. A., R. P. Ross, G. Fitzgerald and C. Stanton (2009). Manufacture of probiotic bacteria. Prebiotics and probiotics science and technology. New York, USA, Springer Science.
- Murga, M. L. F., G. M. Cabrera, G. F. De Valdez, A. Disalvo and A. M. Seldes (2000). "Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*." Journal of Applied Microbiology **88**(2): 342-348.
- Neijssel, O. M., J. L. Snoep and M. J. Teixeira de Mattos (1997). "Regulation of energy source metabolism in streptococci." Journal of Applied Microbiology **83**(S1): 12S-19S.
- Nikfar, S., R. Rahimi, F. Rahimi, S. Derakhshani and M. Abdollahi (2008). "Efficacy of probiotics in irritable bowel syndrome: a meta-analysis of randomized, controlled trials." Diseases of the Colon & Rectum **51**(12): 1775-1780.
- Noriega, L., M. Gueimonde, B. Sanchez, A. Margolles and C. G. de los Reyes-Gavilan (2004). "Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*." International Journal of Food Microbiology **94**(1): 79-86.
- Nowrouzian, F., B. Hesselmar, R. Saalman, I. Strannegard, N. Aberg, A. Wold and I. Adlerberth (2003). "Escherichia coli in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage." Pediatric Research **54**: 8-14.
- O'Brien, J., I. Wilson, T. Orton and F. Pognan (2000). "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity." European Journal of Biochemistry **267**(17): 5421-5426.
- Oblinger, J. L. and A. A. Kraft (1973). "Oxidation-reduction potential and growth of *Salmonella* and *Pseudomonas fluorescens*." Journal of Food Science **38**(7): 1108-1112.
- Oh, D. K., S. Y. Kim and J. H. Kim (1998). "Increase of xylitol production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*." Biotechnology and Bioengineering **58**(4): 440-444.
- Oktyabrsky, O. N. and G. V. Smirnova (1988). "Changes in the redox potential and the number of accessible sulfhydryl groups in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* cultures during transient processes." Biokhimiya **53**(12): 2042-2050.
- Olive, P. L. and J. P. Banath (2006). "The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells." Nature Protocols **1**(1): 23-29.
- Orla-Jensen, S. (1924). "La classification des bactéries lactiques. ." Lait **4**(468-474).
- Osborn, D. A. and J. K. Sinn (2007). "Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity." Cochrane Database of Systematic Reviews **4**.
- Ott, A., J.-E. Germond, M. Baumgartner and A. Chaintreau (1999). "Aroma comparisons of traditional and mild yogurts: headspace gas chromatography quantification of volatiles and origin of α -diketones." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(6): 2379-2385.

- Ouvry, A., Y. Waché, R. Tourdot-Maréchal, C. Diviès and R. Cachon (2002). "Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*." FEMS Microbiology Letters **214**(2): 257-261.
- Ouwehand, A. C. and S. Vesterlund (2003). "Health aspects of probiotics." Drugs **6**: 573-580.
- Park, S. and J. A. Imlay (2003). "High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction." J Bacteriol **185**(6): 1942-50.
- Pastorelli, G., R. Rossi, S. Cannata and C. Corino (2010). "Total antiradical activity in male castrated piglets blood: reference values." Italian Journal of Animal Science **8**.
- Patsoukis, N. and C. Georgiou (2004). "Determination of the thiol redox state of organisms: new oxidative stress indicators." Analytical and Bioanalytical Chemistry **378**: 1783-1792.
- Pearson, C. B. and H. W. Walker (1976). "Effect of oxidation-reduction potential upon growth and sporulation of *Clostridium perfringens*." Journal of Milk and Food Technology **39**(6): 421-425.
- Penfold, D. W., C. F. Forster and L. E. Macaskie (2003). "Increased hydrogen production by *Escherichia coli* strain HD701 in comparison with the wild-type parent strain MC4100." Enzyme and Microbial Technology **33**(2-3): 185-189.
- Perez, P. F., J. Dore, M. Leclerc, F. Levenez, J. Benyacoub, P. Serrant, I. Segura-Roggero, E. J. Schiffrin and A. Donnet-Hughes (2007). "Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells?" Pediatrics **119**(3): e724-732.
- Pesakhov, S., R. Benisty, N. Sikron, Z. Cohen, P. Gomelsky, I. Khozin-Goldberg, R. Dagan and N. Porat (2007). "Effect of hydrogen peroxide production and the Fenton reaction on membrane composition of *Streptococcus pneumoniae*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1768**(3): 590-597.
- Petrov, V. V., V. V. Smirnova and L. A. Okorokov (1992). "Mercaptoethanol and dithiothreitol decrease the difference of electrochemical proton potentials across the yeast plasma and vacuolar membranes and activate their H⁺-ATPases." Yeast **8**(8): 589-598.
- Petrovic, O., P. Knezevic, J. Markovic and S. Roncevic (2008). "Screening method for detection of hydrocarbon-oxidizing bacteria in oil-contaminated water and soil specimen." Journal of Microbiological Methods **74**: 110-113.
- Picque, D., B. Perret, E. Latrille and G. Corrieu (1992). "Characterisation and classification of lactic acid bacteria based on the acidification kinetic." Lebensmittel Wissenschaft und Technologie **25**: 181-186.
- Pihlanto, A. (2006). "Antioxidative peptides derived from milk proteins." International Dairy Journal **16**(11): 1306-1314.
- Plihon, F., P. Taillandier and P. Strehaiano (1995). "Oxygen effect on batch cultures of *Leuconostoc mesenteroides*: relationship between oxygen uptake, growth and end-products." Applied Microbiology and Biotechnology **43**(1): 117-122.
- Price, C. E., S. J. Reid, A. J. M. Driessen and V. R. Abratt (2006). "The *Bifidobacterium longum* NCIMB 702259T ctr gene codes for a novel cholate transporter." Applied and Environmental Microbiology **72**(1): 923-926.
- Prost, M. (1992). Process for the determination by means of free radicals of the antioxidant properties of a living organism or potentially aggressive agents. **US patent 5135850**.
- Rastall, R. A. (2004). "Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance." Journal of Nutrition **134**(8): 2022-2026.

Rault, A., C. Béal, S. Ghorbal, J.-C. Ogier and M. Bouix (2007). "Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage." Cryobiology **55**(1): 35-43.

Riondet, C. (1999). Effet du potentiel d'oxydoréduction et du pH sur le métabolisme de *Escherichia coli*: rôle de ces paramètres sur la force proton motrice, sur la survie au choc thermique et sur l'orientation des flux de carbone., University of Burgundy, France. **PhD Thesis**.

Riondet, C., R. Cachon, Y. Waché, G. Alcaraz and C. Diviès (1999). "Changes in the proton-motive force in *Escherichia coli* in response to external oxidoreduction potential." European Journal of Biochemistry **262**(2): 595-599.

Rödel, W. and R. Scheuer (2000). "Redox potential of meat and meat products. IV. Recording criteria of quality in meat and meat products by measuring the redox potential." Fleischwirtschaft International **2**: 46-48.

Rodriguez, G. G., D. Phipps, K. Ishiguro and H. F. Ridgway (1992). "Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria." Applied and Environmental Microbiology **58**(6): 1801-1808.

Rolfe, V. E., P. J. Fortun, C. J. Hawkey and F. Bath-Hextall (2006). "Probiotics for maintenance of remission in Crohn's disease." Cochrane Database of Systematic Reviews **CD004826**.

Rosenberg, M., D. Gutnick and E. Rosenberg (1980). "Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity." FEMS Microbiology Letters **9**(1): 29-33.

Ruas-Madiedo, P., M. Gueimonde, F. Arigoni, C. G. de los Reyes-Gavilan and A. Margolles (2009). "Bile affects the synthesis of exopolysaccharides by *Bifidobacterium animalis*." Applied and Environmental Microbiology **75**(4): 1204-1207.

Ruas-Madiedo, P., A. Hernandez-Barranco, A. Margolles and C. G. de los Reyes-Gavilan (2005). "A Bile salt-resistant derivative of *Bifidobacterium animalis* has an altered fermentation pattern when grown on glucose and maltose." Applied and Environmental Microbiology **71**(11): 6564-6570.

Ruiz, L., B. Sánchez, P. Ruas-Madiedo, C. G. De Los Reyes-Gavilán and A. Margolles (2007). "Cell envelope changes in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* as a response to bile." FEMS Microbiology Letters **274**(2): 316-322.

Saarela, M., G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto and T. Mattila-Sandholm (2000). "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties." Journal of Biotechnology **84**(3): 197-215.

Saarela, M., M. Rantala, K. Hallamaa, L. Nohynek, I. Virkajärvi and J. Mäntö (2004). "Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria." Journal of Applied Microbiology **96**(6): 1205-1214.

Saide, J. A. O. and S. E. Gilliland (2005). "Antioxidative activity of *Lactobacilli* measured by oxygen radical absorbance capacity." Journal of Dairy Science **88**(4): 1352-1357.

Salama, M. S., W. E. Sandine and S. J. Giovannoni (1995). "A milk-based method for detecting antimicrobial substances produced by lactic acid bacteria." Journal of Dairy Science **78**(6): 1219-1223.

Samelis, J., J. S. Ikeda and J. N. Sofos (2003). "Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7." Journal of Applied Microbiology **95**(3): 563-575.

Sanchez, B., M.-C. Champomier-Verges, P. Anglade, F. Baraige, C. G. de los Reyes-Gavilan, A. Margolles and M. Zagorec (2005). "Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809." Journal of Bacteriology **187**(16): 5799-5808.

Sanchez, B., M.-C. Champomier-Vergès, M. C. Collado, P. Anglade, F. Baraige, Y. Sanz, C. G. de los Reyes-Gavilán, A. Margolles and M. Zagorec (2007a). "Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype *longum*." Applied and Environmental Microbiology **73**(20): 6450-6459.

Sanchez, B., M.-C. Champomier-Verges, B. Stuer-Lauridsen, P. Ruas-Madiedo, P. Anglade, F. Baraige, C. G. de los Reyes-Gavilan, E. Johansen, M. Zagorec and A. Margolles (2007b). "Adaptation and response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to bile: a proteomic and physiological approach." Applied and Environmental Microbiology **73**(21): 6757-6767.

Sanchez, B., C. G. De Los Reyes-Gavilán and A. Margolles (2006). "The F1F0-ATPase of *Bifidobacterium animalis* is involved in bile tolerance." Environmental Microbiology **8**(10): 1825-1833.

Sanchez, B., L. Ruiz, C. G. de los Reyes-Gavilan and A. Margolles (2008). "Proteomics of stress response in *Bifidobacterium* " Frontiers in Bioscience **13**: 6905-6919.

Sanders, J. W., G. Venema and J. Kok (1999). "Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*." FEMS Microbiology Reviews **23**(4): 483-501.

Sanz, Y. (2007). "Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains." International Dairy Journal **17**(11): 1284-1289.

Savijoki, K., A. Suokko, A. Palva, L. Valmu, N. Kalkkinen and P. Varmanen (2005). "Effect of heat-shock and bile salts on protein synthesis of *Bifidobacterium longum* revealed by [³⁵S]methionine labelling and two-dimensional gel electrophoresis." FEMS Microbiology Letters **248**(2): 207-215.

Saxena, S. N., B. K. Mital and S. K. Garg (1994). "Effect of casitone and fructose on the growth of *Lactobacillus acidophilus* and its survival during storage." International Journal of Food Microbiology **21**(3): 271-276.

Schell, M. A., M. Karmirantzou, B. Snel, D. Vilanova, B. Berger, G. Pessi, M.-C. Zwahlen, F. Desiere, P. Bork, M. Delley, R. D. Pridmore and F. Arigoni (2002). "The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(22): 14422-14427.

Schreyer, A. (2007). Régulation électrochimique du potentiel d'oxydoréduction du lait : Impact des composantes du lait et effet sur sa résistance à l'oxydation après traitement, University of Laval. **PhD Thesis**.

Shah, N. P. and W. E. V. Lankaputhra (1997). "Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt." International Dairy Journal **7**(5): 349-356.

Shanahan, F. (2002). "The host-microbe interface within the gut." Best Practice & Research Clinical Gastroenterology **16**(6): 915-931.

Shimamura, S., F. Abe, N. Ishibashi, H. Miyakawa, T. Yaeshima, T. Araya and M. Tomita (1992). "Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species." Journal of Dairy Science **75**(12): 3296-3306.

Simonin, H., L. Beney and P. Gervais (2008). "Controlling the membrane fluidity of yeasts during coupled thermal and osmotic treatments." Biotechnology and Bioengineering **100**(2): 325-333.

Simpson, P. J., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald and C. Stanton (2004). "*Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **54**(2): 401-406.

Simpson, P. J., C. Stanton, G. F. Fitzgerald and R. P. Ross (2005). "Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage." Journal of Applied Microbiology **99**(3): 493-501.

Sinensky, M. (1974). "Homeoviscous adaptation - A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences **71**(2): 522-525.

Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." Experimental Cell Research **175**(1): 184-191.

- Smoot, L. A. and M. D. Pierson (1979). "Effect of oxidation-reduction potential on the outgrowth and chemical inhibition of *Clostridium botulinum* 10755A spores." Journal of Food Science **44**(3): 700-704.
- Sollod, C. C., A. E. Jenns and M. E. Daub (1992). "Cell surface redox potential as a mechanism of defense against photosensitizers in fungi." Applied and Environmental Microbiology **58**(2): 444-449.
- Songisepp, E., J. Kals, T. Kullisaar, R. Mandar, P. Hutt, M. Zilmer and M. Mikelsaar (2005). "Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers." Nutrition Journal **4**(1): 22.
- Songisepp, E., T. Kullisaar, P. Hutt, P. Elias, T. Brilene, M. Zilmer and M. Mikelsaar (2004). "A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity." Journal of Dairy Science **87**(7): 2017-2023.
- Spinnler, H. and G. Corrieu (1989). "Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement." Journal of Dairy Research **56**(05): 755-764.
- Srinivasan, P., K. E. Sabitha and C. S. Shyamaladevi (2004). "Therapeutic efficacy of green tea polyphenols on cellular thiols in 4-Nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis." Chemico-Biological Interactions **149**(2-3): 81-87.
- Stappenbeck, T. S., L. V. Hooper and J. I. Gordon (2002). "Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(24): 15451-15455.
- Suetsuna, K., H. Ukeda and H. Ochi (2000). "Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein." The Journal of Nutritional Biochemistry **11**(3): 128-131.
- Suzuki, M., M. Kamei, H. Itabe, K. Yoneda, H. Bando, N. Kume and Y. Tano (2007). "Oxidized phospholipids in the macula increase with age and in eyes with age-related macular degeneration." Molecular Vision **13**: 772-778.
- Szajewska, H., P. Albrecht and A. Topczewska-Cabane (2009). "Randomized, double-blind, placebo-controlled trial: effect of *Lactobacillus GG* supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during treatment in children." Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition **48**(4): 431-436.
- Tabatabai, L. B. and H. W. Walker (1970). "Oxidation-reduction potential and growth of *Clostridium perfringens* and *Pseudomonas fluorescens*." Applied and Environmental Microbiology **20**: 441-446.
- Tachon, S., D. Michelon, E. Chambellon, M. Cantonnet, C. Mezange, L. Henno, R. Cachon and M. Yvon (2009). "Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*." Microbiology **155**(9): 2941-2948.
- Takahashi, N., J. Z. Xiao, K. Miyaji and K. Iwatsuki (2007). "H⁺-ATPase in the acid tolerance of *Bifidobacterium longum*." Milchwissenschaft **62**: 151-153.
- Talwalkar, A. and K. Kailasapathy (2003). "Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen." Journal of Dairy Science **86**(8): 2537-2546.
- Talwalkar, A. and K. Kailasapathy (2004a). "Oxidative stress adaptation of probiotic bacteria." Milchwissenschaft **59**(3-4): 140-143.
- Talwalkar, A. and K. Kailasapathy (2004b). "A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **3**(3): 117-124.
- Talwalkar, A. and K. Kailasapathy (2004c). "The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. Acidophilus* and *Bifidobacterium* spp." Current Issues in Intestinal Microbiology **5**: 1-8.
- Talwalkar, A., C. W. Miller, K. Kailasapathy and M. H. Nguyen (2004). "Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt." International Journal of Food Science & Technology **39**(6): 605-611.

- Tamine, A. Y. and R. K. Robinson (1999). Yoghurt: Science and Technology. Washington DC, CRC Press.
- Taranto, M. P., G. Perez-Martinez and G. Font de Valdez (2006). "Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration." Research in Microbiology **157**(8): 720-725.
- Teemu, H., S. Seppo, M. Jussi, T. Raija and L. Kalle (2008). "Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria." International Journal of Food Microbiology **125**(2): 170-5.
- Teixeira, H., M. G. Goncalves, N. Rozes, A. Ramos and M. V. San Romao (2002). "Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: A response to ethanol stress?" Microbial Ecology **43**(1): 146-153.
- Tengerdy, R. (1961). "Redox potential changes in the 2-keto-L-gluconic acid fermentation. I. Correlation between redox potential and dissolved – oxygen concentration." Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering **3**: 241-253.
- Tissier, H. (1900). *Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (Etat normal et pathologique)*. Paris, Université de Paris: 253.
- Tong, J. L., Z. H. Ran, J. Shen, C. X. Zhang and S. D. Xiao (2007). "Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy." Alimentary Pharmacology & Therapeutics **25**(2): 155-168.
- Topcu, A., I. McKinnon and P. McSweeney (2008). "Measurement of the oxidation-reduction potential of cheddar cheese." Journal of Food Science **73**: 198-203.
- Torres, M. A., J. D. G. Jones and J. L. Dangl (2006). "Reactive oxygen species signaling in response to pathogens." Plant Physiology **141**(2): 373-378.
- Tratnyek, P. G., T. E. Reilkoff, A. W. Lemon, M. M. Scherer, B. A. Balko, L. M. Feik and B. D. Henegar (2001). "Visualizing Redox Chemistry: Probing Environmental Oxidation–Reduction Reactions with Indicator Dyes." The Chemical Educator **6**(3): 172-179.
- Trindade, C. and C. Grosso (2000). "The effect of the immobilisation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions." Milchwissenschaft **55**(9): 496-499.
- Truusalu, K., R.-H. Mikelsaar, P. Naaber, T. Karki, T. Kullisaar, M. Zilmer and M. Mikelsaar (2008). "Eradication of *Salmonella* Typhimurium infection in a murine model of typhoid fever with the combination of probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3 and ofloxacin." BMC Microbiology **8**(1): 132.
- Truusalu, K., P. Naaber, T. Kullisaar, H. Tamm, R.-H. Mikelsaar, K. Zilmer, A. Rehema, M. Zilmer and M. Mikelsaar (2004). "The influence of antibacterial and antioxidative probiotic lactobacilli on gut mucosa in a mouse model of *Salmonella* infection." Microbial Ecology in Health and Disease **16**: 180-187.
- Tsukatani, T., T. Higuchi, H. Suenaga, T. Akao, M. Ishiyama, T. Ezoe and K. Matsumoto (2009). "Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances." Analytical Biochemistry **393**(1): 117-125.
- Tsukatani, T., H. Suenaga, T. Higuchi, T. Akao, M. Ishiyama, K. Ezoe and K. Matsumoto (2008). "Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts." Journal of Microbiological Methods **75**(1): 109-116.
- Turroni, F., F. Bottacini, E. Foroni, I. Mulder, J.-H. Kim, A. Zomer, B. Sánchez, A. Bidossi, A. Ferrarini, V. Giubellini, M. Delledonne, B. Henrissat, P. Coutinho, M. Oggioni, G. F. Fitzgerald, D. Mills, A. Margolles, D. Kelly, D. van Sinderen and M. Ventura (2010). "Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(45): 19514-19519.

- Van Boekel, M. A. J. S. (1998). "Effect of heating on Maillard reactions in milk." Food Chemistry **62**(4): 403-414.
- van de Guchte, M., P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvina, S. Ehrlich and E. Maguin (2002). "Stress responses in lactic acid bacteria." Antonie van Leeuwenhoek **82**(1): 187-216.
- Vanysek, P. (1994). Handbook of chemistry and physics. London, England, CRC Press.
- Varnam, A. H. and J. P. Sutherland (1994). Milk and milk products. London, Chapman and Hall.
- Vaughan, E. E., H. G. H. J. Heilig, E. G. Zoetendal, R. Satokari, J. K. Collins, A. D. L. Akkermans and W. M. de Vos (1999). "Molecular approaches to study probiotic bacteria." Trends in Food Science & Technology **10**(12): 400-404.
- Veld, G. I. t., A. J. M. Driessen and W. N. Konings (1993). "Bacterial solute transport proteins in their lipid environment." FEMS Microbiology Reviews **12**(4): 293-314.
- Ventura, M., D. van Sinderen, G. F. Fitzgerald and R. Zink (2004). "Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria." Antonie van Leeuwenhoek **86**(3): 205-223.
- Verdenelli, M., M. Ricciutielli, F. Gigli, G. Cenci, F. Trotta, G. Caldini, A. Cresci and C. Orpianesi (2010). "Investigation of the antigenotoxic properties of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 by gas chromatography-mass spectrometry." Italian Journal of Food Science **22**(4): 473-478.
- Vernazza, C. L., G. R. Gibson and R. A. Rastall (2006). "Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*." Journal of Applied Microbiology **100**(4): 846-853.
- Vesa, T., P. Pochart and P. Marteau (2000). "Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract." Alimentary Pharmacology & Therapeutics **14**: 823-828.
- Vincent, H. K., K. E. Innes and K. R. Vincent (2007). "Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity." Diabetes, Obesity and Metabolism **9**(6): 813-839.
- Vliagoftis, H., V. D. Kouranos, G. I. Betsi and M. E. Falagas (2008). "Probiotics for the treatment of allergic rhinitis and asthma: systematic review of randomized controlled trials." Annals of Allergy, Asthma and Immunology **101**(6): 570-579.
- Waché, Y., C. Riondet, C. Divies and R. Cachon (2002). "Effect of reducing agents on the acidification capacity and the proton motive force of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* resting cells." Bioelectrochemistry **57**(2): 113-118.
- Wang, Y.-C., R.-C. Yu and C.-C. Chou (2006). "Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria." Food Microbiology **23**(2): 128-135.
- Warner, J. O. (2003). "The Hygiene Hypothesis." Pediatric Allergy and Immunology **14**(3): 145-146.
- Watanabe, M., S. van der Veen, H. Nakajima and T. Abee (2012). "Effect of respiration and manganese on oxidative stress resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFS1." Microbiology **158**(1): 293-300.
- Wendakoon, C. N., A. B. R. Thomson and L. Ozimek (2002). "Lack of therapeutic effect of a specially designed yogurt for the eradication of *Helicobacter pylori* Infection." Digestion **65**(1): 16-20.
- Wilson, M. (2008). Bacteriology of Humans. London, Blackwell Publishing Ltd.
- Winpenny, J. W. T. (1969). "The effect of E_h on regulatory processes in facultative anaerobes." Biotechnology and Bioengineering **11**: 623-629.
- Witztum, J. L. (1994). "The oxidation hypothesis of atherosclerosis." The Lancet **344**(8925): 793-795.

Yang, H.-L., S.-C. Chen, N.-W. Chang, J.-M. Chang, M.-L. Lee, P.-C. Tsai, H.-H. Fu, W.-W. Kao, H.-C. Chiang, H.-H. Wang and Y.-C. Hseu (2006). "Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes." Food and Chemical Toxicology **44**(9): 1513-1521.

Yaylayan, V. A., L. Haffenden, F. L. Chu and A. Wnorowski (2005). "Oxidative pyrolysis and postpyrolytic derivatization techniques for the total analysis of Maillard model systems: investigation of control parameters of Maillard reaction pathways." Annals of the New York Academy of Sciences **1043**(1): 41-54.

Zhang, J., R.-Y. Fu, J. Hugenholtz, Y. Li and J. Chen (2007). "Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress." Applied and Environmental Microbiology **73**(16): 5268-5275.

Zhao, X.-h. and D. Li (2008). "A new approach to eliminate stress for two probiotics with chemicals in vitro." European Food Research and Technology **227**(5): 1569-1574.

Zhurina, D., A. Zomer, M. Gleinser, V. F. Brancaccio, M. Auchter, M. S. Waidmann, C. Westermann, D. van Sinderen and C. U. Riedel (2011). "Complete genome sequence of *Bifidobacterium bifidum* S17." Journal of Bacteriology **193**(1): 301-302.

Zulueta, A., M. J. Esteve and A. FrÃ-gola (2009). "ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products." Food Chemistry **114**(1): 310-316.