

**Protection de bactéries lactiques probiotiques naturelles et recombinantes
dans un système biphasique biopolymérique auto-gélinifié**

**(Protection of natural and recombinant probiotic lactic acid bacteria by an
aqueous two-phase system cold-set gelation)**

Lucie LEONARD^{1,2}, Philippe LANGELLA¹, Florence HUSSON², Jean-Marc CHATEL¹,
Rémi SAUREL (remi.saurel@agrosupdijon.fr)²

¹*Commensals and Probiotics-Host Interactions Laboratory, Micalis Institute, INRA, Domaine
de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas, France*

²*UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Agrosup Dijon, Université de Bourgogne
Franche-Comté, 1 esplanade Erasme, 21000 Dijon, France*

Mots clés : gel alginate/caséinate, probiotiques, auto-gélinification, acidification, protection

L'efficacité des bactéries intestinales). Les effets de l'encapsulation probiotiques est influencée par leurs sur la survie des bactéries soumises aux propriétés fonctionnelles telles que leur conditions gastro-intestinales *in vitro* ont persistance le long du tractus gastro- largement été décrits [2]. L'objectif de ce intestinal et leurs propriétés travail a été de développer un système de immunomodulatrices [1]. Les bactéries confinement original utilisant une matrice probiotiques ont besoin d'être protégées bi-phasique d'alginate de sodium-caséinate pour améliorer leur délivrance dans un état de sodium (Alg-Cas) gélinifiée par actif jusqu'à leur site d'action (muqueuse

l'acidification engendrée par les bactéries lactiques probiotiques (BL).

Deux souches de BL ont été confinées : (i) *Lactobacillus plantarum* CNRZ1997, une souche naturelle capable de protéger la souris d'une infection par l'*Influenza virus* [1] et (ii) *Lactococcus lactis* pSec-Elafin, une souche recombinante exprimant et délivrant l'Elafine, antiprotéase humaine capable de protéger les souris contre les dommages d'une inflammation intestinale [3]. Les cellules bactériennes à 10^9 UFC.mL⁻¹ ont été introduites dans une émulsion Alg-Cas (1,5 % - 4 % (m/m)) contenant 1 % (m/m) de glucose et 2 à 20 mmol.L⁻¹ de carbonate de calcium.

La phase alginate est gélifiée par libération progressive d'ions Ca²⁺ lors de l'acidification de la matrice par les BL. Les gels sont formés après 6 h à 30°C. Une gamme de gel a été obtenue avec des modules élastiques G' variant de quelques dizaines de Pa à 1000 Pa en fonction de la concentration en carbonate de calcium

(Rhéomètre dynamique Anton Paar MCR302 ; 0,5 Pa ; 1 rad.s⁻¹ ; 0 N). Les cellules de *L. plantarum* CNRZ1997 ont été localisées dans la phase continue polyosidique alors que les cellules de *L. lactis* pSec-Elafin ont été localisées dans les micro-domaines protéiques (Microscopie confocale à balayage laser Leica SP2 AOBS, marquage Syto9/iodure de propidium). La localisation des cellules bactériennes dans un microenvironnement particulier est due à plusieurs paramètres : interactions non spécifiques, phénomène d'exclusion stérique, présence de structures de surface (pili, exopolysaccharides).

Les quantités d'Elafine ont été retrouvées dans les mêmes proportions (entre 5000 et 10000 pg.mL⁻¹) pour les cellules immobilisées que pour les cellules libres : l'immobilisation n'a donc pas impacté la production du métabolite d'intérêt.

Les cellules lorsqu'elles sont immobilisées dans les gels Alg-Cas, incubées dans un milieu gastrique modèle à pH = 1,8 sans

enzyme, ont été protégées. Après 3 h d'incubation à 37°C, la population des cellules immobilisées n'a chuté que de 2 log UFC.mL⁻¹ en comparaison avec les cellules libres dont la population a totalement disparu. Cette protection par le gel serait due à une barrière physique mais également au pouvoir tampon des caséinates. De même, la protection par le gel contre le stress dû aux sels biliaires [1] pour les cellules de *L. lactis* pSec-Elafin s'est avérée efficace en diminuant de 6 h le délai de reprise de croissance par rapport aux cellules libres.

La réalisation de tests biologiques *in vivo* permettra par la suite d'obtenir des données essentielles sur l'impact de l'immobilisation des cellules probiotiques sur leurs activités biologiques.

- [1] Kechaou, N., Chain, F., Gratadoux, J-J., Blugeon, S., Bertho, N., Chevalier, C., Le Goffic, R., Courau, S., Molimard, P., Châtel, J-M., Langella, P., Bermudez-Humaran, L.G., 2013. Identification of one novel candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strain active against influenza virus infection in mice by a large-scale screening. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1491-1499.
- [2] Huq, T., Khan, A., Khan, R.A., Ridel, B, Lacroix, M., 2013. Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. *Critical Review of Food Sciences and Nutrition*. 53, 909-916.
- [3] Motta, J-P., Bermudez-Humaran, L.G., Deraison, C., Martin, L., Rollad, C., Rousset, P., Boue, J., Dietrich, G., Chapman, K., Kharrat, P., Vienl, J-P., Alric, L., Mas, E., Sallenave, J-M., Langella, P., Vergnolle, N., 2012. Food-grade bacteria expressing Elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. *Science Translational Medicine*, 4(158), 158-169.

Protection of natural and recombinant probiotic lactic acid bacteria by an aqueous two-phase system cold-set gelation

Lucie LEONARD^{1,2}, Philippe LANGELLA¹, Florence HUSSON², Jean-Marc CHATEL¹,
Rémi SAUREL (remi.saurel@agrosupdijon.fr)²

¹*Commensals and Probiotics-Host Interactions Laboratory, Micalis Institute, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas, France*

²*UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Agrosup Dijon, Université de Bourgogne Franche-Comté, 1 esplanade Erasme, 21000 Dijon, France*

Keywords : alginate/caseinate gel, probiotic lactic acid bacteria, auto-gelling, acidification, protection

The efficacy of probiotic bacteria is greatly influenced by their functional properties, such as their persistence in the gastrointestinal tract and immunomodulatory properties [1].

Probiotic bacteria need to be protected to enhance their delivery in an active state at their preferred mucosal site of action. The effects of encapsulation on the survival of bacteria under *in vitro* gastrointestinal conditions have been widely reported [2]. The purpose of our study was to develop

an original coating material protecting cells by using a bi-biopolymeric sodium alginate-sodium caseinate (Alg-Cas) solution ionically linked by acidification with lactic acid bacteria (LAB).

Two strains were used to form the gel: i) the natural *Lactobacillus plantarum* CNRZ1997 strain which is active against influenza virus infection in mice [1] and ii) a recombinant *Lactococcus lactis* pSec-Elafin strain which produced the serine protease inhibitor Elafin [3]. Cells were

entrapped in an Alg-Cas (1.5 % - 4 % (w/w)) aqueous two-phase system containing 1 % (w/w) of glucose and 2 from 20 mmol.L⁻¹ calcium carbonate at 10⁹ CFU.mL⁻¹ and after 6 h at 30°C, gels were formed.

Weak to strong gels were formed with an elastic modulus G' from 10 to 1.000 Pa, respectively (Dynamic rheometer Anton Paar MCR302; 0.5 Pa; 1 rad.s⁻¹; 0 N). Our LAB strains showed two different behaviors: (i) *L. plantarum* CNRZ1997 cells were mainly in alginate continuous network whereas (ii) *L. lactis* cells were localized in protein microdomains (Confocal laser microscopy Leica SP2 AOBS, Syto9/propidium iodure staining). Bacterial adhesion depends on several parameters: nonspecific interactions, steric exclusion phenomenon, presence of specific structures on bacterial surface (pili, exopolysaccharides).

Elafin were found in the same proportions (between 5,000 and 10,000 pg.mL⁻¹) for immobilized cells compared to free cells:

therefore immobilizing did not affect the production of the metabolite of interest.

Cells immobilized in Alg-Cas gels, incubated in a gastric model medium at pH = 1.8 without enzyme were protected. After 3 hours of incubation at 37°C, the immobilized cell population declined by only 2 log CFU.mL⁻¹ in comparison with free cells whose population has completely disappeared. This protection could due to the physical barrier but also the buffering capacity of caseinate. Similarly, protection by the gel against stress due to bile salts [1] for *L. lactis* pSec-Elafin cells proved effective in reducing the time from 6 h of regrowth compared to free cells.

In vivo tests will later permit to obtain critical data on the impact of the probiotic cells immobilization on their biological activities.

[1] Kechaou, N., Chain, F., Gratadoux, J-J., Blugeon, S., Bertho, N., Chevalier, C., Le Goffic, R., Courau, S., Molimard, P., Châtel, J-M., Langella, P., Bermudez-Humaran, L.G., 2013. Identification of one novel candidate probiotic

Lactobacillus plantarum strain active against influenza virus infection in mice by a large-scale screening. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1491-1499.

[2] **Huq, T., Khan, A., Khan, R.A., Ridel, B, Lacroix, M.,** 2013. Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. *Critical Review of Food Sciences and Nutrition*. 53, 909-916.

[3] **Motta, J-P., Bermudez-Humaran, L.G., Deraison, C., Martin, L., Rollad, C., Rousset, P., Boue, J., Dietrich, G., Chapman, K., Kharrat, P., Vienl, J-P., Alric, L., Mas, E., Sallenave, J-M., Langella, P., Vergnolle, N.,** 2012. Food-grade bacteria expressing Elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. *Science Translational Medicine*, 4(158), 158-169.