

## **Nouvelles stratégies de stabilisation des bactéries extrêmement sensibles à l’oxygène: Cas du probiotique *Faecalibacterium prausnitzii***

Sébastien Dupont, Cyril Iaconelli, Christian Caliri, Alexandre Charriau, Patrick Gervais Odile Chambin, Laurent Beney

UMR PAM, Univ. Bourgogne Franche-Comté – AgroSup Dijon  
1 Esplanade Erasme – 21000 Dijon

### **Résumé**

Les bactéries intestinales suscitent un intérêt croissant dans les domaines de la santé et du bien-être [1, 2]. L'écosystème intestinal est caractérisé par sa composition complexe et sa très faible teneur en oxygène. De ce fait, de nombreuses espèces bactériennes isolées de cet environnement présentent une sensibilité extrême à l'oxygène. Cette particularité est à l'origine de la difficulté de mise en œuvre de ces microorganismes dans le cadre d'applications probiotiques à grande échelle, notamment au cours du procédé de fabrication et de leur conservation.

Dans cette communication, nous présentons les principales étapes qui ont été franchies en vue de conserver et de concevoir une stratégie de stabilisation/protection de la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii*, reconnue pour ses activités anti-inflammatoires intestinales et ses effets bénéfiques sur la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique [3]. Le premier objectif a été de concevoir un milieu et des conditions optimisées pour stabiliser la bactérie à l'état sec, sous forme de poudre, avec un taux de survie élevé (FUI FPARIS). En effet, les procédés de stabilisation par déshydratation sont à l'origine de contraintes mécaniques et oxydatives [4] pouvant altérer la viabilité et la fonctionnalité des cellules [5]. Le deuxième objectif est de développer un protocole de protection spécifique permettant la conservation du probiotique sous une forme sèche (microgranules ou capsules) et de maintenir la viabilité au cours du passage dans le tractus gastro-intestinal. L'encapsulation a été envisagée puisque cette technique permet la protection de molécules ou de cellules contre des perturbations environnementales diverses [6-8].

Nous avons testé deux types d'encapsulation et estimé la viabilité des bactéries au cours de la fabrication ainsi qu'après différents stress mimant les conditions intestinales. Le premier consistait en l'intégration des bactéries dans des billes de pectines (pectine amidée (DA =20-24%) et faiblement méthylée (DE = 22-28%), Unipectine® 305C – Cargill) obtenues par gélification ionique avec du chlorure de calcium puis ensuite lyophilisées. Dans le second type, les bactéries étaient d'abord lyophilisées puis incluses dans une base lipidique à bas

point de fusion (Gélucire® 43/01 – Gattefossé avec une Température de fusion : 43°C et un HLB = 1).

Ces deux techniques permettent d'augmenter les taux de survie aux conditions générées par le tractus gastro-intestinal, notamment lors du passage au travers de l'estomac et du jéjunum. En effet, en l'absence d'encapsulation, le passage des bactéries au travers de ces deux compartiments conduit à la perte de la totalité de la population bactérienne initiale. L'encapsulation permet à une partie des bactéries de résister à l'ensemble des compartiments du tractus. Cette partie est plus importante dans le cas de l'encapsulation avec le Gélucire® 43/01.

L'effet bénéfique des probiotiques étant relié à une viabilité et une fonctionnalité de ces bactéries, l'encapsulation représente donc une technique prometteuse dans le cadre de l'utilisation de bactéries probiotiques sensibles à l'oxygène. Des développements futurs sont actuellement en cours dans l'UMR PAM afin d'optimiser les procédés de fabrication.

**Mots-clés** : Probiotiques, préservation, anaérobie, encapsulation, tractus gastro-intestinal.

## **Références**

1. Ebel, B., G. Lemetais, L. Beney, R. Cachon, H. Sokol, P. Langella, and P. Gervais, *Impact of probiotics on risk factors for cardiovascular diseases. A review*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2014. **54**(2): p. 175-89.
2. Miquel, S., et al., *Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health*. Curr Opin Microbiol, 2013. **16**(3): p. 255-61.
3. Sokol, H., et al., *Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16731-6.
4. Dupont, S., A. Rapoport, P. Gervais, and L. Beney, *Survival kit of Saccharomyces cerevisiae for anhydrobiosis*. Appl Microbiol Biotechnol, 2014. **98**(21): p. 8821-34.
5. Iaconelli, C., et al., *Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities*. J Biotechnol, 2015. **214**: p. 17-26.
6. Chambin, O., G. Dupuis, D. Champion, A. Voilley, and Y. Pourcelot, *Colon-specific drug delivery: Influence of solution reticulation properties upon pectin beads performance*. Int J Pharm, 2006. **321**(1-2): p. 86-93.
7. Dhalleine, C., A. Assifaoui, B. Moulari, Y. Pellequer, P. Cayot, A. Lamprecht, and O. Chambin, *Zinc-pectinate beads as an in vivo self-assembling system for pulsatile drug delivery*. Int J Pharm, 2011. **414**(1-2): p. 28-34.
8. Martin-Dejardin, F., B. Ebel, G. Lemetais, H. Nguyen Thi Minh, P. Gervais, R. Cachon, and O. Chambin, *A way to follow the viability of encapsulated Bifidobacterium bifidum subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: interest of flow cytometry*. Eur J Pharm Sci, 2013. **49**(2): p. 166-74.

## **Development of different encapsulation strategies to stabilize extremely oxygen-sensitive bacteria:**

### **Case of the probiotic *Faecalibacterium prausnitzii***

#### **Abstract**

Intestinal bacteria are of growing interest in the areas of health and wellness [1, 3]. The intestinal ecosystem is characterized by its complex composition and its very low oxygen content. Therefore, numerous bacterial species isolated from this environment are extremely sensitive to oxygen. This feature is responsible for the difficulty of implementation of these microorganisms for probiotic large-scale applications, particularly during processing and storage.

In this presentation, we present the main steps that have been overcome to conserve and design a stabilization strategy for the bacteria *Faecalibacterium prausnitzii*, recognized for their anti-inflammatory activities intestinal and their beneficial effects on Crohn's disease and ulcerative colitis [3]. The first objective was to look for a medium and conditions optimized to stabilize the bacteria to the dry state in powder form, with a high survival rate (FUI FPARIS). Indeed, stabilization processes by dehydration lead to mechanical and oxidative perturbations [4] affecting survival and functionality of cells [5]. The second objective was to develop a specific protection protocol for the conservation of the probiotic in a dry solid form (capsules or microgranules) and to maintain viability during passage through the gastrointestinal tract. Encapsulation has been considered since this technique protects molecules or cells against various environmental perturbations [8].

We tested two types of encapsulation and estimated bacterial viability during the manufacturing process and after different stress mimicking intestinal conditions. The first type was the integration of bacteria in pectin beads (amidated low methoxyl pectin (DA =20-24% and DE = 22-28%), Unipectin® 305C – Cargill) obtained by ionotropic gélation with calcium chloride and then freeze-dried. In the second type, the bacteria were first freeze-dried and then included in a lipidic base with low melting point (Gelucire® 43/01 – Gattefossé, melting point of 43°C and HLB of 1).

Both techniques increase the survival of bacteria during exposure to gastrointestinal tract conditions, especially during the passage through the stomach and jejunum. Indeed, without

encapsulation, the passage of bacteria through these two compartments resulted in the loss of all of the bacterial population. After encapsulation, a part of the bacteria resisted to the stresses encountered in the different tract compartments. This part was more important in the case of the encapsulation made of Gelucire in comparison with the one with calcium pectinate.

The beneficial effect of probiotics is related to the viability and the functionality of these bacteria. Encapsulation is therefore a promising technology in the context of the use of extremely oxygen-sensitive bacteria as probiotics. Future developments are now studied in the PAM Unit in order to optimize the manufacturing process.

**Keywords:** probiotic, preservation, anaerobe, encapsulation, gastro-intestinal tract.

## **References**

1. Ebel, B., G. Lemetais, L. Beney, R. Cachon, H. Sokol, P. Langella, and P. Gervais, *Impact of probiotics on risk factors for cardiovascular diseases. A review*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2014. **54**(2): p. 175-89.
2. Miquel, S., et al., *Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health*. Curr Opin Microbiol, 2013. **16**(3): p. 255-61.
3. Sokol, H., et al., *Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16731-6.
4. Dupont, S., A. Rapoport, P. Gervais, and L. Beney, *Survival kit of Saccharomyces cerevisiae for anhydrobiosis*. Appl Microbiol Biotechnol, 2014. **98**(21): p. 8821-34.
5. Iaconelli, C., et al., *Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities*. J Biotechnol, 2015. **214**: p. 17-26.
6. Chambin, O., G. Dupuis, D. Champion, A. Voilley, and Y. Pourcelot, *Colon-specific drug delivery: Influence of solution reticulation properties upon pectin beads performance*. Int J Pharm, 2006. **321**(1-2): p. 86-93.
7. Dhalleine, C., A. Assifaoui, B. Moulari, Y. Pellequer, P. Cayot, A. Lamprecht, and O. Chambin, *Zinc-pectinate beads as an in vivo self-assembling system for pulsatile drug delivery*. Int J Pharm, 2011. **414**(1-2): p. 28-34.
8. Martin-Dejardin, F., B. Ebel, G. Lemetais, H. Nguyen Thi Minh, P. Gervais, R. Cachon, and O. Chambin, *A way to follow the viability of encapsulated Bifidobacterium bifidum subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: interest of flow cytometry*. Eur J Pharm Sci, 2013. **49**(2): p. 166-74.