



UNIVERSITE DE LIMOGES



Ecole doctorale Sciences - Technologie - Santé

Faculté des Sciences et Techniques

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

Thèse N° 54-2006

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Chimie appliquée – Chimie des Substances Naturelles

présentée et soutenue par

Benoît GENESTIE

le 28 septembre 2006

*Optimisation de la production d'arabinoxyloligosaccharides
d'intérêt biologique à partir de sons de céréales :
Approches méthodologiques.*

Thèse dirigée par : M. Bernard VERNEUIL, Professeur

M. Philippe BRESSOLLIER, Maître de Conférences -HDR

Proposition de jury :

<u>Rapporteurs</u>	M. P. MARTIN	Professeur, Université d'Artois
	M^{me}. M. URDACI	Professeur, ENITA de Bordeaux
Examineurs	M. P. BRESSOLLIER	Maître de conférences, Université de Limoges
	M. P. KRAUSZ	Professeur, Université de Limoges
	M. J.M. SCHMITTER	Professeur, Université de Bordeaux I
	M. B. VERNEUIL	Professeur, Université de Limoges
Invité	M. F. LOUVET	Professeur agrégé, ENSCI Limoges



UNIVERSITE DE LIMOGES



Ecole doctorale Sciences - Technologie - Santé

Faculté des Sciences et Techniques

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

Thèse N° 54-2006

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Chimie appliquée – Chimie des Substances Naturelles

présentée et soutenue par

Benoît GENESTIE

le 28 septembre 2006

*Optimisation de la production d'arabinoxyloligosaccharides
d'intérêt biologique à partir de sons de céréales :
Approches méthodologiques.*

Thèse dirigée par : M. Bernard VERNEUIL, Professeur

M. Philippe BRESSOLLIER, Maître de Conférences -HDR

Proposition de jury :

<u>Rapporteurs</u>	M. P. MARTIN	Professeur, Université d'Artois
	M^{me}. M. URDACI	Professeur, ENITA de Bordeaux
Examineurs	M. P. BRESSOLLIER	Maître de conférences, Université de Limoges
	M. P. KRAUSZ	Professeur, Université de Limoges
	M. J.M. SCHMITTER	Professeur, Université de Bordeaux I
	M. B. VERNEUIL	Professeur, Université de Limoges
Invité	M. F. LOUVET	Professeur agrégé, ENSCI Limoges

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier le Professeur Pierre KRAUSZ, pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, dont il est le directeur, de m'avoir permis de mener ce projet à la frontière de la chimie, de la biochimie et de la microbiologie et enfin de m'avoir soutenu en plusieurs occasions qui ne se sont pas limitées à l'aspect scientifique de mon travail.

J'adresse une profonde reconnaissance au Pr. Bernard VERNEUIL, qui a encadré ce travail depuis les premiers instants. Sa pédagogie, son écoute, son ouverture d'esprit et sa vision de la recherche scientifique, ont été aussi importantes pour moi que ses connaissances éclectiques et ont largement contribué à l'évolution de ce projet.

Je souhaite témoigner mes remerciements tout aussi sincères au Docteur Philippe BRESSOLLIER, co-directeur de cette étude. Sa maîtrise des outils analytiques, sa rigueur, sa passion m'ont permis d'évoluer et ont participé grandement à ma formation.

Je les remercie ensemble pour leur confiance, leur soutien, leur aide, leur encouragement. Mais je ne saurais retenir que leurs qualités scientifiques, merci pour la bonne humeur, tous les bons moments passés...

J'adresse également tous mes remerciements à Madame Maria URDACI, Professeur à l'ENITA de Bordeaux et à Monsieur Patrick MARTIN, Professeur à l'Université d'Artois qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Jean-Marie SCHMITTER, Professeur à l'Université de Bordeaux I, pour avoir examiné ce travail dans son ensemble, mais aussi pour sa participation dans la réalisation et l'interprétation des analyses de spectrométrie de masse.

Je remercie chaleureusement Monsieur François LOUVET, Professeur agrégé à l'ENSCI Limoges, pour avoir accepté d'être l'un des membres du jury et d'avoir participé à ce travail. Ses capacités pédagogiques, son enthousiasme et son dynamisme ont rendu l'approche des plans d'expériences limpide. Je le remercie donc pour son investissement et pour m'avoir donné l'opportunité de présenter une partie des mes travaux à un auditoire averti.

Je remercie sincèrement Sole ARIAS, en stage post-doctoral au LMBA (ENITA Bordeaux) pour son aide lors des tests d'adhésion et de l'analyse des protéines de surface extraites.

Je remercie Raymonde FAURE et Karine GRENIER, du département Génie Biologique de l'IUT du Limousin : un grand merci pour tous les coups de pouce, les conseils et le temps qu'elles m'ont accordé, Christophe GENIN, directeur du département, pour m'avoir permis de profiter des installations du département, Dominique SOULE, pour ses conseils et Pierre BRANLAND pour m'avoir initié à la culture bactérienne. Merci à l'ensemble du personnel pour cette ambiance extrêmement agréable.

Je n'oublie pas les membres du LCSN, de plus en plus nombreux et tant mieux, que chacun d'eux trouve ici un remerciement particulier, et notamment Madame Rachida ZERROUKI (qui m'a vu grandir...) et Robert GRANET, pour les innombrables discussions.

Enfin, tout ceci n'aurait pas été possible sans le soutien de ma famille et de mes amis, bien qu'ils l'ignorent sûrement. J'espère que ces quelques mots répareront cette erreur.

A mes parents : « merci, cette thèse est la vôtre ».

Sommaire

Introduction Générale.....	1
<u>Chapitre I Etude bibliographique</u>	11
<i>I LES SONS DE CEREALES.....</i>	13
I 1 Mouture et histologie du grain.....	13
I 2 Composition chimique.....	14
I 3 Les hétéroxylanes des parois cellulaires.....	16
I 4 Propriétés nutritionnelles des hétéroxylanes.....	18
<i>II PRODUCTION ET CARACTERISATION D'OLIGOSACCHARIDES D'HETEROXYLANES.....</i>	21
II 1 Extraction des hétéroxylanes.....	21
II 2 Dépolymérisation des hétéroxylanes.....	24
II 2 1 Les xylanases.....	27
II 2 1 1 Classification.....	27
II 2 1 2 Mécanisme d'action.....	27
II 2 1 3 Spécificité.....	28
II 2 1 4 Origines.....	28
II 2 2 Caractérisation des oligosaccharides issus de dépolymérisation.....	29
<i>III LES OLIGOSACCHARIDES ET L'ALIMENTATION FONCTIONNALISEE.....</i>	30
III 1 La microflore intestinale.....	30
III 2 Les probiotiques.....	33
III 2 1 Définitions.....	33
III 2 2 Survie des probiotiques.....	35
III 2 3 Mécanismes d'action des probiotiques.....	36
III 2 4 Effets thérapeutiques des probiotiques.....	37
III 2 4 1 Prévention des infections.....	37
III 2 4 2 Effets sur d'autres pathologies.....	37
III 3 Les prébiotiques.....	38
III 3 1 Critères de sélection : digestibilité et aptitude à être fermenté.....	39
III 3 1 1 Digestibilité.....	39
III 3 1 2 Aptitude a être fermenté.....	40
III 3 1 3 Les produits de la fermentation.....	41
III 3 2 Les différentes familles prébiotiques oligosaccharidiques.....	42
III 3 2 1 Les FOS et l'inuline.....	42
III 3 2 2 Le Lactulose.....	43
III 3 2 3 Les Galactooligosaccharides (GOS).....	44
III 3 2 4 Les prébiotiques émergents.....	44
III 3 2 4 1 Les isomaltoosaccharides (IMO).....	45
III 3 2 4 2 Les oligosaccharides de soja (SOS).....	45

III 3 2 4 3 Les xylooligosaccharides	46
III 3 3 Effet prébiotique et structure des oligosaccharides	49
III 3 4 Amélioration des fonctions physiologiques et effet sur la santé	50

Chapitre II Extraction, caractérisation d'une fraction arabinoxylane et essais de dépolymérisation..... 53

I OBTENTION D'UNE FRACTION ARABINOXYLANE 55

I 1 Les substrats végétaux valorisables	55
I 2 Extraction d'une fraction enrichie en arabinoxylanes	57
I 2 1 Extraction chimique	59
I 2 2 Purification des arabinoxylanes	61
I 2 3 Bilan de l'extraction.....	65
I 3 Caractérisation d'une source commerciale d'arabinoxylanes.....	65
I 4 Etude comparée de la distribution des masses moléculaires des arabinoxylanes	67

II HYDROLYSE DES ARABINOXYLANES EN ARABINOXYLOOLIGOSACCHARIDES 69

II 1 Mise au point de la méthode de suivi d'hydrolyse	69
II 2 Hydrolyse des arabinoxylanes	73
II 2 1 Hydrolyse chimique.....	73
II 2 2 Hydrolyse enzymatique	77
II 2 2 1 Choix des enzymes et contrôle des activités	77
II 2 2 2 Hydrolyse enzymatique des arabinoxylanes.....	79
II 2 3 Combinaison d'hydrolyses chimique et enzymatique	82

CHAPITRE III Optimisation de la production d'AXOS : mise en œuvre d'une approche par plans d'expériences..... 87

I DEFINITIONS ET APPROCHE THEORIQUE..... 90

II APPLICATION A L'OPTIMISATION DE L'HYDROLYSE CHIMIQUE : PROCESSUS N°1 93

II 1 Définition du domaine :	93
II-2 Matrice d'expériences	95
II 3 Analyse des résultats	98
II 3 1 Analyse globale	98
II 3 2 Analyse mathématique : Construction d'un modèle.....	103
II 4 Utilisation du modèle pour l'optimisation du processus n°1.....	105
II 5 Validation expérimentale du modèle	106
II 6 Etude de robustesse	108
II 7 Bilan de l'optimisation du processus n°1 :	109

III L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE : PROCESSUS N°2	110
III 1 Définition des objectifs, des réponses et du domaine expérimental	110
III 2 Choix du modèle	112
III 3 Matrice d'expériences	113
III 4 Analyse des résultats	114
 IV CONCLUSION	 117
 <u>Chapitre IV Production d'AXOS à l'échelle préparative et caractérisation chimique</u>	 119
Partie A Production d'AXOS à l'échelle préparative.....	121
 <i>I ELIMINATION SELECTIVE DES MONOSACCHARIDES PAR FPLC D'EXCLUSION MOLECULAIRE SUR GEL SUPERDEX</i>	 124
 <i>II ELIMINATION SELECTIVE DES MONOSACCHARIDES PAR ULTRAFILTRATION</i>	 126
II 1 Vérification de la sélectivité de la membrane d'ultrafiltration.....	126
II 2 Application de la diafiltration à l'extraction sélective de la fraction oligosaccharides des hydrolysats chimiques d'AX _{purif}	132
 Partie B Caractérisation physico-chimique des produits d'hydrolyse ...	135
 <i>I ANALYSE DE LA FRACTION AXOS 1</i>	 137
I 1 Composition osidique par CPG/SM	137
I 2 Mise en évidence d'oligosaccharides anioniques par CEI.....	139
I 3 Analyse de la distribution de tailles des oligosaccharides	140
I 3 1 HPLC en phase normale sur gel de silice greffée aminopropyle.....	141
I 3 1 1 Expertise de la méthode sur un mélange de référence.....	141
I 3 1 2 Application de la HPLC en phase normale à l'analyse des AXOS 1.....	142
I 3 2 Fractionnement des AXOS 1 par HPSEC.....	144
➤ Composition osidique des fractions obtenues	147
➤ Analyse de la distribution moléculaire des fractions AXOS par spectrométrie de masse	149
Pour les AXOS 1 ₋₁ :	149
Pour les AXOS 1 ₋₂	151
Pour les AXOS 1 ₋₃	155
 <i>II ANALYSE DE LA FRACTION AXOS 2</i>	 157
II 1 Analyse de la composition osidique par CPG/SM	157
II 2 Analyse de la distribution de tailles des AXOS 2	158
II 2 1 HPLC en phase normale	158
II 2 2 Spectrométrie de masse en mode electrospray ESI.....	159

Chapitre V Caractérisation de l'intérêt biologique des AXOS de sons de céréales..... 163

I CHOIX DES SOUCHES PROBIOTIQUES CIBLES 166

II CONTROLE DES EFFETS DES OLIGOSACCHARIDES SUR LES SOUCHES PROBIOTIQUES 167

III ETUDE DES EFFETS DES AXOS SUR LES SOUCHES PROBIOTIQUES SELECTIONNEES 168

- III 1 Essais sur *Lactobacillus plantarum* 299v..... 169
- III 2 Essais sur *Bifidobacterium longum* 171
- III 3 Essais sur *Clostridium butyricum*..... 173
- III 4 Essais sur *Bacillus cereus* 177

Chapitre VI Matériels et méthodes 185

I REACTIFS ET MATERIELS UTILISES : 187

- I 1 Solvants et réactifs 187
- I 2 Substrats végétaux 188
- I 3 Biocatalyseurs 189
- I 4 Matériels et équipements scientifiques 190
 - Production d'eau ultra pure 190
 - Centrifugation..... 190
 - Spectrophotométrie UltraViolet-Visible 190
 - Chromatographies en phase liquide 190
 - Chromatographie en phase gazeuse 191
 - Broyage et tamisage des échantillons..... 191
 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 191
 - Ultrafiltration..... 191
 - Agitation orbitale..... 192
 - Concentration et séchage..... 192
 - Spectrométrie de masse 192

II EXTRACTION DES ARABINOXYLANES 193

- II 1 Préparation des sons de céréales..... 193
- II 2 Délignification des sons de céréale 193
- II 3 Extraction alcaline 193
- II 4 Elimination de l'amidon et des protéines 194
- II 5 Extraction, en phase solide, de la fraction arabinoxylanes neutres 195

III HYDROLYSES DES ARABINOXYLANES 196

- III 1 Hydrolyse enzymatique directe des arabinoxylanes purifiés 196
 - III 1 1 Hydrolyse par l'arabinase..... 196
 - III 1 2 Hydrolyse par les xylanases 196
- III 2 Hydrolyse chimique directe des arabinoxylanes purifiés..... 196

III 3 Combinaison hydrolyse chimique puis enzymatique.....	197
III 3 1 Optimisation de l'hydrolyse chimique : Processus n°1.....	197
III 3 2 Optimisation de l'hydrolyse enzymatique : Processus n°2.....	198
III 4 Production d'arabinoxyloligosaccharides à l'échelle préparative.....	199
III 4 1 Hydrolyse chimique : Processus n°1.....	199
III 4 2 Elimination sélective des monosaccharides par ultrafiltration.....	200
III 4 3 Hydrolyse enzymatique : processus n°2.....	200

IV ANALYSES.....201

IV 1 Caractérisation physico-chimique du matériel végétal.....	201
IV 1 1 Teneur en lipide.....	201
IV 1 2 Taux d'extractibles hydrophiles.....	201
IV 1 3 Taux de matière sèche.....	201
IV 1 4 Teneur en protéines totales.....	202
IV 1 5 Taux de cendres.....	202
IV 1 6 Teneur en amidon.....	202
IV 2 Caractérisation des fractions arabinoxylanes et arabinoxyloligosaccharides.....	203
IV 2 1 Dosages de sucres totaux.....	203
IV 2 2 Dosages colorimétriques des acides uroniques.....	204
IV 2 3 Analyse de la composition en monosaccharides par CPG/SM.....	204
IV 2 3 1 Préparation de l'échantillon.....	204
IV 2 3 2 Analyse des dérivés TMS par CPG/SM.....	205
IV 2 4 Estimation des masses moléculaires des fractions arabinoxylanes et arabinoxyloligosaccharides.....	207
IV 2 5 Analyse des arabinoxylanes et des arabinoxyloligosaccharides par chromatographie d'échange d'ions.....	208
IV 2 6 Analyse des arabinoxyloligosaccharides par chromatographie liquide haute performance en phase normale.....	208
IV 2 7 Détermination des masses moléculaires des arabinoxyloligosaccharides par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF.....	209
IV 3 Hydrolyses enzymatiques.....	209
IV 3 1 Mesure de l'activité xylanase.....	209
IV 3 2 Suivi cinétique de l'hydrolyse.....	210
IV 3 2 1 Dosages des sucres réducteurs.....	210
IV 3 2 2 Dosage des oligosaccharides et monosaccharides.....	210
IV 4 Analyses des acides gras à chaînes courtes.....	211
IV 4 1 Par chromatographie en phase gazeuse.....	211
IV 4 1 1 Préparation de l'échantillon.....	211
IV 4 1 2 Analyse des dérivés TBDMS.....	212
IV 4 2 Par chromatographie liquide haute performance.....	212
IV 5 Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS : SDS-PAGE.....	214
IV 5 1 Préparation de l'échantillon.....	214
IV 5 2 Séparation électrophorétique.....	214

V EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE.....215

V 1 Les souches bactériennes utilisées.....	215
V 2 Les milieux de cultures standards.....	215
V 2 1 Milieu MRS pour Lactobacillus.....	215
V 2 2 Milieu M20 pour Bifidobacterium.....	216

V 2 3 Milieu TS pour Clostridium	216
V 2 4 Milieu MH pour bacillus	216
V 3 Préparation des inoculums	216
V 4 Test de croissance.....	217
V 4 1 Préparations des milieux de culture.....	217
V 4 2 Le test de croissance.....	217
V 5 Test d'adhésion sur mucine gastrique	219
V 5 1 Préparation des puits	219
V 5 2 Préparation des cultures.....	219
Conclusion et perspectives.....	221
Références Bibliographiques.....	231
Annexes.....	265

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Composition osidique des polymères pariétaux de blé.	15
Tableau 2 : Composition osidique des polysaccharides de la couche aleurone de blé.	15
Tableau 3 : Composition osidique des polysaccharides de péricarpe de blé.	15
Tableau 4 : Représentation, en g.kg-1 de matière sèche, des fibres diététiques (FD) et leurs composition en lignines et polysaccharides autres que l'amidon (PAA) dans le blé, le seigle et le maïs. (BACH KNUDSEN 1997).	19
Tableau 5 : Composition des sons, exprimée en g pour 100g de son.	56
Tableau 6 : Composition osidique des sons de blé et de seigle, exprimées en moles pour 100 moles.	57
Tableau 7 : Composition des fractions arabinoxylanes extraites, exprimée en g pour 100g de fraction.	60
Tableau 8 : Composition osidique des fractions arabinoxylanes extraites exprimée en moles pour 100 moles.	61
Tableau 9 : Composition osidique des fractions AXpurif de blé et de seigle, exprimée en mole pour 100 moles.	63
Tableau 10 : Composition des arabinoxylanes commerciaux de maïs, les teneurs sont exprimées en g pour 100g d'AXcom.	66
Tableau 11 : Composition osidique des arabinoxylanes commerciaux de maïs, exprimée en moles pour 100 moles d'oses.	66
Tableau 12 : Masses moléculaires et TR des dextrans utilisés pour la calibration de la colonne HPSEC.	67
Tableau 13 : Estimation des masses moléculaires des arabinoxylanes extraits et commerciaux, par HPSEC sur colonne Aquagel OH-60.	68
Tableau 14 : Nature, masse moléculaire et temps de rétentions des marqueurs utilisés pour l'étalonnage de la colonne HPSEC Aquagel OH-30.	70

Tableau 15 : Etablissement de la relation entre l'aire du pic chromatographique et la quantité de soluté élué.	73
Tableau 16 : Caractéristiques des xylanases utilisées au cours de l'étude.	78
Tableau 17 : Liste des combinaisons hydrolyses chimique puis enzymatique testées.	83
Tableau 18 : Nombre de coefficients p et d'essais N, fixés par le réseau de Doehlert pour un modèle polynomial du second degré.	92
Tableau 19 : Définitions des facteurs, de l'étendue de leur domaine de variation	94
Tableau 20 : a) Matrice d'expériences d'après le réseau uniforme de Doehlert à trois facteurs dans l'espace mathématique. b) : Valeurs réelles des conditions opératoires après transformation bijective.	96
Tableau 21 : Définition des réponses et des objectifs visés pour chacune.	97
Tableau 22 : Evolution des réponses pour chacun des essais de la matrice d'expériences issue de l'utilisation du réseau de Doehlert.	97
Tableau 23 : Evolution de l'indice de satisfaction individuel en fonction de la réponse Y associée.	99
Tableau 24 : Evolution des fonctions de désirabilités individuelles pour	100
Tableau 25 : Calcul des désirabilités pour chacune des réponses du plan d'expériences et expression de la désirabilité globale pour chaque essai.	102
Tableau 26 : Quantification des qualités descriptive et prédictive du modèle pour chacune des réponses.	104
Tableau 27 : Conditions optimales prévues, réponses et désirabilités calculées par le modèle.	105
Tableau 28 : Réponses mesurées et désirabilités calculées de l'essai réalisé dans les conditions expérimentales optimales fournies par le modèle.	106
Tableau 29 : Evolution des désirabilités individuelles et globales avec la nouvelle définition de d_2	107
Tableau 30 : Comparaison des conditions expérimentales conduisant aux valeurs optimales de d_g	108
Tableau 31 : Conditions et résultats obtenus pour les essais consacrés à l'étude de la robustesse du point de fonctionnement.	109

Tableau 32 : Nombre de modalités par facteurs.	111
Tableau 33 : Conditions expérimentales issues de la matrice d'expérience établie par l'algorithme d'échange pour le processus n°2.	114
Tableau 34 : Résultats du plan d'expériences relatif au processus n°2.	115
Tableau 35 : Composition des mélanges étalons utilisés en FPLC.....	124
Tableau 36 : Proportions relatives des oses, estimées par HPLC en phase normale et exprimées en moles pour 100moles d'oses identifiés	144
Tableau 37 : Amplitude de variation du nombre n de résidus osidiques présents dans les oligosaccharides de la fraction AXOS 1-2.	151
Tableau 38 : Espèces moléculaires présentes dans les AXOS 1-3.	156
Tableau 39 : Proportions relatives des différents oses identifiés par HPLC en phase normale, exprimées en moles pour 100 moles d'oses identifiés.	159
Tableau 40 : Principales caractéristiques des fractions oligosaccharidiques retenues pour les tests d'activité biologique.	161
Tableau 41 : Identification des souches probiotiques sélectionnées	166
Tableau 42 : Nature et concentrations des sources carbonées additionnées au milieu MH pour la culture de Bacillus cereus.....	177
Tableau 43 : Liste des principaux réactifs et solvants utilisés.....	187
Tableau 44 : Niveaux des facteurs définis par le réseau uniforme de Doehlert.	197
Tableau 45 : Matrice d'expériences pour l'étude de l'effet des facteurs sur la processus n°2.	198
Tableau 46 : Gradient de force ionique utilisé pour l'analyse des différentes fractions arabinoxyloligosaccharides, par CEI.....	208
Tableau 47 : Programme de température pour l'analyse des dérivés TBMS en CPG/SM. ...	212
Tableau 48 : Liste des sources carbonées pour l'étude de l'effet sur la croissance des différentes souches bactériennes.	218

Liste des figures

Figure 1 : Sections longitudinales d'un grain : a) de maïs (tiré de CHANLIAUD 1995a) b) de blé (tiré de BOUDREAU, 1992).....	14
Figure 2 : Structure du résidu β - D-xylopyranose.	16
Figure 3 : Structure hélicoïdale de xylane linéaire.....	16
Figure 4 : Structure des principaux oses constitutifs des hémicelluloses de céréales	17
Figure 5 : Principaux acides phénoliques des parois de céréales.	18
Figure 6 : Organigramme de l'extraction des arabinoxylanes de sons de céréales, par voie chimique.....	58
Figure 7 : Structure schématisée des interactions entre les différents constituants du son, d'après Mandalari (2005).....	60
Figure 8 : Organigramme du traitement de purification des AX _{brut}	62
Figure 9 : Purification des AX _{brut} par extraction en phase solide sur échangeur d'ions. La représentativité des fractions est exprimée en g d'oses pour 100g d'oses déposés, dosés par la méthode de Dubois.....	64
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la colonne polyol Aquagel OH-60, les marqueurs 6 et 7 correspondent respectivement au xylose et au NaCl.....	68
Figure 11 : Profils chromatographiques des marqueurs de masse utilisés pour l'étalonnage de la colonne Aquagel OH-30.	71
Figure 12 : Etalonnage du DDL à l'aide des différents marqueurs de masse moléculaire : AX _{com} , Inuline, FOS RP95 et Xylose. Les quantités déposées, m, de chaque marqueur sont comprises entre 5 μ g et 200 μ g.....	72
Figure 13 : Suivi cinétique de l'hydrolyse acide de AX _{com} de maïs par HPSEC et détection réfractométrique.	74
Figure 14 : Suivi cinétique de l'hydrolyse chimique des AX, par HPSEC et détection réfractométrique : a) AX _{com} de maïs, b) AX _{purif} de blé et c) AX _{purif} de seigle.....	75
Figure 15 : Effet de la durée et de la température sur la distribution en taille des produits d'hydrolyse des AX _{com} , estimée par HPSEC sur colonne Aquagel OH-30.	77
Figure 16 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12%, des différentes préparations enzymatiques utilisées pour l'hydrolyse des AX.....	79
Figure 17 : Suivi par HPSEC de la distribution des masses moléculaires des AX _{com} de maïs au cours de l'hydrolyse par la xylanase XL.	80

<i>Figure 18 : Hydrolyses d'AX_{com} de maïs par différentes combinaisons enzymatiques, les proportions de chaque famille moléculaire, déterminées par HPSEC, sont exprimées en aire relative.</i>	<i>81</i>
<i>Figure 19 : Suivi cinétique de l'hydrolyse de xylane linéaire de hêtre par la xylanase XS. Les concentration en enzyme et en substrat sont respectivement de 0,2 UE.mL⁻¹ et 10mg.mL⁻¹.....</i>	<i>82</i>
<i>Figure 20 : Suivi par HPSEC de l'évolution de la distribution des masses des produits d'hydrolyse des AX après : étape 1 (TFA 0,5M, 60°C 2h) puis étape 2 (XL pendant 110h)</i>	<i>84</i>
<i>Figure 21 : Effet de diverses combinaisons d'hydrolyses chimique puis enzymatique des AX_{com}, issus de maïs, sur la distribution en taille des produits de la réaction.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 22 : Représentation de la recherche d'un optimum par la méthode du simplexe, d'après Louvet 2005.</i>	<i>88</i>
<i>Figure 23 : Représentation schématique des essais à réaliser et définis par le réseau de Doehlert avec 2 facteurs.</i>	<i>92</i>
<i>Figure 24 : Représentation schématique du domaine expérimental.</i>	<i>95</i>
<i>Figure 25 : Représentation graphique du domaine expérimentale et positionnement des essais définis par le réseau uniforme de Doehlert.</i>	<i>96</i>
<i>Figure 26 : Représentation graphique générale d'une fonction de désirabilité continue (pointillé rouge) ou discontinue (trait plein bleu), en fonction de la valeur d'une réponse Y, lorsque celle-ci doit être maximisée.</i>	<i>98</i>
<i>Figure 27 : Représentation graphique des fonctions : a) Désirabilité d₁ associée à Y₁ ; b) Désirabilité d₂ associée à Y₂ ; c) Désirabilité d₃ associée à Y₃.....</i>	<i>101</i>
<i>Figure 28 : Adéquation entre les valeurs de la réponse Y₂ calculées par le modèle et mesurées expérimentalement.</i>	<i>104</i>
<i>Figure 29 : Représentation du domaine expérimental proche de l'optimum pour l'étude de robustesse.....</i>	<i>108</i>
<i>Figure 30 : Représentation du domaine expérimental discontinu relatif au processus n°2.</i>	<i>112</i>
<i>Figure 31 : Répartition des 12 essais à réaliser pour estimer les coefficients du modèle additif.</i>	<i>113</i>
<i>Figure 32 : Adéquation des deux réponses Y₁ et Y₂.....</i>	<i>115</i>
<i>Figure 33 : Tracé de l'effet moyen des facteurs : a) sur la réponse Y₁, b) sur la réponse Y₂.</i>	<i>116</i>
<i>Figure 34 : Superposition des profils chromatographique HPSEC de l'inuline, FOS RP95, xylose, et hydrolysats chimique de AX_{com} de maïs.</i>	<i>125</i>
<i>Figure 35 : Chromatogramme du mélange 1 Inuline + Xylose obtenu sur Superdex 75 et détection réfractométrique.....</i>	<i>125</i>

<i>Figure 36 : Schéma de principe de la diafiltration en mode discontinu. V_0 = volume initial, V_R = volume de rétentat final.</i>	<i>127</i>
<i>Figure 37 : Evolution du flux de perméat en fonction du facteur de réduction volumique.</i>	<i>128</i>
<i>Figure 38 : Evolution du flux de perméat J en fonction du nombre de cycles n de concentration/dilution.</i>	<i>128</i>
<i>Figure 39 : Evolutions du taux de rétention des oligosaccharides et des monosaccharides ainsi que du rendement de récupération de chacune de ces famille de composés en fonction du nombre, n, d'opérations successives de concentration / dilution.....</i>	<i>129</i>
<i>Figure 40 : Comparaison des profils chromatographiques de perméat, de xylose et de FOS type RP95. Analyse effectuée par HPSEC sur colonne Aquagel OH-30 et détection DDL.</i>	<i>130</i>
<i>Figure 41 : Evolution de la concentration résiduelle en monosaccharides et oligosaccharides dans le rétentat en fonction du nombre de cycle, n, de concentration/dilution.</i>	<i>131</i>
<i>Figure 42 : Effet du traitement d'ultrafiltration sur la distribution en tailles des produits d'hydrolyse d'arabinoxylanes de : a) blé, b) seigle et c) maïs.</i>	<i>133</i>
<i>Figure 43 : Analyses physico-chimiques des hydrolysats au cours du processus d'obtention.</i>	<i>136</i>
<i>Figure 44 : Comparaison des compositions osidiques des AXOS 1 issus des différentes céréales.</i>	<i>137</i>
<i>Figure 45 : Analyse des AXOS 1 de seigle, par CEI sur colonne Accel plus QMA. Détection UV à 220nm et réfractométrie, en série. Collecte de l'éluat par fractions de 1min et dosage des oses totaux par la méthode de Dubois.</i>	<i>139</i>
<i>Figure 46 : Analyse par HPLC, en phase normale sur gel de silice greffée aminopropyle, de la préparation commerciale de FOS RP 95, détection réfractométrique.</i>	<i>141</i>
<i>Figure 47 : Analyse par SM en mode MALDI-TOF de la distribution des masses moléculaires des fructooligosaccharides du produit de référence RP95.....</i>	<i>142</i>
<i>Figure 48 : Analyse des AXOS 1 par HPLC en phase normale sur gel de silice greffée aminopropyle, avec détection réfractométrique : a) AXOS 1 de seigle, b) AXOS 1 de blé.</i>	<i>143</i>
<i>Figure 49 : Analyse des AXOS 1 par HPSEC sur colonne Aquagel OH-30 et détection DDL : a) AXOS 1 de maïs, b) AXOS 1 de blé et c)AXOS 1 de seigle.</i>	<i>145</i>
<i>Figure 50 : Analyse par HPSEC, sur colonne Aquagel OH-30, des fractions F_1, F_2 et F_3 issues des AXOS de blé, avec détection DDL.</i>	<i>147</i>
<i>Figure 51 : Composition osidique relative, exprimée en moles pour 100 moles, pour chaque fraction et pour chaque source de son de céréale.</i>	<i>147</i>
<i>Figure 52 : Comparaison des proportions osidiques relatives, exprimées en moles pour 100 moles, pour chaque type d'oses et chaque fraction en fonction de la nature de la céréale d'origine.</i>	<i>148</i>

<i>Figure 53 : Analyse par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF, de la fraction AXOS 1₋₁ issue de maïs.</i>	<i>149</i>
<i>Figure 54 : Agrandissement du domaine de masse 1900-2500 du spectre SM/MALDI-TOF d'AXOS 1₋₁ issu de maïs.</i>	<i>150</i>
<i>Figure 55 : Analyse par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF de la fraction AXOS 1₋₂ issue de maïs.</i>	<i>152</i>
<i>Figure 56 : Agrandissement du spectre de AXOS 1₋₂ de maïs.</i>	<i>152</i>
<i>Figure 57 : Représentativité des ions caractéristiques de chaque famille d'oligomères en fonction de la nature des substrats d'origine.</i>	<i>153</i>
<i>Figure 58 : Spectre de masse en mode MS-MS sur l'ion à m/z 1141 de la fraction de AXOS 1₋₂ issue de maïs.</i>	<i>154</i>
<i>Figure 59 : Analyse par spectroscopie de masse en mode MALDI-TOF de la fraction AXOS 1₋₃ issue de blé.....</i>	<i>156</i>
<i>Figure 60 : Composition osidique des différentes fractions AXOS 2, exprimée en moles pour 100 moles d'oses.</i>	<i>157</i>
<i>Figure 61 : Comparaison des rapport A/X dans les différentes fractions issues du processus d'hydrolyse des AX_{purif} de blé, de seigle ou d'AX_{com} de maïs.</i>	<i>158</i>
<i>Figure 62 : Analyse de AXOS 2 de seigle par HPLC en phase normale sur gel de silice greffée amonipropyle et détection réfractométrique.</i>	<i>159</i>
<i>Figure 63 : Analyse d'AXOS 2 issus de maïs, par SM en mode ESI.</i>	<i>160</i>
<i>Figure 64 : Courbes de croissances de Lactobacillus plantarum 299v sur milieu de culture MRS complémenté par différentes sources carbonées : a) suivi estimé par mesure de DO à 570nm, b) suivi estimé par dénombrement des bactéries.....</i>	<i>170</i>
<i>Figure 65 : Croissance de Lactobacillus plantarum, après 12 et 24h de culture en milieu MRS complémenté par différentes sources carbonées, exprimées en UFC.mL⁻¹ de milieu de culture.</i>	<i>170</i>
<i>Figure 66 : Dosage de l'acide lactique et des acides gras à chaîne courte, après 24h de culture de Lactobacillus plantarum sur milieu MRS complémenté par différentes sources carbonée.</i>	<i>171</i>
<i>Figure 67 : Croissance de Bifidobacterium longum, après 22 et 33h de culture sur milieu M20 complémenté par différentes sources carbonées.</i>	<i>172</i>
<i>Figure 68 : Croissance de Clostridium butyricum après 24, 32, 48 et 56h de culture en milieu TS supplémenté par différentes sources carbonées, exprimée en DO mesurée à 570nm.</i>	<i>174</i>
<i>Figure 69 : Photographies de Clostridium butyricum dans différentes conditions de culture, après coloration de Gram. a) Préculture de Clostridium butyricum sur milieu TS standard, b) Culture de 24h de Clostridium butyricum sur TS avec AXOS 1 de blé, c) Culture de 24h Clostridium butyricum sur TS complémenté par Glc, d) Culture de 48h Clostridium butyricum sur TS avec AXOS 1 de blé.....</i>	<i>175</i>

<i>Figure 70 : Dosage de l'acide lactique, et des acides gras à chaîne courte après 48h de culture de Clostridium butyricum sur milieu TS complétement par différentes sources carbonées.....</i>	<i>176</i>
<i>Figure 71 : Courbe de croissance de Bacillus cereus, complétement par différentes sources carbonées, suivi par DO à 600nm : a) sur milieu MH avec amidon, b) sur milieu MH sans amidon.....</i>	<i>178</i>
<i>Figure 72 : Courbe de croissance de Bacillus cereus, complétement par différentes sources carbonées, suivi par dénombrement des colonies : a) sur milieu MH avec amidon ; b) sur milieu MH sans amidon.....</i>	<i>180</i>
<i>Figure 73 : Contrôle de la sporulation au cours de la croissance de Bacillus cereus, complétement par différentes sources carbonées : a) sur milieu MH avec amidon, b) sur milieu MH sans amidon</i>	<i>181</i>
<i>Figure 74 : Effet des conditions de culture standard (avec amidon) de Bacillus cereus sur la capacité d'adhésion de la bactérie sur la mucine gastrique.</i>	<i>182</i>
<i>Figure 75 : Analyse des protéines de surface de Bacillus cereus par électrophorèse sur gel de polycrylamide à 12%.....</i>	<i>183</i>
<i>Figure 76 : Programme de température pour l'analyse des dérivés TMS par CPG/SM ..</i>	<i>205</i>
<i>Figure 77 : Etalonnage de la colonne Aminex par les acide gras à chaîne courte et l'acide lactique.....</i>	<i>213</i>

Liste des abréviations

A/X	Rapport entre le nombre de moles arabinose et
AGCC	Acide gras à chaîne courte
AM	Arabinase Megazyme
Ara	Arabinose
AX	Arabinoxylane
AXOS	Arabinoxyloligosaccharide
CEI	Chromatographie d'échange d'ions
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DP	Degré de polymérisation
ESI	Electrospray ionisation
FOS	Fructooligosaccharide
Gal	Galactose
Glc	Glucose
GOS	Galactooligosaccharide
HPLC	High performance liquid chromatography
HPSEC	High performance size exclusion
IMO	Isomaltooligosaccharides
M	Monosaccharide
MALDI-	Matrix assisted laser desorption/ionisation-time
MM	Masse moléculaire
MOS	Maltooligosaccharides
O 1	Oligosaccharide de DP>10
O 2	Oligosaccharide de DP<10
P 1	Polymère de haute masse moléculaire
P 2	Polymère de faible masse moléculaire
SM	Spectrométrie de masse
TFA	Acide trifluoroacétique
TMSIm	Triméthylsilylimidazole
T _R	Temps de rétention
UE	Unité enzymatique
UF	Ultrafiltration
UFC	Unité formant colonie
XL	Xylanase Lyven
XM	Xylanase Megazyme
XOS	Xylooligosaccharide
XS	Xylanase Sigma
Xyl	Xylose

INTRODUCTION GENERALE

La valorisation des co-produits de cultures céréalières tels que rafles de maïs, paille, sons... est assez largement diversifiée et vise des applications dans plusieurs domaines tels que les détergents, matériaux composites, produits naturels d'intérêt pharmaceutique, produits cosmétiques, biocarburants, ou encore plastiques biodégradables. Cette dernière voie de valorisation a été largement développée au sein du laboratoire depuis plusieurs années. Mais avec l'émergence du nouveau concept d' « alimentation fonctionnalisée » une nouvelle voie de valorisation, par la bioconversion de certains constituants polysaccharidiques de ces co-produits en substances à propriétés prébiotiques potentielles, peut être expertisée. Ce travail est une contribution au développement de cette voie nouvelle de valorisation.

L'intérêt porté aux céréales quant à leurs potentialités d'utilisation en alimentation fonctionnalisée est très récent. Il s'inscrit dans une démarche plus générale dont l'objet est d'apporter des réponses à trois défis majeurs que doivent relever aujourd'hui les pays industrialisés, à savoir :

- contrôler le coût des dépenses de santé
- permettre aux populations âgées de vivre non seulement plus longtemps mais aussi dans de bonnes conditions de santé
- proposer aux consommateurs, de moins en moins disponibles, un choix élargi d'aliments bénéfiques pour la santé et prêts à l'emploi.

Dans le même temps, les progrès réalisés dans les sciences de la vie viennent étayer l'hypothèse selon laquelle outre leur rôle nutritionnel, les aliments peuvent moduler différentes fonctions physiologiques et avoir ainsi des effets sur l'état de santé. On constate actuellement une évolution dans les concepts en nutrition, reposant initialement sur le contrôle d'absence d'effet néfaste, ils évoluent vers une recherche d'aliments permettant de promouvoir un état de bien être, une meilleure santé et une réduction des risques de maladies. Ces nouveaux concepts ont été rapidement assimilés par le consommateur. Et bien que les connaissances en nutrition restent du domaine des spécialistes, la prise de conscience sur la relation nutrition-santé est toutefois en train de croître notablement. De plus, les progrès réalisés en sciences des aliments permettent aux industriels d'utiliser des techniques sophistiquées pour contrôler et améliorer la structure physique et la composition chimique des

produits alimentaires. Il y a donc une croissante sensibilisation aux bénéfices supplémentaires apportés et un marché potentiel pour les aliments fonctionnels. Durant la dernière décennie, tout d'abord au Japon puis aux USA, ces nouveaux concepts ont conduit au développement de la notion "d'aliments fonctionnalisés". Un aliment est dit "fonctionnalisé" s'il répond au moins à l'un des critères suivants :

- contient un composé, nutriment ou non, qui affecte de façon bénéfique une ou un nombre limité de fonctions biologiques,
- possède un effet physiologique ou psychologique en plus de l'effet nutritionnel,
- un aliment fonctionnel doit avoir un effet notable sur le bien être et la santé ou induire une réduction du risque de maladie.

Le constituant qui confère la qualité fonctionnelle de l'aliment peut être soit un macronutriment, s'il a un effet physiologique spécifique, soit un micronutriment essentiel si sa consommation est au-dessus des recommandations journalières.

En outre, il peut être un composé alimentaire même si sa valeur nutritive n'est pas connue comme essentielle, tels que certains oligosaccharides, ou même sans valeur nutritionnelle, tels que les microorganismes.

Il est possible de produire des aliments fonctionnalisés de différentes façons :

- en augmentant la concentration d'un constituant dont on a démontré les effets bénéfiques,
- en ajoutant un tel constituant qui n'est pas normalement présent dans l'aliment (tel qu'un anti-oxydant non vitaminique ou un fructane prébiotique),
- en substituant un composé à effet bénéfique démontré à un composé constitutif de l'aliment mais dont les effets néfastes sont connus (tels que certains lipides),
- en augmentant la biodisponibilité des constituants de l'aliment dont les effets bénéfiques ont été démontrés.

Mais l'établissement d'une corrélation entre ces effets bénéfiques et certains constituants alimentaires nécessite une approche scientifique rigoureuse pilotée par la fonction associée au produit et non pas par le produit lui-même.

L'appareil digestif humain est constitué de la bouche, la cavité orale, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. Les fonctions essentielles du gros intestin sont bien connues : absorption et sécrétion de certains électrolytes et de l'eau, stockage et excrétion des déchets de digestion. Depuis une décennie, une attention particulière est portée sur celles des fonctions du côlon qui affectent la santé de l'hôte et la nutrition. De ce point de vue, la flore microbienne est la plus importante. Avec plus de 10^{12} bactéries par gramme de contenu intestinal et plus de 500 genres bactériens différents, le côlon est de loin la région du corps la plus riche en microorganismes. Du fait du processus de fermentation, les bactéries du côlon produisent une très grande variété de composés pouvant avoir des effets néfastes, ou bénéfiques sur la santé. Parmi eux, les acides gras à chaîne courte, AGCC (ou SCFA, short chain fatty acid) font partie des substances bénéfiques les mieux identifiées. On peut donc penser pouvoir moduler les effets sur la santé de l'hôte en modifiant la composition de cette flore intestinale de façon à en optimiser les fonctions bénéfiques à l'hôte. Deux concepts ont alors émergé : celui de bactéries probiotiques et celui de substances prébiotiques.

Initialement décrit comme un organisme ou une substance contribuant à l'équilibre microbien intestinal par SPERTI (1971), la notion de probiotique a été redéfinie par FULLER (1989) : un probiotique est un « organisme vivant apporté comme complément alimentaire qui affecte de façon bénéfique la santé de l'hôte en optimisant l'équilibre de sa flore intestinale ». Selon cette définition plus restrictive, un probiotique doit nécessairement être viable et les substances antibiotiques en sont exclues. Quatre critères sont associés à cette définition :

- un probiotique doit pouvoir être produit à l'état viable et à grande échelle en vue d'applications industrielles,
- il doit rester viable et stable respectivement pendant son utilisation et durant son stockage,
- il doit être capable de survivre dans les conditions du tractus et de l'écosystème intestinal,
- L'hôte doit tirer un bénéfice santé de la consommation d'un probiotique.

Parmi les souches bactériennes aujourd'hui identifiées pour répondre à ces critères on trouve les lactobacilles, les bifidobactéries, certains bacilles ou encore des streptocoques. Les modes d'utilisation développés de nos jours sont essentiellement issus de l'industrie laitière et notamment les produits à base de lait fermenté. Le problème majeur est la nécessité pour le probiotique de s'installer et de séjourner dans le côlon, donc d'adhérer à l'épithélium

intestinal. Les conditions de stress environnemental dans lesquelles il se trouve compromettent le plus souvent ses chances de survie. Il doit notamment entrer en compétition pour les nutriments et les sites écologiques de colonisation avec les bactéries colonisatrices naturelles. Les travaux de BOUHNİK (1992), ont montré que sans une consommation continue le probiotique était rapidement entraîné et excrété du côlon.

Une autre approche, qui permet au moins en partie d'éviter ces problèmes, est de fournir des nutriments spécifiques de la flore bactérienne bénéfique déjà implantée, la notion de substance prébiotique est ainsi apparue. Par définition, GIBSON et ROBERFROID (1995), une substance prébiotique est un « ingrédient alimentaire non digestible qui affecte de façon bénéfique la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de genres bactériens, améliorant ainsi la santé de l'hôte ». Les critères à remplir par une telle substance étant les suivants :

- ne pas être hydrolysée ni absorbée dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal,
- être sélectif à l'égard d'un, ou d'un nombre restreint de genres bactériens pour en stimuler la croissance et/ou en activer le métabolisme,
- par voie de conséquence, induire une modification de la composition de la flore microbienne, en faveur d'un meilleur équilibre pour la santé de l'hôte,
- Induire des effets bénéfiques directs ou systémiques sur la santé de l'hôte.

Plusieurs constituants alimentaires répondent au premier critère ; certains glucides (oligo et polysaccharides) certains peptides et protéines et certains lipides, sous forme d'éthers ou d'esters. Ces différents composés naturels arrivant à l'état intègre au niveau du côlon et servant de substrat pour la flore endogène peuvent être qualifiés de « colonic food ».

Parmi eux se sont essentiellement certains oligosaccharides et polysaccharides qui peuvent remplir les trois derniers critères. En effet, bien que quelques peptides et protéines, pour la plupart d'origine laitière et végétale, soient connus pour être partiellement non digestible et pour faciliter l'absorption de certains cations tels que le Ca^{2+} , leur rôle bénéfique sur la flore intestinale bactérienne n'a pas été démontré. A l'inverse la protéolyse anaérobie peut générer des substances toxiques. En ce qui concerne les lipides leur métabolisme par la flore microbienne est très mal connu.

Les glucides non digestibles comprennent l'amidon résistant, les polysaccharides de la paroi cellulaire, les hémicelluloses, les pectines et les gommés. Or les produits céréaliers contiennent ces polymères végétaux. L'intérêt porté aux céréales quant à leurs potentialités d'utilisation en alimentation fonctionnalisée est très récent. Les céréales assurent 60% de la production alimentaire mondiale, fournissant des protéines, des fibres diététiques, de l'énergie, des minéraux et des vitamines nécessaires à la santé humaine. On peut résumer les applications potentielles des céréales ou de leurs constituants à l'alimentation fonctionnalisée en quatre points :

- substances fermentescibles pour la croissance des microorganismes probiotiques, notamment lactobacilles et bifidobactéries,
- fibres diététiques capables d'engendrer des effets physiologiques bénéfiques
- substances prébiotiques de part leur contenu en glucides non digestibles (assimilables) par l'homme,
- matériaux d'encapsulation pour les microorganismes probiotiques afin d'en assurer la protection lors du transit.

Dans l'objectif de valorisation à des fins d'aliments fonctionnels, des sous produits de la culture céréalière, le son est un candidat à expertiser. Le son de blé par exemple, co-produit de minoterie, qui représente entre 14 et 19% en poids du grain, comprend les couches protectrices externes, la couche d'aleurone et des résidus d'amidon de l'endosperme. C'est l'une des sources les plus riches en fibres alimentaires et l'essentiel (46%) est constitué de polysaccharides autres que l'amidon. Parmi eux, les principaux sont les arabinoxylanes, la cellulose et des $\beta(1-3)$ et $\beta(1-4)$ glucanes, respectivement 70%, 24% et 6% des polysaccharides non amidon. Des traces de glucomananes et d'arabinogalactanes issus des cellules d'aleurones et d'endosperme sont aussi présentes. De faibles quantités de xyloglucanes associés aux arabinoxylanes dans le péricarpe ont aussi été trouvées.

L'objectif de notre travail a donc été d'extraire des constituants polysaccharidiques de différents sons de céréales, blé et seigle et notamment la fraction arabinoxylane, de les caractériser chimiquement et d'optimiser, à l'aide d'un outil de décision, un processus de dépolymérisation répondant à des critères de taille par référence aux fructooligosaccharides, ou FOS, commercialisés aujourd'hui en tant que prébiotique. Les différentes fractions

d'oligomères, de type arabinoxylooligosaccharides obtenues, ont enfin été testées quant à leur aptitude à répondre aux critères de définition d'un prébiotique.

Toutefois, si les données de la littérature concernant les propriétés prébiotiques des xylooligosaccharides (XOS) issus de sons de céréales sont conséquentes, celles relatives aux arabinoxylooligosaccharides (AXOS) fortement substitués, sont beaucoup moins nombreuses. De ce fait, il aurait été hasardeux de préjuger de l'atteinte de l'objectif que nous nous étions fixé. C'est pourquoi tout au long de l'étude qui a fait l'objet de ce travail de thèse, nous avons eu en permanence le souci de définir puis de mettre au point une approche méthodologique qui soit ultérieurement adaptable et transférable pour la production et la caractérisation d'oligosaccharides d'intérêt biologique à partir de fractions polysaccharidiques différentes des arabinoxylyanes de sons de céréales. Cette approche, obligatoirement pluridisciplinaire, a nécessité l'utilisation de nombreux outils tant au niveau de la production, de la caractérisation physico-chimique, que de la mesure de l'activité biologique. La mise en place et la maîtrise de ceux-ci constituent une part non négligeable de ce travail pionnier réalisé dans le cadre d'un laboratoire initialement dédié à la chimie organique.

La présentation de ce travail est structurée en six parties suivies d'une conclusion et des perspectives qui en découlent.

La première partie est consacrée à une étude bibliographique résumant les connaissances acquises dans les domaines de l'extraction des polysaccharides de sons de céréales et des processus de transformation physique, chimique et biochimique à des fins de valorisation. De ce point de vue, le thème prébiotique en relation avec les microorganismes probiotiques est également développé.

La deuxième partie regroupe les résultats relatifs d'une part à l'extraction et à la caractérisation des arabinoxylyanes constitutifs des sons de céréales étudiés, d'autre part aux différents traitements de dépolymérisation mis en œuvre pour produire des arabinoxylooligosaccharides (AXOS) d'intérêt biologique potentiel. En conclusion à cette seconde partie, apparaît la nécessité d'une approche plus rationnelle d'optimisation du procédé faisant appel à l'outil plan d'expériences. La démarche utilisée pour cela est développée dans la troisième partie.

La mise en œuvre à l'échelle préparative du procédé ainsi optimisé et la caractérisation des fractions AXOS obtenues sont présentées dans une quatrième partie.

Les résultats de l'expertise biologique *in vitro* de ces fractions sont présentés dans la cinquième partie. Les effets constatés sur la croissance, la sporulation et l'aptitude à produire des acides gras à chaîne courte, AGCC, de bactéries de genre *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium* et *Clostridium* sont comparés à ceux obtenus avec des prébiotiques de référence FOS sur les mêmes souches bactériennes.

La sixième et dernière partie présente les matériels et méthodes utilisés au cours de cette étude.

En conclusion nous faisons un bilan de l'ensemble de ce travail et développons les perspectives que l'on peut en attendre.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

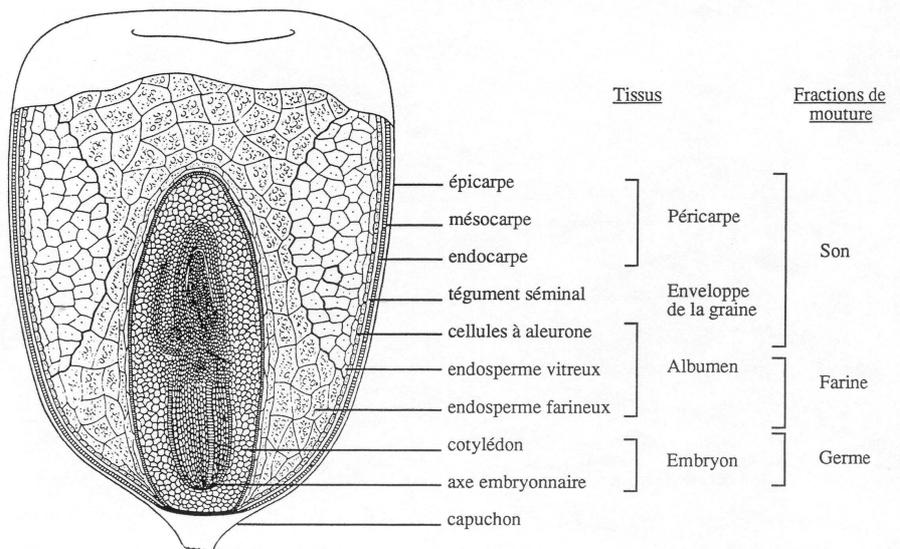
I Les Sons de Céréales

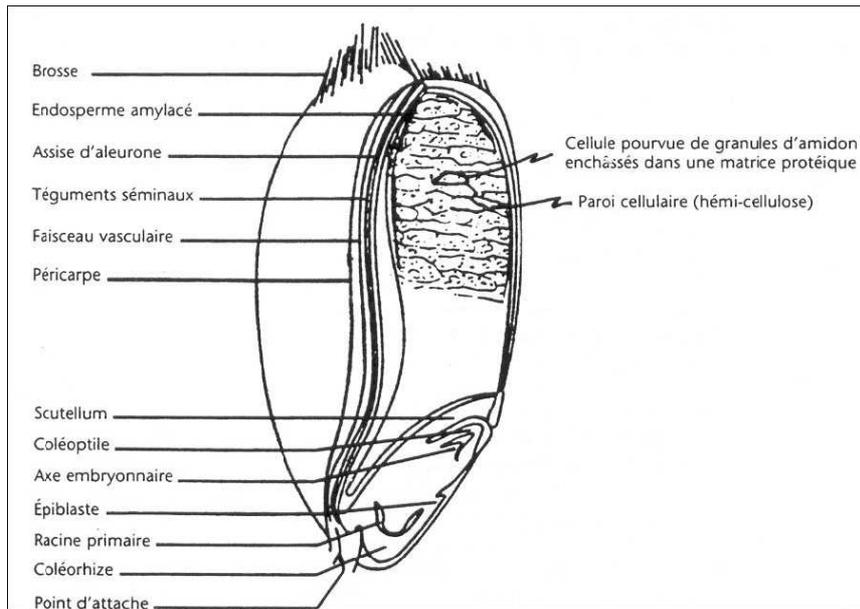
I 1 Mouture et histologie du grain

Les sons de céréales sont des coproduits de minoterie représentant avec la farine et le germe, l'une des trois fractions de la mouture. Selon les conditions de broyage, le son représente 10% à 20% du grain, mais le blé et le seigle ont des comportements différents (WEIPERT 1997).

D'un point de vue tissulaire, alors que le germe et la farine proviennent respectivement de l'embryon et de l'endosperme amylacé, le son est issu des parties externes du grain. Il est constitué du péricarpe, du tégument séminal et de la couche aleurone. Le péricarpe regroupe les enveloppes périphériques, le tégument séminal correspond à l'enveloppe de la graine et la couche aleurone se situe entre l'endosperme et les enveloppes périphériques. Le son est de plus généralement contaminé par des fragments d'endosperme qui ne se sont pas détachés lors du broyage. Une représentation schématique d'une coupe longitudinale de grains de blé et de maïs est donnée **figure 1**.

a)





b)

Figure 1 : Sections longitudinales d'un grain :
a) de maïs (tiré de CHANLIAUD 1995a)
b) de blé (tiré de BOUDREAU, 1992).

I 2 Composition chimique

Parmi les trois principaux constituants des grains de céréales que sont l'amidon, les polysaccharides autres que l'amidon, et les protéines, ce sont les seconds qui se retrouvent majoritairement dans le son. Ils peuvent représenter entre 35% et 49% poids/poids chez le blé selon les cultivars et les conditions de culture (NILSSON 1996,1997, HÄRKÖNEN 1997, BACH KNUDSEN1997). Le grain de seigle contient généralement moins d'amidon et de protéines que celui de blé mais davantage de polysaccharides autres que l'amidon (AMAN 1995). Ces derniers sont avec les protéines et les lignines, les constituants des parois cellulaires. Celles-ci sont structurées sur la base d'une phase cellulosique micro-fibrillaire enchâssée dans une matrice composée de différents polysaccharides non cellulosiques parmi lesquels les hétéroxylanes et les β - glucanes sont majoritaires, les premiers représentent environ 40% du poids de matière sèche. La composition osidique de ces polymères pariétaux est reportée dans le **tableau 1** dans le cas du blé (STEVENS 1988).

Tableau 1 : Composition osidique des polymères pariétaux de blé.

	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Acides uroniques
% poids/poids	17,5	28,6	0,7	1,2	19,5	6,3

Les parois cellulaires de la couche aleurone constituent 40% à 50% du poids sec des parois cellulaires de son et possèdent la composition osidique représentée dans le **tableau 2** (BASIC 1981).

Tableau 2 : Composition osidique des polysaccharides de la couche aleurone de blé.

	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
% poids/poids	17	48	1	30	31

Les constituants majeurs sont des arabinoxylanes et des β - glucanes réticulés par des esters phénoliques. La cellulose y est inférieure à 3% du poids sec et il n'y a pas de lignine. L'étude de la microstructure et de la composition biochimique fine de la couche aleurone du grain de blé a fait l'objet de nombreux travaux dont la synthèse a été réalisée par ANTOINE (2002). Les polymères majoritaires des parois cellulaires des couches externes constituant le péricarpe sont des glucuronoarabinoxylanes, des complexes arabinoxylanes – xyloglucanes, de la cellulose et des composés polyphénoliques (DUPONT 1987).

La composition osidique des parois cellulaires de ces enveloppes externes est représentée dans le **tableau 3** (DUPONT 1987).

Tableau 3 : Composition osidique des polysaccharides de péricarpe de blé.

	Ara	Xyl	Gal	Glc
% poids / poids	30,6	29,5	2,4	33,5

On constate que contrairement à la composition osidique des parois cellulaires de la couche aleurone, le rapport Ara/Xyl est très supérieur (1,04 contre 0,35). Les associations de certains arabinoxylanes et de la cellulose à la lignine ainsi que la réticulation des complexes

xyloglucanes et β - glucanes par des esters phénoliques rend les polymères du péricarpe plus résistants à l'hydrolyse que ceux de la couche aleurone.

I 3 Les hétéroxylanes des parois cellulaires.

Les hétéroxylanes constitutifs des polysaccharides pariétaux appartiennent à la famille des hémicelluloses. D'un point de vue structural, ils se caractérisent par un squelette polymérique linéaire de résidus β -D-xylopyranoses liés en 1 \rightarrow 4, **figure 2**.

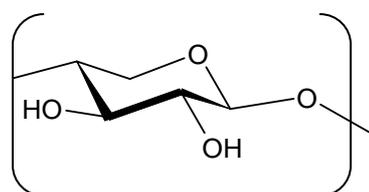


Figure 2 : Structure du résidu β -D-xylopyranose.

Les groupements 1 et 4 du xylose, à l'opposé du cycle pyranosique sont en position diéquatoriale et la liaison glycosidique β -(1 \rightarrow 4) est pratiquement parallèle à l'axe de la molécule (ATKINS 1992). La chaîne possède ainsi une conformation relativement étendue en hélice à 3 cycles de xylose par tour, **figure 3**.

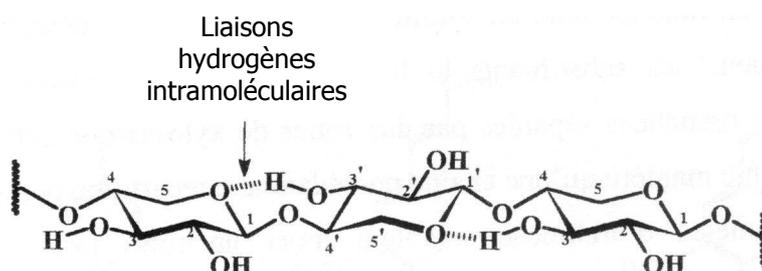


Figure 3 : Structure hélicoïdale de xylane linéaire.

Cette conformation hélicoïdale confirmée par spectroscopie de diffraction des RX (YUI 1995) n'est stabilisée que par une seule liaison hydrogène qui s'établit entre l'hydrogène du groupement hydroxyle en position 3 d'un résidu xylose et l'oxygène en position 5 du cycle suivant (MARCHESSAULT 1962).

Les résidus β -D-xylopyranosyles du squelette polymérique sont généralement substitués par différentes chaînes latérales dont la nature et les proportions sont des caractères structuraux de différenciation des hétéroxylanes. Les structures des oses neutres et acides constitutifs de ces branchements sont représentées **figure 4**.

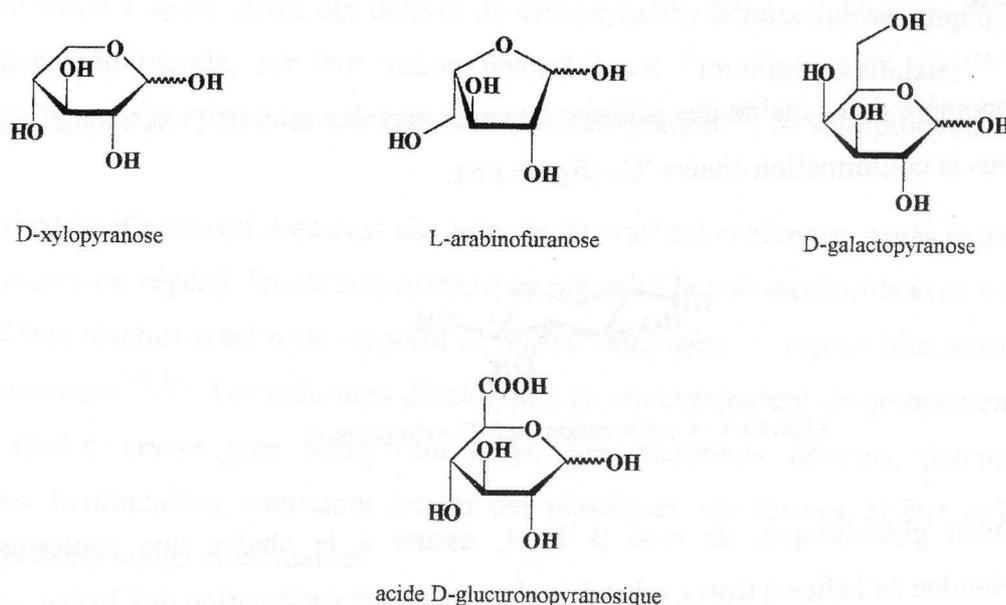
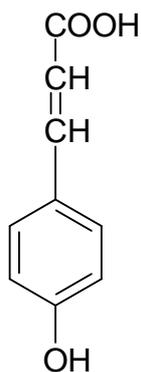
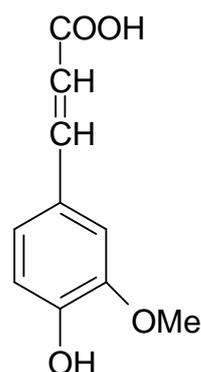


Figure 4 : Structure des principaux oses constitutifs des hémicelluloses de céréales

Le substituant majeur est l' α -L- arabinofuranose qui est le plus souvent fixé en O-3 des xylooses et plus rarement en O-2 (PERLIN 1951 ; MONTGOMERY 1955 ; BRILLOUET 1987). L' α -L-arabinofuranose peut être lui-même estérifié par un acide phénolique, coumarique ou férulique, dont les structures sont représentées **figure 5** (MUELLER-HARVEY 1986 ; SMITH 1983 et SAULNIER 1995). Les arabinoses substitués peuvent être en position terminale (HARTLEY 1989) ou à l'intérieur d'une chaîne latérale. Ils peuvent représenter de 0,6% à 4% de la masse des parois cellulaires.



Acide *p*-coumarique
(Acide 3-(4-hydroxyphényl)-2-propénoïque)



Acide férulique
(Acide 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-2-propénoïque)

Figure 5 : Principaux acides phénoliques des parois de céréales.

L'acide α -D-glucuronopyranosique et sa forme 4-O méthylée sont des substituants également rencontrés (BRILLOUET 1982 et 1987). Ils sont liés sur les O-2 et plus rarement sur les O-4 des xyloses et constituent généralement moins de 2% des hétéroxylanes mais on a trouvé des taux de 9% dans certains sons de blé (ADAMS 1955) et dans des sons de maïs (WOLF 1953 ; SAULNIER 1993). Quelques publications rapportent la présence de substituants O-acétyles en O-2 ou O-3 du xylose (WILKIE 1979).

Au-delà de ces substituants monomériques une variété de chaînes latérales di et trimériques ont été identifiées. Elles peuvent inclure des xyloses, des arabinoses et des acides glucuroniques. La présence de résidus galactoses a également été citée, ils se trouvent le plus souvent en position terminale sur la chaîne latérale liés en β -(1 \rightarrow 4) aux xyloses et β -(1 \rightarrow 5) aux arabinoses (BUCHALA 1972 ; MONTGOMERY 1957 ; SRIVASTAVA 1957). Le taux global de substitution des xyloses du squelette polymérique peut atteindre des valeurs supérieures à 50% pour les hétéroxylanes du péricarpe. Les xyloses peuvent être disubstitués, leur teneur pouvant aller jusqu'à 30% des xyloses totaux dans le son de blé (SHIIBA 1993).

I 4 Propriétés nutritionnelles des hétéroxylanes

Les hétéroxylanes, constituants majeurs des polysaccharides non cellulosiques (40% du poids de matière sèche) représentent un apport important en fibres diététiques. Ce terme,

introduit par HIPSLEY en 1953 regroupe les constituants alimentaires non digestibles. Les fibres diététiques peuvent être définies sur la base de deux critères : l'un physiologique et l'autre chimique. Selon le premier critère ce sont des constituants alimentaires résistants à la dégradation par les enzymes digestives des mammifères (TROWELL 1976). Selon le second critère, elles représentent l'ensemble des polysaccharides autres que l'amidon et les lignines (THEANDER 1994). Leur représentativité en gramme par kg de matière sèche dans le blé, le seigle et le maïs sont données dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Représentation, en g.kg⁻¹ de matière sèche, des fibres diététiques (FD) et leurs composition en lignines et polysaccharides autres que l'amidon (PAA) dans le blé, le seigle et le maïs. (BACH KNUDSEN 1997).

	PAA	Lignines	FD
Blé	119	19	138
Seigle	152	21	173
Maïs	97	11	108

D'un point de vue nutritionnel, compte tenu de leurs propriétés physicochimiques telles que hydratation, viscosité et capacité d'absorption, les fibres diététiques peuvent influencer aussi bien les propriétés rhéologiques du contenu gastrointestinal que les processus de digestion et d'absorption (GUILLON 2000). Dans l'estomac et l'intestin grêle, les fibres ont une action essentiellement physique. Les fibres solubles telles que les β -glucanes augmentent la viscosité et de ce fait contribuent à ralentir la vidange gastrique (EDWARD 1996). Dans l'intestin grêle, la présence de polysaccharides visqueux affecte le contact des substances alimentaires avec les enzymes digestives, ce qui a pour conséquence de diminuer la vitesse de digestion des glucides (Mac DOUGALL 1996). L'augmentation de la viscosité a également pour effet de ralentir l'absorption des nutriments. Par ailleurs les fibres peuvent avoir un effet sur le cholestérol sanguin (CUMMING 1995a). Dans l'estomac, en activant l'excrétion de l'acide gastrique et des hormones digestives, elles augmentent l'impression de satiété et de ce fait peuvent contribuer à limiter l'obésité (CUMMING 1995 ; Mac DOUGALL 1996).

Compte tenu des durées de transit supérieures dans le gros intestin, il existe une grande densité bactérienne représentant plus de 500 espèces. De ce fait certains constituants des fibres peuvent servir de substrat à ces colonies bactériennes. Il existe une relation entre le site

de dégradation et le type de polysaccharides dégradés. Ainsi, au niveau du caecum, ce sont les β - glucanes et les arabinoxylanes solubles qui sont préférentiellement dégradés (BACH KNUDSEN 1993 ; GLITSO 1998). La grande capacité de liaison avec les molécules d'eau entraîne le gonflement de ces structures, ce qui a pour effet d'en augmenter la surface donc d'accroître la colonisation bactérienne et la dégradation. D'autres polysaccharides insolubles peuvent également être dégradés dans le gros intestin, c'est le cas notamment de xylanes linéaires de cellules aleurones de seigle ; la cinétique est lente mais la dégradation est totale. Les xylanes et arabinoxylanes issus des tissus plus lignifiés de péricarpe sont beaucoup plus résistants (GLITSO 1999).

La fermentation bactérienne de certains constituants des fibres conduit à la formation de nombreux produits qui jouent un rôle dans la physiologie du gros intestin et dans le métabolisme. Parmi eux, les acides gras à courtes chaînes (AGCC) diminuent le pH et altèrent ainsi l'équilibre de la flore intestinale du côlon. Leur nature dépend de celle des polysaccharides fermentés (ENGLYST 1987).

En résumé, la consommation de fibres diététiques peut non seulement stimuler la croissance de la flore intestinale et la production d'AGCC mais aussi avoir une action mécanique. La résultante de ces effets se manifeste par un accroissement de la masse fécale et par une réduction de la durée du transit intestinal (KUAN 1983 ; POTKINS 1991 ; GLITSO 1999). Ces effets sont modulés par la composition des fibres ingérées et atteignant le gros intestin. Ainsi, les polysaccharides facilement dégradables n'accroissent que faiblement la masse fécale par l'augmentation de la biomasse alors que l'accroissement est supérieur d'un facteur 3 environ avec les fibres plus résistantes. Outre cet effet sur la masse fécale, les fibres diététiques peuvent se lier à des composés néfastes pour la santé et les éliminer au niveau du côlon (ASP 1993 ; EDWARDS 1995 ; FELDHEIM 1995 et Mac DOUGALL 1996). Selon une littérature abondante, les régimes riches en fibres pourraient diminuer les risques de maladies cardiovasculaires et de certains cancer (REDDY 1995 ; HILL 1998 ; JENKINS 1998 ; FUCHS 1999 ; JACOBS 1998 ; ANDERSON 2000 ; SLAVIN 2000_{a,b}). La production d'acide butyrique semble être l'une des causes de modulation de la cancérogenèse au niveau du côlon (RUSSO 1999).

II Production et caractérisation d'oligosaccharides d'hétéroxyanes

Les hétéroxyanes majoritairement constitutifs de coproduits de l'agriculture, sont aujourd'hui considérés comme des molécules d'intérêt industriel en tant que tels et par les nombreux dérivés que l'on peut en tirer par différents procédés physiques, chimiques ou enzymatiques. Ces produits trouvent des applications dans des domaines aussi différents que l'industrie des plastiques, celle des cosmétiques l'agroalimentaire et la santé. Ils sont un parfait exemple d'illustration du concept de « Biomass refining ». Il est donc nécessaire de les extraire avec les meilleurs rendements possibles et avec le minimum de modifications structurales.

II 1 Extraction des hétéroxyanes

De nombreuses stratégies ont été imaginées pour isoler les hémicelluloses à partir de différentes sources de biomasse (EBRINGEROVA. 2000). Les techniques d'extraction permettent de les séparer en deux familles : celles qui sont solubles dans l'eau et celles qui y sont insolubles. Dans le blé, les premières contiennent des arabinoxylanes moins substitués par l'arabinose (MAES 2002). Ce faible degré de substitution est lié à une plus grande proportion de résidus xyloses non substitués et une plus faible proportion de xyloses disubstitués (DELCOUR 1999). Une méthode générale pour les extraire a été décrite par BENGTTSSON (1990). Ces hémicelluloses solubles représentent une faible part et peuvent être extraites à l'eau chaude (MAES 2002). Un mélange DMSO à 90% dans l'eau a révélé une meilleure efficacité sans apporter de modifications chimiques (SAAKE 2001).

L'utilisation des ultrasons comme méthode physique d'aide à l'extraction des hémicelluloses de sons de maïs et de balle de blé noir a également été citée (EBRINGEROVA 2002 ; HROMADKOVA 2003).

Etant donné que dans les sons de céréales les arabinoxylanes sont physiquement et chimiquement associés entre eux, aux lignines et à la cellulose, la plus grande partie constitue la deuxième famille et ne peuvent être extraits qu'en milieu alcalin. Un traitement au peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin a été mis au point par DONNER (1997 ; 1998) pour

extraire les hémicelluloses de fibres de maïs et par MAES (2001) pour extraire des polysaccharides de son de blé. Un traitement acide permettrait d'obtenir des taux de solubilisation supérieurs, mais entraînerait une forte dépolymérisation (BARL 1991). Les traitements enzymatiques directs par des xylanases, des arabinases et cellulases donnent de faibles taux (15% sur des sons de maïs) et ceci d'autant plus que le degré de substitution des xyloses est élevé. A noter toutefois que lors d'une étude récente dont l'objectif n'était pas d'extraire spécifiquement des hétéroxylanes, le groupe de POUTANEN a utilisé un traitement enzymatique xylanolytique sur un son de seigle préalablement extrudé. Le but étant de produire différentes fractions testées quant à leur fermentation par la flore intestinale et la bioconversion de leur lignanes (AURA 2005). Le mode opératoire couramment utilisé pour le traitement alcalin consiste en une mise en suspension du tissu végétal à température et durée contrôlées et à pH d'au moins 10,5 (WOLF 1953). L'extrait est ensuite neutralisé et les hétéroxylanes sont alors précipités par addition d'éthanol. Le principe d'action de la base est de créer des trous à la surface du péricarpe (PARADEZ – LOPEZ 1982), il s'en suit un gonflement des parois cellulaires qui peuvent alors contenir sept fois leurs poids en eau. Ce gonflement est corrélé positivement au rendement d'extraction (WOLF 1953).

L'extraction alcaline peut induire des modifications structurales des hétéroxylanes. Il peut ainsi se produire des désestérifications entraînant des déacétylations de résidus xylose (GABRIELI 2000), des pertes d'acides phénoliques et des fonctions méthyle portées par les acides uroniques ; ceci peut être à l'origine de la séparation des hétéroxylanes des autres constituants des parois cellulaires (WHISTLER 1970). Par ailleurs une oxydation des groupements hydroxyles libres de l'extrémité réductrice peut se produire en entraînant un phénomène de dégradation récurrente jusqu'à un point de ramification de la chaîne. Enfin les bases concentrées présentent l'avantage d'agir plus rapidement mais peuvent provoquer des dégradations partielles des polysaccharides (WILKIE 1985). De plus, à chaud, elles peuvent agir sur les substituants sensibles à la β - élimination tels que les acides uroniques (ASPINALL 1959).

Un grand nombre de travaux relatant divers procédés d'extraction d'hétéroxylanes de céréales ont été publiés. En 1995, CHANLIAUD a réalisé une étude de l'extraction alcaline, optimisée par plan d'expériences, d'hétéroxylanes de maïs. (CHANLIAUD 1995_{ab}). Au cours de cette étude, il a été montré que le rendement d'extraction dépend fortement de la nature de

la base utilisée (NaOH, KOH, Ca(OH)₂) sans toutefois expliquer le rôle du cation. La durée du traitement a moins d'influence sur le rendement, les études cinétiques ayant montré que l'extraction était complète après 2 heures avec KOH 1,05 M. Par contre, dans le cas de Ca(OH)₂, la durée de l'extraction affecte le rendement du fait de la faible solubilité de la base qui, de plus, diminue lorsque la température augmente, contrebalançant ainsi l'effet de cette dernière sur le rendement. La température et avec la concentration en ions hydroxyle les deux paramètres majeurs dans le cas de KOH. Les conditions optimales d'extraction déterminées lors de cette étude correspondent à une concentration en base de 1,2 M, une température de 100°C et une durée de 2 h dans le cas de KOH et 1% poids/volume, 95°C et 16h pour Ca(OH)₂.

Une grande diversité de procédures d'extraction a par la suite été publiée (HROMADKOVA 2003 ; IZYDORCZYK 1995 ; NILSSON 1996 ; OSCARSSON 1996 ; SUN 1996 ; DONER 1997 ; FANG 1999,2000). Certains procédés étant applicables à l'échelle pilote (ANNISON 1992 ; FAUROT 1995 ; GLASSER 1995 ; BATAILLON 1998). Certains auteurs ont utilisé un pré-traitement enzymatique par des amylases et des protéases pour éliminer l'amidon et les protéines du substrat de départ. (IZYDORCZYK 1998 ; BUCHANAN 2002). Dans le même objectif il est possible de réaliser une étape de délignification préalable au chlorite de sodium pour faciliter l'extraction alcaline ; celle-ci peut être améliorée par une préhydrolyse douce (GABRIELII 2000 ; GLASSER 2000, GUSTAVSSON 2001). Les rendements d'extraction alcaline des hémicelluloses sont généralement reportés comme étant de l'ordre de 50% de la masse d'hémicellulose disponible, un rendement de 91% a été obtenu par SUN (2002) à partir de paille d'orge grâce à un procédé reposant sur 8 étapes avec NaOH, H₂O₂ et KOH.

Pour finir nous citerons deux études récentes faisant l'objet de processus d'extraction d'hétéroxylanes mis en œuvre à des fins de comparaison pour la première et de valorisation de co-produit de céréales pour la seconde.

Afin d'évaluer l'effet du procédé d'extraction d'arabinoxylanes d'orge sur le rendement et la perturbation des structures polysaccharidiques obtenues, HÖJJE (2005) a comparé quatre méthodes simples d'extraction alcaline. Chacune d'elles met en œuvre un pré-traitement différent (HCl, HCl/NH₄OH, enzymatique), deux de ces pré-traitements étant suivis d'un procédé de délignification à l'éthanol ou au chlorite de sodium. En conclusion de cette étude,

les auteurs recommandent le pré- traitement par HCl suivi de l'action du chlorite de sodium avant l'extraction alcaline proprement dite. Cette combinaison leur permet en effet d'obtenir le meilleur rendement, soit 57% des arabinoxyanes disponibles dans le grain d'orge sec.

Enfin, dans un objectif de valorisation de déchets de brasserie et de son de blé, MANDALARI (2005) utilise un procédé d'extraction en sept étapes. Le résidu de matière brute insoluble dans l'alcool est successivement traité à l'eau froide (4°C, 2h.), à l'eau chaude (80°C, 2h.), au carbonate de sodium plus borohydrure de sodium (4°C, 16h.). Un second traitement est réalisé avec ce même mélange mais à la température ambiante pendant 2 heures, à la potasse 0,5M, puis à la potasse 1M et enfin 4M dans les mêmes conditions de température et de durée. Après chaque traitement une séparation liquide solide par filtration ou centrifugation permet d'isoler une fraction qui est lyophilisée et un résidu qui est soumis au traitement suivant. Les auteurs obtiennent ainsi, dans huit fractions qu'ils caractérisent physico chimiquement, l'ensemble des arabinoxyanes extractibles de chacune de ces deux sources de produits valorisables.

II 2 Dépolymérisation des hétéroxylanes

A l'exception du cas de l'inuline pour les fructoses, il est admis que les propriétés prébiotiques des glucides sont le plus souvent associées à des mélanges d'oligosaccharides de DP < 20, les DP de 2 à 7 étant le plus souvent cités. Il est donc nécessaire d'utiliser des procédés de dépolymérisation si l'on veut produire des oligosaccharides d'intérêt prébiotique.

Différentes méthodes ont été utilisées pour dépolymériser les hétéroxylanes. Les premières utilisées étaient des hydrolyses acides partielles des liaisons β -(1→4) du squelette xyranique, elles font appel à des acides forts tels que H₂SO₄ plus ou moins dilué dans des conditions de température et durée adaptées à la structure de l'hétéroxylane de départ, ou encore des acides faibles comme le TFA. Toutefois il a été constaté que lorsque l'hydrolyse était poussée il pouvait apparaître des produits secondaires inhibiteurs potentiels de la fermentation (SAHA 2000), ce qui peut être très défavorable pour la production de prébiotiques dont l'un des critères de qualification est leur aptitude à être fermentés par la microflore intestinale. Ainsi SUN (2002) a purifié plusieurs xylooligosaccharides de DP 2 à 15 dans le but de rechercher les substrats parfaitement connus utilisables en enzymologie des

xylanases. Ces molécules sont produites par hydrolyse acide ménagée avec H_2SO_4 , 0,125M à 90°C pendant 15 minutes, de xylanes préalablement obtenus par extraction alcaline de graines de coton.

La dépolymérisation peut également résulter de la combinaison d'une hydrolyse acide ménagée suivie d'une hydrolyse enzymatique, ce procédé est souvent nécessaire pour dépolymériser des hétéroxylanes fortement branchés dont l'accessibilité à l'hydrolyse enzymatique directe est donc limitée.

La méthode physique d'explosion à la vapeur a été surtout appliquée directement au substrat végétal de départ, mais une méthode très douce, donc d'un grand intérêt pour les applications alimentaires, est l'autohydrolyse encore connue sous l'appellation traitement hydrothermique. Elle a surtout été utilisée sur les substrats bruts mais elle peut être appliquée à des fractions préalablement enrichies en hétéroxylanes. Développée par le groupe PARAJO (GARROTE 1999, VAZQUEZ 2001, GARROTE 2002, PARAJO 2004, GARROTE 2004 et CARVALHEIRO 2004), elle induit une dépolymérisation sélective du squelette xylanique avec production majoritaire de xylooligosaccharides. Lorsqu'elle est appliquée directement au substrat de départ elle peut induire des réactions secondaires produisant des monosaccharides, des produits de décomposition osidique et la dépolymérisation simultanée des lignines.

Les conditions opératoires pour un objectif de production oligosaccharidique donnée dépendent de la présence d'autres substrats dans le matériel de base traité ou de la nature, du nombre et de la distribution des substituants sur des hétéroxylanes préisolés (KABEL 2002_{abc}). Certains modèles cinétiques ont été proposés pour ce type de dégradation hydrolytique (GARROTE 1999 ; 2002 ; VILA 2002). Le mécanisme repose sur la rupture de la liaison osidique catalysée par les ions hydronium. La réaction se fait selon une cinétique à deux niveaux (CARRASCO 1992) attribués à la présence de deux fractions substrat de susceptibilités différentes à l'hydrolyse (KOBAYASHI 1956). L'hypothèse de l'existence de deux fractions se justifie d'une part par les limitations de transfert de masse et de chaleur dans les substrats partiellement hydrolysés, d'autre part des problèmes d'accessibilité et de différences de réactivité dues à des différences de composition et de degré de substitution.

La fraction d'hétéroxylanes la plus susceptible à l'hydrolyse dépend du substrat de départ et des conditions opératoires. L'interprétation mathématique de la production d'oligomères pendant l'autohydrolyse considère que la rupture d'une liaison osidique conduit à différents produits mono ou oligosaccharidiques, selon la position de la liaison rompue. A

partir d'un taux d'hydrolyse suffisant des polymères de départ, ce sont les oligomères qui apparaissent majoritaires dans le milieu réactionnel. Le premier niveau de la réaction conduit à des oligomères de DP assez élevé, qui sont ensuite dégradés en fragments de taille inférieure puis éventuellement en monomères. Dans les conditions opératoires les plus drastiques, les pentoses peuvent être déshydratés en furfurals qui peuvent eux-mêmes se décomposer.

Parmi les méthodes de dépolymérisation douces, les hydrolyses enzymatiques ont malgré tout été les plus utilisées. La complexité structurale et l'hétérogénéité de substitution des hétéroxylanes nécessiteraient l'action de plusieurs enzymes pour arriver à une déstructuration complète. Les enzymes de dépolymérisation sont les xylanases, endo- β -1, 4-xylanases ou β -1, 4-D- xylane xylanohydrolase (EC 3.2.1.8) et les β -xylosidases ou β -1, 4-D-xylan xylohydrolase (EC 3.2.1.37). De façon générale, les xylanases catalysent l'hydrolyse des liaisons xylosidiques internes et les xylosidases libèrent des résidus xylosyle par hydrolyse des liaisons osidiques terminales des xylooligosaccharides. Elles sont les seules à posséder une activité xylobiase. Les enzymes de « dégreffage » permettent d'hydrolyser les liaisons de chaînes latérales du squelette xylanique et d'éliminer certains autres substituants. Une dégradation complète par voie enzymatique dans le cas des hétéroxylanes de céréales nécessitera donc plusieurs autres enzymes. Les α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) permettent d'éliminer les résidus arabinosyl latéraux. Les acides glucuroniques peuvent être libérés par l'action d' α -glucuronidases (EC 3.2.1.139), alors que les acides féruliques le seront par les férulylestérases (EC 3.1.1.73). Les éventuels groupement acétyles substituant certains xyloses peuvent être éliminés par des acétyle estérases (EC 3.1.1.6) (BIELY 1985 ; SAHA 2000).

Lorsque les arabinoxylanes sont encore associés avec d'autres polysaccharides des parois cellulaires, l'utilisation de cellulases (EC 3.2.1.4) et d'endo β -1, 3 (4)-glucanases peut être nécessaire. Il est à souligner que l'utilisation des enzymes de dégreffage ne s'impose que lorsque l'objectif est l'obtention des monomères constitutifs en vue par exemple de la production d'éthanol par fermentation (SORENSEN 2005). Par contre lorsque l'objectif est de produire des xylooligosaccharides à partir d'hétéroxylanes, l'utilisation des xylanases peut suffire, mais dans les cas de degrés de substitution élevés en arabinose rencontrés dans le péricarpe de son de céréales par exemple, l'action d'une arabinases en synergie avec une xylanase peut être nécessaire pour accroître l'accessibilité du substrat à la xylanase (SORENSEN 2003 ; de VRIES 2000). Les résultats obtenus par ce dernier auteur quant au

taux de dégradation des pentosanes de blé insolubles dans l'eau, mettent en évidence une synergie entre endo-xylanase et xylosidase (accroissement d'un facteur 12), et un accroissement d'un facteur 2,5 est observé si le substrat est également soumis à l'action d'une arabinase.

II 2 1 Les xylanases

II 2 1 1 Classification

Une revue récente de COLLINS (2005), fait le point sur cette famille d'enzymes hydrolytiques, quant à la classification, les mécanismes catalytiques et les xylanases extrêmophiles qui sont actives à des températures de 5°C à 105°C, des pH de 2 à 11 et à des concentrations de 30% en NaCl. Différents critères de classification ont été proposés : la spécificité, les propriétés physicochimiques (poids moléculaire et pH isoélectrique WONG 1988). Aujourd'hui la classification a été élargie au groupe des glycosidases (EC 3.2.1.x) elle repose sur la structure primaire du domaine catalytique (HENRISSAT 2001). On connaît 96 familles de glycosidases (COUTINHO 1999) parmi lesquelles les familles 10 et 11 correspondent aux xylanases les mieux connues. Toutefois des enzymes xylanolytiques sont également trouvées dans les familles 5, 7, 8 et 43.

II 2 1 2 Mécanisme d'action

Les membres de ces 6 familles de xylanases diffèrent dans leurs propriétés physicochimiques, leur structure, leur mode d'action et leur spécificité. Les enzymes des familles 10 et 11 procèdent par un même mécanisme catalytique au cours duquel un intermédiaire covalent glycosylenzyme se forme en passant par un état de transition de type ion oxocarbenium (Mac CARTER 1994 ; ZECHEL 2000 ; RYE 2000). Deux résidus d'acide glutamique appartenant au site catalytique situés à 5,5 Å l'un de l'autre sont impliqués dans la formation de cet intermédiaire covalent. Dans une première étape, l'un des deux agit comme un catalyseur acide en protonant le substrat alors que l'autre assure l'attaque

nucléophile qui conduit à la formation de l'intermédiaire et au départ du premier produit de la réaction d'hydrolyse. Au cours de la deuxième étape, le premier glutamate se comporte comme une base fixant le proton apporté par la molécule d'eau qui attaque le carbone anomérique. Ceci conduit à une seconde substitution passant à nouveau par un état de transition de type ion oxocarbenium. Les deux inversions opposées du carbone anomérique, $\beta \rightarrow \alpha$ au cours de la première étape puis $\alpha \rightarrow \beta$ au cours de la seconde étape, résultent en une rétention de la configuration anomérique.

II 2 1 3 Spécificité

Plusieurs travaux ont été publiés quant à la spécificité d'action des xylanases des familles 10 et 11. Certains sont relatifs à une action directe sur des sons de céréale (MAES 2004 ; BEAUGRAND 2004) ou sur des arabinoxylanes préalablement extraits de son ou de farine de céréale (COURTIN 2001 ; VARDAKOU 2003).

Il ressort de ces différentes études que les produits libérés par l'hydrolyse catalysée par les enzymes de la famille 10, sont de taille plus faible que ceux engendrés par les xylanases de la famille 11 ce qui indique un plus grand nombre de sites reconnus par les xylanases 10. De plus ces dernières sont plus actives sur les arabinoxylanes solubles. A l'inverse les xylanases 11 ayant une plus grande aptitude à pénétrer les polymères réticulés des parois cellulaires sont mieux adaptés à l'hydrolyse directe de sons bruts ce qui est en accord avec une affinité 2 fois supérieure et un turn over 6,8 fois plus élevé à l'égard de ce substrat brut. Il n'a par ailleurs été constaté aucun effet de synergie entre les 2 familles d'enzymes pour l'hydrolyse d'arabinoxylanes de son de blé, l'action simultanée de xylanases 10 et 11 n'induit pas de modification du profil de l'hydrolysate par rapport à l'action de la seule xylanase 10.

II 2 1 4 Origines

Elles sont produites par un grand nombre d'organismes comprenant des bactéries, des moisissures, des algues, des protozoaires et des gastéropodes. Mais ce sont les microorganismes qui sont les plus exploités (GILBERT 1993). Parmi eux *Aspergillus niger* produit 15 xylanases extracellulaires, et *Trichoderma viride* en produit 13 (BIELY 1985 ; de VRIES 2001). Sans vouloir établir une liste exhaustive, on peut également citer *Bacillus*

subtilis (YUAN 2005a) et *Trichoderma longibrachiatum*. Certains de ces microorganismes sont issus du rumen.

II 2 2 Caractérisation des oligosaccharides issus de dépolymérisation

Les hydrolysats obtenus par les méthodes de dépolymérisation décrites au paragraphe précédent sont généralement complexes. Une simplification de ces mélanges par différentes méthodes séparatives est donc nécessaire. Les plus couramment utilisées sont la chromatographie d'exclusion moléculaire soit en basse pression soit à haute performance (HPSEC) et la chromatographie haute performance d'échange d'anions (HPAEC) pour les mélanges contenant des oligosaccharides acides. La chromatographie haute performance en phase normale greffée est très résolutive mais seulement dans le domaine des faibles DP. De façon marginale on peut citer la chromatographie en couche mince (CCM) et l'électrophorèse (FACE : pour fluorophore – assisted carbohydrate electrophoresis).

Pour des séparations à l'échelle préparative les techniques membranaires ultrafiltration et diafiltration s'imposent. La plupart de ces techniques séparatives sont décrites dans la partie « Matériels et Méthode » de ce mémoire.

La caractérisation proprement dite fait appel aux techniques classiques d'analyse chimique des sucres et notamment le couplage CPG / SM pour établir les compositions osidiques. Elle repose aujourd'hui surtout sur les deux techniques physiques d'analyse structurale que sont la spectrométrie de masse (SM) et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette dernière, indispensable à la détermination de la structure complète d'un oligosaccharide n'est applicable qu'à des molécules quasiment purifiées (KABEL 2002_b). La spectrométrie de masse en modes MALDI et ESI quant à elle est tout à fait bien adaptée à l'analyse des distributions de taille des oligosaccharides en mélange. En outre grâce à la connaissance des voies de fragmentations que l'on peut induire sur un ion pseudomoléculaire d'oligosaccharides aussi bien après ionisation laser qu'électrospray (analyse SM/SM) il est possible d'établir avec certitude l'existence de certains motifs structuraux (SAMUELSEN 1999 ; REIS 2002, 2003_{ab}, 2004 ; KABEL 2002_b ; BROBERG 2004). La SM en mode ESI

couplée directement à la chromatographie HPLC (HPAEC ou HPSEC) permet d'analyser des mélanges d'oligosaccharides encore plus complexes (BRÜLL 1998 ; DEERY 2001).

III Les oligosaccharides et l'alimentation fonctionnalisée

Depuis une décennie l'industrie agroalimentaire développe et met sur le marché des spécialités essentiellement laitières contenant essentiellement des bactéries lactiques et / ou des mélanges d'oligosaccharides, pour la plupart d'origine végétale. L'équilibre et le bon fonctionnement de la flore intestinale sont les effets bénéfiques majeurs annoncés de ces préparations. Toutefois les allégations santé avancées par les industriels ne sont pas encore toujours bien validées par les nombreux travaux scientifiques menés sur ces thématiques. Un grand nombre de ceux-ci font en effet appel à des tests *in vitro* qu'il n'est pas toujours évident d'extrapoler au vivant. D'autres effets sont également évalués tels que la régulation du système immunitaire intestinal ou le renforcement de la barrière intestinale. Il est donc important de connaître au mieux la flore intestinale chez l'homme sain ou l'animal.

III 1 La microflore intestinale

Alors qu'il est stérile *in utero*, le tube digestif est rapidement colonisé après la naissance. Dans les jours qui suivent, les divers compartiments digestifs servent de niches de colonisation. L'évolution physiologique et physicochimique du tube digestif est importante pendant les premiers mois après la naissance. Des interactions entre microorganismes et entre microorganismes et l'hôte jouent un rôle encore mal connu quant aux mécanismes moléculaires. Les microorganismes aérobies facultatifs préparent dans un premier temps l'écosystème pour les anaérobies qui constitueront par la suite, la flore dominante. La mise en place de la flore microbienne se stabilise d'un point de vue fonctionnel vers l'âge de deux ans (MACKIE 1999).

Le tube digestif mature héberge 10^{14} bactéries représentant plusieurs centaines d'espèces (MOORE 1974). Bien que des techniques d'étude *in situ* soient actuellement développées, (Technique FISH pour fluorescent *in situ* hybridization ou microscopie de fluorescence après hybridation *in situ*, LANDENDIJK 1995, O' SULLIVAN 1999), c'est la microflore fécale qui a été la plus étudiée donc mieux connue que celle des différents compartiments digestifs. Elle ne représente toutefois que la microflore luminale des parties distales du côlon et diffère de celle du côlon proximal (MARTEAU 2001). Grâce aux méthodes classiques de culture *in vitro*, il a été prouvé que les germes dominants de la microflore fécale cultivable sont *bactéroïdes*, *eubacterium*, *ruminococcus*, *clostridium* et *bifidobacterium* (MOORE 1974). Toutefois on estime que 70% à 80% de la biomasse bactérienne fécale est non cultivable (SUAU 1999). Les techniques de biologie moléculaires dont les premiers travaux ont été réalisés par WILSON (1996) et SUAU (1999) ont permis d'élargir notre champ d'investigation. D'un point de vue qualitatif, grâce au séquençage de l'ADN ribosomal 16S on a pu constater une très grande complexité de la flore, mais dont le profil est spécifique à chaque individu (MANGIN 2004). Cette approche a également permis de découvrir que pour un individu donné, la microflore fécale dominante était très stable au cours du temps (SEKSIK 2003, VANHOUTTE 2004). Ce constat traduit une aptitude à résister à l'influence de facteurs endogènes ou exogènes. Ainsi des souris à flore humaine retrouvent un profil de flore initial quelques jours après l'arrêt d'un traitement antibiotique (BARC 2004).

Il a enfin été constaté un accroissement de la complexité de la flore avec l'âge. La flore sous-dominante est beaucoup moins stable au cours du temps. D'un point de vue quantitatif on considère que les bactéries dominantes sont celles qui représente 1% ou plus des bactéries totales. La connaissance des séquences d'ADN ribosomal 16S a permis de développer des outils moléculaires de quantification de la microflore dominante fécale. Les résultats obtenus ont quelque peu modifié nos points de vue sur l'écosystème microbien intestinal humain. Trois groupes phylogénétiques s'imposent : celui de *Eubacterium rectale* et *Clostridium coccoïdes* représentant 15% à 31% des bactéries totales (FRANKS 1998, JANSEN 1999, RIGOTTIER-GOIS 2003) ; il regroupe les espèces appartenant aux genres *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus* et *Butyrivibrio*. Le second groupe est celui de *Clostridium leptum* représentant 16% à 22% (SGHIR 2000). Le troisième est celui des *bactéroïdes* et des microorganismes associés tels que ceux du genre *porphyromonas* avec 9% à 42% des bactéries totales. Enfin, moins largement représenté, on trouve le groupe des bifidobactéries, de 0,7% à 10% et des entérobactéries, 0,4% à 1%, avec les lactobacilles et les streptocoques.

Le poids relatif de chacun de ces groupes est très variable d'un individu à l'autre, il n'est donc pas possible de définir un profil de flore normal chez l'homme adulte sain.

Il est par ailleurs établi que la composition de la flore est modifiée chez le sujet âgé (MITSUOKA 1992) avec une diminution des bifidobactéries, une augmentation des entérobactéries et des bactéries lactiques qui deviennent dominantes et des clostridies.

Dans les situations de pathologies intestinales telles que diarrhées infectieuses ou maladies inflammatoires chroniques, on connaît assez bien les microorganismes pathogènes responsables (*Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* et *Campilobacter*) et leur mode d'action (TUOHY 2003). A l'inverse peu d'études ont été réalisées sur les déséquilibres engendrés sur la flore intestinale. On constate simplement que les flores de sujets sains et de sujets atteints de certaines affections intestinales sont significativement différentes (FUJITA 1990, SEKSIK 2003).

En conclusion on peut dire que chez l'homme sain, la très grande diversité d'espèces bactériennes et une certaine coopération métabolique permettent la stabilité écologique et l'homéostasie de la microflore intestinale. Dans leur état d'équilibre optimal les colonies bactériennes intestinales constituent une barrière efficace contre les invasions pathogènes. Il est communément admis qu'un certain nombre de fonctions biologiques associées à la flore intestinale en relation avec son environnement jouent un rôle dans la protection contre la colonisation de l'intestin par des microorganismes pathogènes. Parmi ces fonctions on peut citer la compétition pour les nutriments et pour les sites d'adhésion à la muqueuse intestinale, la production de substances antimicrobiennes (bactériocines ou antibiotiques), l'abaissement du pH par production de métabolites acides gras à chaînes courtes et enfin la stimulation du système immunitaire. Certaines de ces activités peuvent avoir un effet direct sur la santé de l'hôte.

En opposition avec le concept de « bonnes » et « mauvaises » bactéries, il semble en fait que la microflore « normale » de l'intestin soit plutôt à considérer comme un consortium en étroite relation avec et adapté à l'hôte. Tout facteur favorisant le maintien de cet équilibre ou sa résistance à la modification peut donc être considéré comme bénéfique.

Toutefois il est maintenant admis que les bifidobactéries et les lactobacilles jouent un rôle prépondérant dans ces relations complexes donc peuvent contribuer au maintien d'un bon

état de santé (TANNOCK 2002). Plusieurs stratégies ont donc été développées pour conforter l'action de ces bactéries dans l'intestin. L'une consiste à introduire par voie orale des microorganismes exogènes vivants dans l'intestin (FULLER 1992). Ces souches sont souvent d'origine humaine et choisies pour les activités qui leurs sont spécifiquement attachées. Cette approche repose sur le concept de probiotique. Une autre approche, qui peut être complémentaire de la première, consiste à stimuler la croissance et/ou l'activité des bifidobactéries et lactobacilles par l'apport de nutriments spécifiques, cette seconde stratégie repose sur le concept de prébiotique. L'apport simultané du probiotique et de son ou ses prébiotiques est bien évidemment concevable et conduit à la notion d'aliment fonctionnalisé symbiotique.

III 2 Les probiotiques

Depuis l'antiquité on a associé des effets bénéfiques sur la santé à la consommation de produits lactés dont on ne savait pas encore qu'ils contenaient des microorganismes vivants. Mais c'est lorsque l'on a pu avoir une approche microbiologique que l'on a attribué ces effets au maintien du bon équilibre de la microflore intestinale. METCHNIKOFF (1907) fut le premier à observer que la consommation de yaourt contenant des *lactobacillus* était associée à un accroissement de la longévité qui, selon lui, était dû à une diminution des bactéries intestinales produisant des toxines. Par la suite il a pu être montré que *Lactobacillus acidophilus* pouvait survivre dans l'intestin humain. (RETTGER 1921,1935 ; KOPELOFF 1926)

III 2 1 Définitions

Le terme probiotique a été utilisé pour la première fois par LILLY en 1965 pour décrire les substances secrétées par un microorganisme et qui stimulent la croissance d'un autre microorganisme. PARKER (1974) fut le premier à l'employer dans le sens actuel, avec toutefois une extension aux substances antibiotiques car, selon lui, un probiotique est « un organisme ou une substance qui contribue à l'équilibre microbien intestinal ». En 1989, FULLER révisé la définition de PARKER en postulant qu'un probiotique est « un supplément

alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'animal hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal ». Cette définition a été élargie par HAVENAAR en 1992 à « une culture simple ou mixte de microorganismes viables qui, ingérés en certains nombre exercent des bénéfices sur la santé au-delà de ceux dus à la nutrition de base ». Enfin en 2001, SCHREZENMEIR révisé à nouveau la définition et de façon très bien argumentée en l'élargissant aux produits contenant les microorganismes et en faisant apparaître la nécessité d'un nombre suffisant de bactéries ingérées, un probiotique devient alors « une préparation ou un produit contenant des microorganismes viables en nombre suffisants, qui altère la microflore (par implantation ou colonisation) dans un compartiment de l'hôte et de ce fait exerce des effets bénéfiques sur la santé ». Pour résumer toutes ces définitions la Food and Agricultural Organization des Nations Unies et l'Organisation Mondiale de la Santé ont établi en 2002 des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotique » dans les aliments et formulé la définition suivante : « Microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte ».

Le point commun de toutes ces définitions est « microorganismes vivants ». Or certaines études ont montré que des microorganismes tués ou des produits de leur métabolisme peuvent avoir des effets probiotiques. C'est le cas par exemple de la lactase de certaines bactéries lactiques pour les effets sur l'intolérance au lactose (SALMINEN 1998, MARTEAU 1990, RIZKALLA 2000). On peut également citer l'effet du lactosérum fermenté par *Bifidobacterium breve* sur l'accroissement de la population endogène des bifidobactéries et sur la diminution des activités nitroréductase et l'augmentation de l'activité galactosidase (ROMOND 1998, MULLIE 2002).

L'exemple le mieux connu de produit actif contenant des germes tués est la préparation pharmaceutique de nom commercial LACTEOL. C'est en fait un lactosérum fermenté par la souche *Lactobacillus acidophilus LB* puis inactivé thermiquement qui est actif contre les diarrhées infectieuses (XIAO 2003). Enfin, l'ADN de bactéries lactiques administré dans l'estomac ou par voie sous-cutanée agit sur la réponse immunitaire en réduisant l'inflammation de la muqueuse intestinale de façon comparable au mélange des probiotiques vivants ou tués administrés de façon intra-gastrique (RACHMILEWITZ 2004)

III 2 2 Survie des probiotiques

On constate donc que la survie dans le tractus digestif de bactéries ingérées vivantes n'est pas une condition *sine qua non* de l'induction d'effets bénéfiques. Malgré ces observations récentes peu nombreuses et quelquefois contradictoires, on estime aujourd'hui que les effets des probiotiques sont influencés par leur survie dans l'intestin et que par définition même ce doit être le tout premier critère de sélection d'un probiotique. La survie des bactéries probiotiques *in vitro* est influencées par la présence de métabolites tels que l'acide lactique, l'acide acétique, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (SAARELA 2000).

Bien que les différences existent entre souches et entre espèces, les lactobacilles sont considérés comme étant les plus résistants (KASHKET 1987). Parmi les différentes bactéries probiotiques, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus plantarum* ont des durées de vie supérieures à celles des bifidobactéries dans des laits fermentés (LEE 1995). De nombreuses études de survie dans l'intestin grêle et le côlon ont été menées sur un assez grand nombre d'espèces bactériennes telles que bifidobactéries, lactobacilles, bactéries du yaourt (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*), *Lactococcus lactis* largement utilisé comme vecteur de molécules d'intérêt thérapeutique dans le tube digestif (MERCENIER 2000), ou encore les propionobactéries et *Enterococcus faecium* utilisées entre autre dans le produit probiotique commercial GAIO.

Les résultats de ces études peuvent se résumer en plusieurs points :

- La quantité de probiotiques transitant vivants dans l'intestin dépend de la souche, de la dose ingérée, de facteurs propres à l'hôte et de l'aliment vecteur.
- Les résistances des probiotiques à l'acidité, aux sels biliaires et leur survie dans l'environnement digestif varient fortement en fonction de la souche.

A de très rare exceptions près (JOHANSSON 1993, ALANDER 1999), les bactéries ingérées persistent pendant la période de consommation et sont éliminées sans colonisation en quelques jours lorsque celle-ci s'arrête.

L'acidité gastrique et les sécrétions bilio-pancréatiques constituent les principaux mécanismes endogènes d'inactivation des bactéries ingérées. Le pouvoir tampon de l'aliment associé peut être un élément protecteur, la micro-encapsulation est une solution galénique

utilisée. La dose ingérée influence fortement les concentrations dans les différents compartiments du tube digestif par exemple les détections de *Lactobacillus rhamnosus* dans les fèces n'est possible qu'avec une consommation de 10^{10} UFC.mL⁻¹ (SAXELIN 1995). De nombreux auteurs avancent souvent les chiffres de 10^6 UFC.mL⁻¹ dans l'intestin grêle et de 10^8 dans le côlon pour obtenir des effets détectables.

III 2 3 Mécanismes d'action des probiotiques

Les premières démarches pour comprendre les modes d'action des probiotiques se sont focalisées sur la colonisation intestinale et l'induction de la suppression de la croissance et de l'invasion des microorganismes pathogènes (CLANCY 2003). Ces effets reposent sur les fonctions spécifiques à chaque probiotique : d'une part leur capacité d'adhérence aux cellules épithéliales, au mucus ou à la matrice extracellulaire, d'autre part leur capacité à produire des substances antimicrobiennes telles que bactériocines ou antibiotiques.

Les recherches actuelles s'orientent vers la compréhension d'autres mécanismes par lesquels les probiotiques et les métabolites qu'ils sécrètent activent et modulent les réponses immunitaires de l'hôte et les fonctions des cellules épithéliales intestinales. Plusieurs mécanismes moléculaires ont ainsi été postulés pour expliquer l'effet sur la fonction barrière aux pathogènes (RESTA- LENERT 2003, YAN 2002). Les probiotiques via leurs interactions avec les cellules épithéliales et immunitaires peuvent altérer les voies de transduction du signal, LAMMERS (2002) a montré que les cellules épithéliales pouvaient produire de l'interleukine – 8 en présence d'un pathogène comme *E.Coli* alors qu'elles n'en produisent pas en présence d'un probiotique. Des effets sur l'immunité systémique ont été prouvés par altération de l'immunité sur des sites aussi distants que l'appareil génital, l'appareil respiratoire ou la peau après administration orale de probiotiques. Ceci sans que le nombre de bactéries dans le côlon soit perturbé. C'est donc bien la preuve d'un effet direct sur la réponse immunitaire et non sur la colonisation. Des souches de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* peuvent ainsi être utilisées pour traiter des eczémas ou des dermatites chez le nourrisson (KALLIOMAKI 2003, KIRJAVAINEN 2003) et l'enfant (ROSENFELDT 2003).

III 2 4 Effets thérapeutiques des probiotiques.

III 2 4 1 Prévention des infections

Une revue récemment publiée par NOMOTO (2005) fait état des fonctions majeures de prévention des infections par certains probiotiques.

On citera :

- Les diarrhées à rotavirus chez le jeune, sensibles à *Lactobacillus rhamnosus GG* (GUANDALINI 2000), à *Lactobacillus reuteri SD 2222* (SHORNIKOVA 1997) à *Bifidobacterium Bb₁₂* et *Streptococcus thermophilus* (SAAVEDRA 1994).
- Les diarrhées induites par traitement antibiotique également sensibles à *Lactobacillus rhamnosus GG* (PANT 1996) mais aussi à *Bifidobacterium longum* (COLOMBEL 1987) et à *Enterococcus faecium* (BUYDEN 1996).
- Des entérites induites par *Campylobacter* peuvent être traitées par *Bifidobacterium longum*.
- La protection contre les infections postopératoires des voies digestives s'est avérée efficace lorsque *Lactobacillus plantarum 299V*, *Lactobacillus casei* (souche SHIROTA) et *Bifidobacterium breve* sont utilisés en association avec un prébiotique (RAYES 2002_{ab}, KANAZAWA 2005).
- Des pathologies infectieuses induites par *Helicobacter pylori* : des études sur modèle animal ont montré l'effet protecteur de plusieurs bactéries lactiques et bifidobactéries (KABIR 1997, COCONNIER 1998). Les études menées chez l'homme ont mis en évidence un effet d'assistance de la part de *Lactobacillus acidophilus* à l'éradication d'*Helicobacter pylori* par des drogues chimiques (CANDUCCI 2000).

III 2 4 2 Effets sur d'autres pathologies

Bien qu'il n'existe aujourd'hui aucune preuve expérimentale de suppression de cancers induite par la prise de probiotiques, un certain nombre d'études *in vitro* et sur l'animal tendent à établir un effet positif de certains probiotiques sur ces pathologies (RAFTER 2002, 2003). Certains mécanismes par lesquels les bactéries lactiques peuvent inhiber la cancérogenèse du côlon ont été avancés : l'altération des activités métaboliques de la flore intestinale, altération

des conditions physicochimiques du côlon, liaison et dégradation de produits potentiellement cancérigènes, modification qualitative et quantitative de la microflore soupçonnée de production de métabolites cancérigènes, diminution des enzymes microbiennes telles que β -glucuronidases, β -glucosidases, nitroréductase et uréase impliquées dans l'activation de divers mutagènes et cancérigènes, enfin production de substances anticancéreuses et antimutagènes renforçant la réponse immunitaire de l'hôte et les effets sur la physiologie de l'hôte.

Des effets positifs ont été reportés sur des colites ulcéraives (ISHIKAWA 2003) et sur la maladie de Crohn (BORRUEL 2002).

Sans qu'il s'agisse à proprement parler d'un effet thérapeutique, mais plutôt d'une aide à une fonction physiologique, on citera pour terminer les effets hypocholestérolémiants attribués à certains produits laitiers fermentés. Toutefois ceux-ci sont très controversés.

Pour conclure on peut dire que dans l'état actuel des connaissances et compte tenu des différences intrinsèques entre probiotiques (génomique, composition de la paroi, enzymes, capacité d'adhésion aux cellules épithéliales ou au mucus et aptitude à produire des substances antimicrobiennes), on admet que les effets produits par une souche donnée et leurs mécanismes d'action, ainsi que les applications thérapeutiques qui peuvent en résulter ne peuvent pas être extrapolés à une autre souche. Il existe des preuves expérimentales de ces spécificités d'effets aussi bien entre genres microbiens et espèces qu'entre souches au sein d'une même espèce. Toutefois rien ne prouve aujourd'hui que les effets produits par des souches aux propriétés différentes soient tous différents pour l'hôte.

III 3 Les prébiotiques

Nous savons que les bactéries probiotiques qui survivent aux conditions de leur transit dans l'estomac et l'intestin grêle, atteignent le côlon dans un état de stress qui compromet leurs chances de survie. Ce constat a conduit à la recherche de différentes stratégies permettant d'accroître ces chances. Il serait envisageable d'accroître leur caractère compétitif par l'ingénierie génétique, mais la situation actuelle n'est pas favorable à cette application en nutrition. On a déjà cité les techniques d'encapsulation qui sont beaucoup plus réalistes. Enfin une dernière stratégie consiste à utiliser les spécificités de fermentation des probiotiques et

essayer de stimuler sélectivement les probiotiques dans l'intestin en augmentant leur capacité métabolique. Cette idée a conduit en 1995 GIBSON et ROBERFROID à imaginer le concept de prébiotique. Selon ces auteurs, un prébiotique est défini comme « un ingrédient alimentaire non digestible qui affecte de façon bénéfique l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et / ou l'activité d'un nombre limité de bactéries dans le côlon et conforte ainsi sa santé ». Bien qu'étant apparus après les probiotiques, les prébiotiques présentent certains avantages par rapport aux limites des premiers. N'étant pas des substrats alimentaires vivants, ils échappent aux contraintes rencontrées par les probiotiques. Par ailleurs, compte tenu de leur nature très majoritairement glucidique, ils peuvent être largement utilisés dans diverses formulations alimentaires. Enfin, inversement aux probiotiques, et par définition, n'étant pas digestibles ils échappent à toute dégradation dans la partie supérieure du tractus et atteignent le côlon à l'état intègre.

III 3 1 Critères de sélection : digestibilité et aptitude à être fermenté

De nombreux composés alimentaires ont été qualifiés de prébiotiques sans toujours tenir compte de tous les critères de définition. C'est ainsi que la plupart des oligo et polysaccharides, y compris les fibres diététiques ont été associés à une activité prébiotique, mais tous ne sont pas des prébiotiques. Un prébiotique doit répondre à trois critères :

- Ne pas être digéré par l'hôte ni subir de processus d'absorption ou d'adsorption.
- Pouvoir être fermenté par la microflore intestinale.
- Stimuler sélectivement la croissance et / ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries à l'intérieur du système gastrointestinal.

III 3 1 1 Digestibilité

Compte tenu de leurs structures chimiques, de nombreux oligosaccharides répondent au premier critère. La non digestibilité des fructooligosaccharides (FOS) et de l'inuline, les mieux connus parmi les prébiotiques, a été vérifiée *in vivo* (BACH KNUDSEN 1995 ; ELLEGARD 1997 ; MOLIS 1996 ; HIDAKA 1986) et *in vitro* (NILSSON 1988). Ces

résultats sont en accord avec la spécificité connue des enzymes digestives des mammifères. Tout nouveau prébiotique supposé devrait en fait être testé au moins *in vitro* quant à sa résistance aux jus gastriques, aux enzymes pancréatiques et aux enzymes de la bordure en brosse.

III 3 1 2 Aptitude a être fermenté

Tout glucide qui atteint le caecum est un substrat de fermentation potentiel pour la microflore du gros intestin. De nombreux résultats confirment que c'est en effet le cas des prébiotiques reconnus tels que l'inuline et les FOS (MOLIS 1996 ; ALLES 1996). Les premières études menées sur des FOS de 2 à 4 résidus de fructose ont montré qu'ils étaient fermentés par les bifidobactéries même si *Bifidobacterium bifidum* est moins efficace que les autres (HIDAKA 1986, MITSUOKA 1987). A l'inverse *E. Coli* et *Clostridium perfringens* utilisent peu les FOS.

Les *bacteroides* sont, eux, capables de fermenter différents prébiotiques. GIBSON (1994) a mis en évidence un phénomène de compétition pour la fermentation d'oligofructose par *Bifidobacterium infantis*, *E. Coli*, et *Clostridium perfringens* en coculture. Les bifidobactéries manifestent un effet inhibiteur à l'égard des deux autres. On citera le travail de VAN LAERE (1997) qui a étudié la dégradation par différentes souches de *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* et *Lactobacillus* de plusieurs oligosaccharides de parois cellulaires végétales de composition osidique et de tailles différentes. Il constate que la fermentation dépend de la structure. Les fructoses sont fortement fermentés sauf par *Clostridium*, alors que peu d'espèces sont capables de dégrader les arabinoxylanes dans les conditions de tests. Les xylooligosaccharides, par contre sont bien fermentés. Cette étude révèle donc que les oligosaccharides linéaires sont catabolisés à un degré supérieur à ceux qui sont substitués. Les Bifidobactéries utilisent préférentiellement les oligosaccharides de faible DP, alors que les *Bacteroides* utilisent ceux à fort DP. Une collaboration métabolique existe certainement lors de ces dégradations, à la fois la structure des oligosaccharides et la nature des bactéries présentes sont probablement des facteurs importants pour le contrôle de la fermentation des prébiotiques.

Dans le même esprit, en 2001 RYCROFT et GIBSON ont publié une étude comparée de l'évaluation *in vitro* des propriétés fermentescibles de différents oligosaccharides prébiotiques commerciaux en utilisant des bactéries fécales. L'évolution de la population bactérienne a été

suivie par la méthode d'hybridation *in situ* (FISH). Cette étude présente l'intérêt de pouvoir identifier le meilleur prébiotique pour une modulation souhaitée du profil de la microflore. Ainsi, d'après ces auteurs, si l'on souhaite accroître le nombre de bifidobactéries il faut faire appel à des xylooligosaccharides (XOS) ou au lactulose comme prébiotique.

III 3 1 3 Les produits de la fermentation.

Ce sont essentiellement les acides gras à chaîne courte (AGCC), et des gaz tels que l'hydrogène et le dioxyde de carbone. A ces produits il faut bien évidemment ajouter la biomasse produite.

La production d'AGCC tels que acétate, propionate et butyrate a été largement documentée (CUMMING 1995). Les prébiotiques produisent des AGCC aussi bien *in vitro* que *in vivo*, il n'est toutefois pas très aisé de déterminer les rendements relatifs par gramme de substrat fermenté. On constate que ce sont les FOS qui produisent le plus d'acétate, l'amidon est le plus fort producteur de butyrate. Les arabinogalactanes produisent relativement plus de propionate.

Les mesures quantitatives *in vivo* sont beaucoup plus délicates et sont réalisées le plus souvent sur les fèces. Plusieurs auteurs ont ainsi pu constater que *in vivo*, ni l'inuline, ni les oligofructoses à des doses comprises entre 4 et 40g par jour, n'induisaient une modification significative de la concentration ou des proportions molaires d'AGCC (ALLES 1996 ; GIBSON 1995 ; KLEESSEN 1997). La production d'AGCC, et notamment de butyrate est associée au rôle protecteur des prébiotiques contre le cancer du côlon mais ce facteur n'est pas le seul (CJORDAS 1995 ; TRAN 1998 ; RUEMMELE 2003 ; HUGHES 2001 ; PERRIN 2001). La production d'hydrogène et de dioxyde de carbone induit par contre des effets plutôt néfastes tels que douleurs abdominales, flatulences et ballonnements (STONE-DORSSHOW 1987 ; PEDERSEN 1997 ; HARTEMINK 1997). Il a été constaté que la production d'hydrogène diminuait avec le degré de polymérisation (BRIGHENTI 1995). La production de ces gaz peut être pour certains sujets le facteur limitant la prise de prébiotiques.

III 3 2 Les différentes familles prébiotiques oligosaccharidiques

Plusieurs familles d'oligosaccharides ont été testées sur la base des critères de définition vus précédemment et ceci par des méthodes *in vitro* et sur des modèles animaux et humains. Certains ont fait l'objet d'essais cliniques. On peut classer les prébiotiques en deux grands groupes : les prébiotiques reconnus, dont certains sont commercialisés, et les prébiotiques émergents.

Le premier groupe est essentiellement constitué de trois familles : les fructooligosaccharides (FOS), les galactooligosaccharides (GOS) et le lactulose ; ces prébiotiques sont aujourd'hui bien reconnus au Japon, en Europe et aux Etats Unis.

III 3 2 1 Les FOS et l'inuline

Les FOS sont des oligomères de D-fructose associés par des liaisons β -(1→2) avec un résidu D-glucose en bout de chaîne lié en α -(1→2). Ils sont obtenus par réaction d'hydrolyse enzymatique de l'inuline, mais ils ont également été synthétisés par transfert de résidus fructosyl de molécules de saccharose par voie enzymatique (CRITTENDEN 1999). L'inuline est un ensemble de polymères de fructose de DP >20, elle est extraite industriellement de la chicorée, mais on la trouve également dans l'ail, l'oignon, la tomate, la banane et l'artichaut de Jérusalem (CRITTENDEN 1996).

Ce sont les prébiotiques les plus étudiés et leur aptitude à stimuler la croissance de *bifidobacterium* a été établie par de nombreuses études tant *in vitro* que *in vivo* (ROBERFROID, 1998). Ils ont été testés sur des cocultures à pH contrôlé, où ils induisent non seulement une stimulation de la croissance de *Bifidobacterium infantis* mais aussi inhibent celle de *E. Coli* et de *Clostridium perfringens* (GIBSON, 1994).

Toujours en test *in vitro*, leur effet bifidogène a été mis en évidence sur des systèmes bactériens complexes simulant la diversité microbienne de l'intestin humain (WANG 1993 ; SGHIR 1998 ; KOLIDA 2002).

Une étude récente, publiée par ROSSI (2005), fait état d'une comparaison de la fermentation de FOS et d'inuline en cultures pures et inoculum fécal. Cinquante cinq souches de bifidobactéries ont été testées, la plupart sont capables de fermenter les FOS, mais

seulement huit d'entre elles se développent bien sur l'inuline. L'analyse des oligosaccharides résiduels par HPLC met en évidence une aptitude souche indépendante à dégrader les oligomères en fonction de la longueur de chaîne. En culture sur inoculum fécal, les FOS et l'inuline affectent la production d'AGCC, le butyrate est le produit majeur de fermentation de l'inuline, alors que ce sont l'acétate et le lactate qui sont majoritairement produits avec les FOS.

Les propriétés prébiotiques des FOS et de l'inuline ont aussi été validées *in vivo*. Les travaux de GIBSON (1995) et de ROBERFROID (1997) menés sur des hommes sains avec contrôle placebo en double aveugle aboutissent à des résultats concordants : accroissement significatif des bifidobactéries dans les selles et diminution simultanée des *Bacteroides*, des *Clostridium* et des fusobactéries ; le nombre de *cocci* Gram+, lui, diminue avec la prise d'inuline. L'effet des FOS est significatif à des doses journalières de 4g à 15g et dépend du nombre initial de bifidobactéries fécales. (ROBERFROID 1998). Les mêmes constats ont été faits avec des préparations alimentaires de type biscuit où les FOS sont associés à des fibres diététiques.

III 3 2 2 Le Lactulose

C'est un disaccharide synthétique galactose- fructose liés en β -(1→4) dérivé du lactose. Il est connu pour ses effets laxatifs lorsqu'il est pris à fortes doses (supérieures à 20g par jour) (SALMINEN 1997). Mais à plus faibles doses, il agit en tant que prébiotique en augmentant le nombre de bifidobactéries alors que le nombre de *Clostridium perfringens*, de *Bacteroides*, de spptococoques et d'enterobactéries décroît (SALMINEN 1997 ; TERADA 1992 ; BALLONGUE 1997 ; TUOHY 2002).

Il est intéressant de constater parallèlement une décroissance d'une part de métabolites potentiellement toxiques tels que indole, skatol et phénols, d'autre part d'enzymes catalysant la formation de produits cancérigènes telles que β -glucuronidases, nitroréductases et azoréductases. La concentration d'acétate, l'AGCC majoritairement produit par les Bifidobactéries augmente significativement. Comme pour les FOS et l'inuline, l'amplitude des effets dépend de la population de Bifidobactéries de départ.

III 3 2 3 Les Galactooligosaccharides (GOS)

Ce sont des oligomères de la forme $\text{Glc } \alpha\text{-(1}\rightarrow\text{4)-}[\beta\text{-(1}\rightarrow\text{6) Gal}]_n$ avec n de 2 à 5. Ils sont naturellement présents dans le lait mais également obtenus par synthèse enzymatique à partir du lactose (CRITTENDEN 1999 ; KOLIDA 2000). Ils sont non digestibles (BOUHNIK 1997). Comme avec les FOS, les tests *in vitro* mettent en évidence un effet bifidogène mais ils accroissent également la population des lactobacilles (TANAKA 1983). Des modèles plus complexes reproduisant *in vitro* la microflore identifiée du côlon humain, conduisent aux mêmes résultats (RYCROFT 2001 ; SHARP 2001). Sur des rats porteurs d'une microflore humaine, ROWLAND a montré que les transgalactooligosaccharides augmentaient le nombre de bifidobactéries et de lactobacilles mais en outre diminuaient le nombre d'entérobactéries. De plus ces oligomères réduisent les activités enzymatiques néfastes déjà citées. Chez l'homme plusieurs études aboutissent aux mêmes résultats (TANAKA 1983 ; ITO 1990).

Toutefois les résultats obtenus par ALLES en 1999 sont contradictoires, mais les conditions différentes des tests et notamment les populations initiales différentes, peuvent en être la cause.

III 3 2 4 Les prébiotiques émergents

Plusieurs causes sont à l'origine du développement de nouveaux prébiotiques : tout d'abord les progrès réalisés dans les processus de production (GIBSON 2000), puis les développements des biotechnologies et de la génétique moléculaire (RABIU 2001 ; RASTALL 2002), enfin la recherche de diversification des voies de valorisation de certains produits naturels, déchets de l'agriculture.

Parmi ces prébiotiques émergents on peut citer : les isomaltooligosaccharides (IMO), les oligosaccharides de soja (SOS) et les xylooligosaccharides (XOS).

On ajoutera, dans une moindre mesure en terme de travaux d'expertise, les glucooligosaccharides et les pectiolioligosaccharides (RYCROFT 2001 ; OLANO-MARTIN 2002 ; RASTAL 2002). Il a également été avancé que les amidons résistants pouvaient entrer dans cette catégorie. (CRITTENDEN 2001 ; WANG 2002 ; SHUUSUKE 2003).

III 3 2 4 1 Les isomaltoosaccharides (IMO)

Ils sont constitués de résidus glucose liés en α -(1→6). Leur production industrielle fait appel à l'action d' α -amylase, de pullulanases et d' α -glucosidases sur l'amidon de maïs. Les produits commercialisés contiennent un mélange d'isomaltose, isomaltotriose et panose. Tous les IMO testés sur des cultures bactériennes pures induisent un accroissement de la plupart des bifidobactéries à l'exception de *Bifidobacterium bifidum* (KOHMOTO 1988). RYCROFT (2001) a montré qu'avec les IMO de DP moyen égal à 2, le nombre de bifidobactéries augmentait après 24h de culture en batch ainsi que la concentration en acide lactique et lactate.

Les résultats d'étude *in vitro* réalisées avec des produits commerciaux (ISOMALTO-900) vont dans le même sens quant à l'effet bifidogène, mais une légère augmentation des *Bacteroides* est également observée. La prise journalière d'IMO purs induisant un effet bifidogène significatif est de l'ordre de 10g.

Suite à l'étude de KANEKO (1994) quant à l'effet du degré de polymérisation sur le caractère prébiotique des IMO, il ressort que la dose minimale associée à un effet bifidogène *in vivo* est observée pour DP>2. Toutefois ces résultats peuvent être altérés par le fait que contrairement aux FOS et aux GOS, les IMO de faible DP peuvent être digérés dans l'intestin grêle par l'isomaltase humaine.

III 3 2 4 2 Les oligosaccharides de soja (SOS)

Les deux principaux oligosaccharides extraits du soja sont le trisaccharide raffinose et le tétrasaccharide stachyose, ils sont constitués de résidus glucose, galactose et fructose. Les tests *in vitro* (SHARP 2001; SAITO 1992) et *in vivo* (BENNO 1987; HAYAKAMA 1990; WADA 1992) conduisent au même constat d'un effet bifidogène, avec dans certains cas une décroissance concomitante non seulement des *Bacteroides et clostridia* mais aussi de certains métabolites toxiques.

III 3 2 4 3 Les xylooligosaccharides

Comme nous l'avons déjà vu au paragraphe II 2 2 de ce chapitre, ils sont constitués de formes oligomériques de résidus xylose liés en β -(1-4), dans cette famille on inclue également les arabinoxylyanes (AXOS) qui peuvent être eux-mêmes différemment substitués selon l'origine et les procédés d'obtention. Ils sont essentiellement obtenus par hydrolyse des hétéroxylanes constituant les parois cellulaires végétales. En une dizaine d'années (1995-2005) la production Japonaise de XOS est passée de 300 à 2000 tonnes par an (NAKAKUKI 2005).

Ils semblent encore mieux répondre que les FOS et les IMO au tout premier critère de définition d'un prébiotique, à savoir sa non digestibilité. En effet ils ne sont pas du tout dégradés par aucune enzyme digestive alors que certains FOS et la plupart des IMO subissent une digestion partielle dans l'intestin grêle. L'une des activités les plus importantes des XOS est leur effet bifidogène. De nombreux essais *in vitro* ont été réalisés soit avec des XOS ou AXOS produits par les auteurs soit avec des mélanges commerciaux. Les inoculum bactériens étant réalisés soit à partir de souches pures sélectionnées comme étant représentatives de la microflore soit à partir de mélanges complexes extraits de fèces. Nous citerons quelques exemples représentatifs de ces travaux :

- JASKARI (1998) a étudié l'effet comparé de β - glucanes et de XOS issus d'avoine sur la croissance de deux probiotiques, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* et d'autres bactéries intestinales telles que *Bacteroides*, *Clostridium* ,et *E.Coli*. Il observe que les 2 familles d'oligomères augmentent la croissance des deux probiotiques comparés aux autres souches mais ceci de façon faiblement significative.
- Dans le même temps KONTULA (1998), lors du même type d'étude avec des sons d'avoine testés sur 3 souches de bactéries lactiques met en évidence la fermentation sélective des XOS par *Lactobacillus plantarum* alors que les β - glucanes sont également fermentés par les deux autres bactéries lactiques testées : *L. rhamnosus* et *Lactococcus Lactis*.
- En 1999, SUWA dépose un brevet pour une préparation de XOS induisant la prolifération *Bifidobacterium Bifidum*.

Depuis, de nombreux autres brevets, que nous ne citerons pas ici, ont été déposés. D'après JASKARI (1998), les XOS d'avoine sont plus facilement fermentés que les FOS. Ce

dernier résultat a été confirmé plus tard par PALFRAMAN (2003) au cours d'une étude sur neuf souches de bifidobactéries dont la seule source de carbone était le glucose, le xylose, des XOS et des FOS. Le taux de croissance maximum atteint avec les XOS pour le *B. Bifidum* suggère d'après cet auteur un système de transport spécifique des oligomères. Une autre confirmation de cet effet bifidogène supérieur pour les XOS par rapport aux FOS est apportée par les travaux de RHEW (2002).

Une étude comparée de l'évaluation des propriétés fermentescibles de différents prébiotiques ; XOS, lactulose, FOS et GOS par une population représentant les espèces prédominantes de la microflore intestinale a été publiée par RYCROFT (2001). Tous les prébiotiques testés stimulent la croissance des bifidobactéries et diminuent le nombre de Clostridies. Les XOS et le lactulose produisent le plus fort effet bifidogène, alors que les FOS induisent plus fortement la croissance des Lactobacilles. Ce sont les GOS qui inhibent le plus la croissance des Clostridies, et induisent la plus forte production d'AGCC.

FOOKS (2002) a mis en évidence un effet d'inhibition de pathogènes tels que *E. Coli*, *Campylobacter* et *Salmonella* par les XOS et un mélange FOS/XOS 50/50 (poids/poids) additionnés au milieu de culture des deux probiotiques *Lactobacillus plantarum* et *Bifidobacterium bifidum*. L'effet observé est attribué à la production d'acétate et de lactate.

Une étude très complète a été menée par le groupe de POUTANEN (CRITTENDEN 2002). Une collection de 55 souches différentes représentant des *lactobacilles*, *bifidobactéries*, *enterocoques*, *bactéroïdes*, *lostridium* et *E. Coli* a été testé quant à leur aptitude à fermenter des poly- et oligosaccharides de céréales d'origine commerciale: des arabinoxylanes de seigle peu substitués (Megazyme), des xylanes peu substitués d'avoine (SIGMA), des β -glucanes d'orge (Megazyme), des XOS (SUNTORY) de DP 2 à 5 contenant 30% de xylose, et, pour référence des FOS (RP95 d'ORAFIT de DP de 2 à 7). On constate que les β -glucanes sont fermentés par les *bactéroïdes* et *Clostridium beijerinckii* mais ne le sont pas par les lactobacilles, les bifidobactéries, les enterocoques ni *E. Coli*.

Les XOS sont fermentés par la plupart des bifidobactéries mais avec des modulations d'amplitude selon les souches. Toutefois certains *Bactéroïdes* les utilisent également. Ils ne sont pas du tout fermentés par *E. Coli*, les enterocoques, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* et par une majorité des lactobacilles étudiés. Enfin *Bifidobacterium longum* se développe sur les arabinoxylanes, en les hydrolysant et en fermentant les résidus arabinosyles mais sans utiliser le squelette de xylane.

Nous citerons seulement deux publications relatives aux tests *in vivo* :

- La première, sur le modèle rat, met en évidence un accroissement des bifidobactéries dans le contenu caecal et dans les fèces ainsi qu'une diminution du pH lorsque les animaux sont nourris avec des mélanges d'AXOS et XOS et des glucuronoxyloligosaccharides (DEGAN YOKO 2006).
- La seconde, chez l'homme, s'intéresse aux effets de pentosanes de blé de rapport Ara / Xyl = 0,87 comparés à ceux de l'inuline sur l'activité métabolique de la microflore. Les résultats montrent que les modifications induites par les deux sources de prébiotiques sur l'activité enzymatique (β - glucuronidase, β - glucosidase et uréase) sont comparables. Par contre les pentosanes augmentent davantage les concentrations des AGCC totaux et le butyrate dans les fèces que ne le fait l'inuline (GRASTEN 2003).

Par ailleurs, des essais de corrélation entre structure des XOS et propriétés prébiotiques ont été réalisés. L'équipe de YU SHI- YUAN a montré que le DP pouvait avoir une influence sur la croissance de *Bifidum adolescentis*, le xylotriose ayant un effet supérieur au xylobiose et au xylose (ZHANG, JUN – HUA 2005). Cette même équipe avait préalablement mis en évidence des mélanges de XOS originaux permettant de cultiver *Bifidobacterium adolescentis* grâce à la sécrétion d'une enzyme induite par la fermentation du xylobiose et du xylotriose et apte à dégrader les formes oligomériques de DP supérieur (XU, YONG 2001). Il a également été prouvé une spécificité de fermentation par *Bifidobacterium bifidum* d'arabinoxylanes estérifiés naturellement par des acides féruliques (XIAOPING YUAN 2005).

Enfin le groupe de VORAGEN a mis en évidence la nécessité qu'il y a de connaître les structures des oligosaccharides constituant les prébiotiques pour mieux comprendre leurs mécanismes de fermentation. En utilisant un inoculum fécal, on constate que parmi les XOS d'origine eucalyptus, les non substitués et les AXOS sont fermentés plus rapidement que les substitués par des groupes acétyles ou contenant des acides 4-O méthylglucuroniques. La fermentation de ces derniers conduisant à une diminution de la production de lactate mais à une augmentation de celle de propionate et de butyrate (KABEL 2002_{ab}). Certains effets sur la santé ont été attribués aux XOS, ils sont décrits dans le paragraphe III 3 4.

III 3 3 Effet prébiotique et structure des oligosaccharides

A l'heure actuelle, il est très difficile d'établir des corrélations entre l'activité d'un prébiotique défini sur les 3 critères développés ci-dessus et la structure des oligosaccharides qui le composent. En effet les prébiotiques les plus étudiés sont souvent des mélanges d'oligosaccharides avec quelquefois des oses monomériques et les structures ne sont pas toujours parfaitement connues. L'appartenance à une famille de prébiotiques est conditionnée par l'identité du monomère constitutif, mais la disparité au sein de la famille résulte de différence de DP et de la présence de différents substituants différemment liés (FRANK 2002).

L'hétérogénéité structurale résulte à la fois de l'origine des oligosaccharides et des procédés d'obtention. Il a déjà été montré que la structure chimique affectait l'effet des prébiotiques sur la microflore. Par exemple les FOS acidifient davantage les milieux de culture que ne le fait l'inuline (ROBERFROID 1998). Les FOS de DP 4 sont plus rapidement fermentés par *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus GG* que les FOS de DP 2 et 3 (KAPLAN 2000). Les produits commerciaux de type FOS et inuline, RAFTILOSE 95 et RAFTILINE Synergy 1 (mélange de FOS et d'inuline) sont fermentés par *Bifidobacterium animalis* et *Bifidobacterium lactis*, contrairement à RAFTILINE (VAN Der MEULEN 2004 ; JANER 2004).

La production de lactase par des souches pures de *bifidobacterium* est inversement proportionnelle au DP des fructanes fournis (PERRIN 2002).

La structure des fructanes semble également affecter leur vitesse de fermentation par la microflore intestinale totale mais ne semble pas altérer la production d'AGCC qui en résulte (VICKERS 2001 ; SMIRICKY 2003).

Par contre pour les XOS, KABEL (2002a) a montré sur la base d'une étude structurale fine que la présence et la nature des substituants sur la chaîne de xylane affecte à la fois la vitesse de fermentation et la quantité totale d'AGCC produits par un inoculum de fèces.

La structure chimique des oligosaccharides semble également influencer l'absorption de calcium par les FOS (COUDRAY 2003), mais également l'aptitude des fructanes à prévenir le développement de foyers de cryptes aberrantes et de tumeurs sur des modèles animaux de cancérogénèse (VERGHESE 2002).

Récemment (YUAN XIAOPING 2005) vient d'apporter la preuve d'une spécificité structurale de feruloyl oligosaccharides issus de son de blé pour stimuler la croissance de *Bifidobacterium Bifidum F-35*. Enfin une revue récente (CASCI 2006) fait le point sur les relations structure fonction des prébiotiques

En conclusion, on peut dire que compte tenu des effets déjà observés, les structures chimiques interfèrent fortement avec les propriétés des prébiotiques et que dans l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible d'extrapoler l'effet d'un composé à un autre même s'il appartient à la même famille de prébiotiques.

III 3 4 Amélioration des fonctions physiologiques et effet sur la santé

Nous citerons très brièvement les différents effets dont certains nécessitent encore davantage de validations scientifiques. Un des tous premiers effets établi est l'accroissement de la masse fécale par la biomasse formée, ce qui a pour effet d'améliorer la mobilité intestinal donc de traiter efficacement la constipation. Une publication récente fait état de cet effet induit par les XOS chez la femme enceinte (TATEYAMA 2005).

D'un point de vue fonctionnel ils agissent sur l'absorption du calcium et du magnésium ce qui améliorerait la minéralisation osseuse et diminuerait donc le risque d'ostéoporose (SCHOLZ-AHRENS 2000).

Les FOS agiraient sur le métabolisme lipidique induisant une légère décroissance des triglycérides circulants et du cholestérol plasmatique (DAVIDSON 1998). Ces effets peuvent avoir des conséquences bénéfiques sur les risques d'athérosclérose associés aux maladies cardiovasculaires. Il a été montré sur modèle animal que les FOS induisaient une protection contre les infections gastrointestinales. Bien que le mécanisme n'en soit pas élucidé, il se peut qu'il passe par la stimulation des défenses immunitaires (BUDDINGTON 2002).

Les maladies inflammatoires intestinales telles que la maladie de CROHN et les colites sont connues pour être sensibles au butyrate. ARAKY (2000) a pu montrer que chez le rat, la prise de fibres d'orge germées induisait la production de butyrate et augmentait simultanément le nombre de Bifidobactéries et d'Eubactéries.

Enfin nous citerons les effets bien documentés sur la prévention du risque de cancer colorectal. Il est maintenant établi que les métabolites cancérigènes et mutagènes produits par la microflore intestinale jouent un rôle dans la phase d'initiation des cancers (VENTURI 1997 ; ROWLAND 1999).

Le rôle protecteur de certains prébiotiques constaté par différents auteurs (GALLAHER 1999 ; REDDY 1999 ; ROWLAND 1998 ; WIJNANDS 2001 ; CHENG-KUANG HSU 2004) pourrait résulter de différents mécanismes d'action :

- L'accroissement des bifidobactéries et des lactobacilles peut favoriser l'élimination des molécules cancérigènes dans les fèces (ZHANG 1993 ; BOLOGNANI 1997).
- Un autre mécanisme suggéré passerait par la stimulation d'activités enzymatiques protectrices ou encore la réduction de la réponse inflammatoire immunitaire (PERDIGON 1998).
- Enfin, dernier mécanisme proposé, l'action du butyrate, AGCC produit par la fermentation de certains prébiotiques. Il induit l'apoptose chez les cellules cancéreuse du côlon sans perturber les colonocytes normaux (RUEMMELE 2003).

Des études récentes chez le rat sont en accord avec un tel mécanisme (HUGUES 2001 ; PERRIN 2001).

Pour terminer nous citerons le travail de revue récemment publié par CASCI (2006) sur le rôle des prébiotiques et leur relation avec la microflore intestinale et la santé de l'hôte.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est de contribuer à une meilleure connaissance des propriétés prébiotiques d'un type particulier d'oligosaccharides : les arabinoxylooligosaccharides. L'intérêt émergent des AXOS dans cette problématique, cité précédemment et initié notamment par KABEL (2002), est d'autant plus important qu'il est associé à une démarche de valorisation de co-produits d'origine naturelle, les sons de céréales. En effet, ces derniers sont riches en arabinoxylanes et sont des candidats potentiels pour l'obtention d'AXOS d'intérêt, par dépolymérisation des polymères constitutifs (AX) après leur extraction.

CHAPITRE II

EXTRACTION,

CARACTERISATION D'UNE

FRACTION ARABINOXYLANE ET

ESSAIS DE DEPOLYMERISATION

Dans un contexte de valorisation de co-produits végétaux, l'objectif, défini en introduction générale, consiste à mettre en place une méthodologie expérimentale pour la production d'oligosaccharides de degré de polymérisation contrôlé. La première partie de cette étude est donc consacrée à l'obtention, à partir de sons de céréales, d'une fraction polymérique d'arabinoxylanes (AX), précurseurs des arabinoxyloligosaccharides recherchés.

I Obtention d'une fraction arabinoxylane

I 1 Les substrats végétaux valorisables

Les sons de céréales, riches en arabinoxylanes, constituent une matière première abondante et jusqu'alors peu valorisée. Nous avons retenu deux espèces de céréales comme source de sons : le blé et le seigle. Ceux-ci ont été fournis par la minoterie Lagarde (Objat, 19 France) et proviennent de la mouture de grains récoltés en 2003 par des producteurs régionaux.

A l'état brut, les sons ont une granulométrie, noté \varnothing_p pour diamètre des particules, très irrégulière et majoritairement supérieure à 1mm. Ils ont donc été broyés afin d'obtenir, en quantité suffisante, une matière première de granulométrie homogène comprise entre 0,5mm et 0,2mm. Cette fraction, qui représente 65% pds/pds du son brut après le broyage, constitue le matériel de travail qui a été caractérisé quant à son contenu en amidon, protéines, lipides, composés hydrophiles extractibles et cendres. Les résultats relatifs à cette caractérisation sommaire sont regroupés dans le **tableau 5** :

Tableau 5 : Composition des sons, exprimée en g pour 100g de son.

Composition	Son de blé	Son de seigle
Matière sèche	87,5 ± 0,9	87,3 ± 0,9
dont : Amidon	31 ± 2	41 ± 2
Protéines	15 ± 1	13 ± 1
Lipides	3,4 ± 0,3	2,1 ± 0,2
Extractibles hydrophiles	8,0 ± 0,8	4,9 ± 0,5
Cendres	4,6 ± 0,2	4,4 ± 0,2
<i>Autres* dont AX</i>	26 ± 2	22 ± 2

* : calculé par différence entre la matière sèche et la somme des composés identifiés.

Les teneurs en protéines, lipides, matières hydrophiles extractibles (saccharides circulants, tanins...) ou de cendres sont comparables aux valeurs généralement publiées pour ce genre de matériel (HOLLMANN 2005, KABEL 2002_b, MAES 2001). La teneur en amidon, respectivement de 31 et 41% pour les sons de blé et de seigle, est assez importante et traduit une séparation grossière lors de la production de la farine en minoterie.

La somme des composés répertoriés **tableau 5** représente environ 65% de la masse du son, que ce soit pour le blé ou le seigle, les polysaccharides autres que l'amidon, dont les arabinoxylanes, constituent majoritairement la fraction restante non identifiée.

Cependant le dosage des polysaccharides totaux, incluant amidon, arabinoxylanes et autres, par des méthodes colorimétriques usuelles telle que celle de Dubois (1956), est rendu délicat du fait de la faible solubilité des sons en milieu aqueux. La quantification des oses totaux résultant de la mise en œuvre d'une telle méthode est, de ce fait, entachée d'erreurs importantes et n'a donc pas été prise en considération. Une pré-hydrolyse du son par l'acide sulfurique à 96% (CHANLIAUD 1995a) a été réalisée, mais n'a pas permis d'aboutir à de meilleurs résultats, car le taux de destruction des pentoses libérés, dans ces conditions acides, reste élevé.

La composition osidique des sons a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM), après méthanolyse puis dérivation par le triméthylsilylimidazole, TMSIm. Toutefois, bien que la méthanolyse soit moins destructive qu'un traitement d'hydrolyse acide (CHAPLIN, 1982), les rendements de clivage des liaisons osidiques au sein des polysaccharides restent très dépendants de la nature de celles-ci (TIMELL 1965). Ils constituent, de ce fait, des sources d'erreurs dans l'établissement

de la composition osidique. Dans ces conditions, les proportions molaires indiquées dans le **tableau 6** ci-dessous doivent être considérées comme des estimations.

Tableau 6 : Composition osidique des sons de blé et de seigle, exprimées en moles pour 100 moles.

Monosaccharides	Son de blé	Son de seigle
Arabinose	20,0	10,8
Xylose	21,0	19,5
Galactose	4,5	1,5
Glucose	54,5	68,2
Rapport A/X	0,95	0,56

On constate que les sons contiennent un fort taux de glucose, provenant de l'amidon contaminant. La faible teneur en galactose mesurée est en accord avec les observations de CHANLIAUD (1995a). Le galactose est souvent présent dans les hémicelluloses de céréales, où il forme de courtes chaînes avec l'arabinose, sur les positions latérales disponibles dans le squelette principal de xylane.

Le rapport A/X, proportion relative d'arabinose par rapport au xylose, traduit un fort taux de ramification dans les arabinoxylanes des sons étudiés. Dans la graine de céréale, le rapport A/X des hémicelluloses varie de 0,35 à plus de 1 entre les zones internes et externes de péricarpe (DUPONT 1987). La valeur de A/X, proche de 1, mesurée pour le son de blé traduit un enrichissement de celui-ci en hémicelluloses de la partie externe du péricarpe. Ceci n'est pas observé pour le son de seigle.

I 2 Extraction d'une fraction enrichie en arabinoxylanes

Les sons ainsi caractérisés ont subi un traitement chimique permettant d'en extraire puis d'en isoler une fraction enrichie en arabinoxylanes.

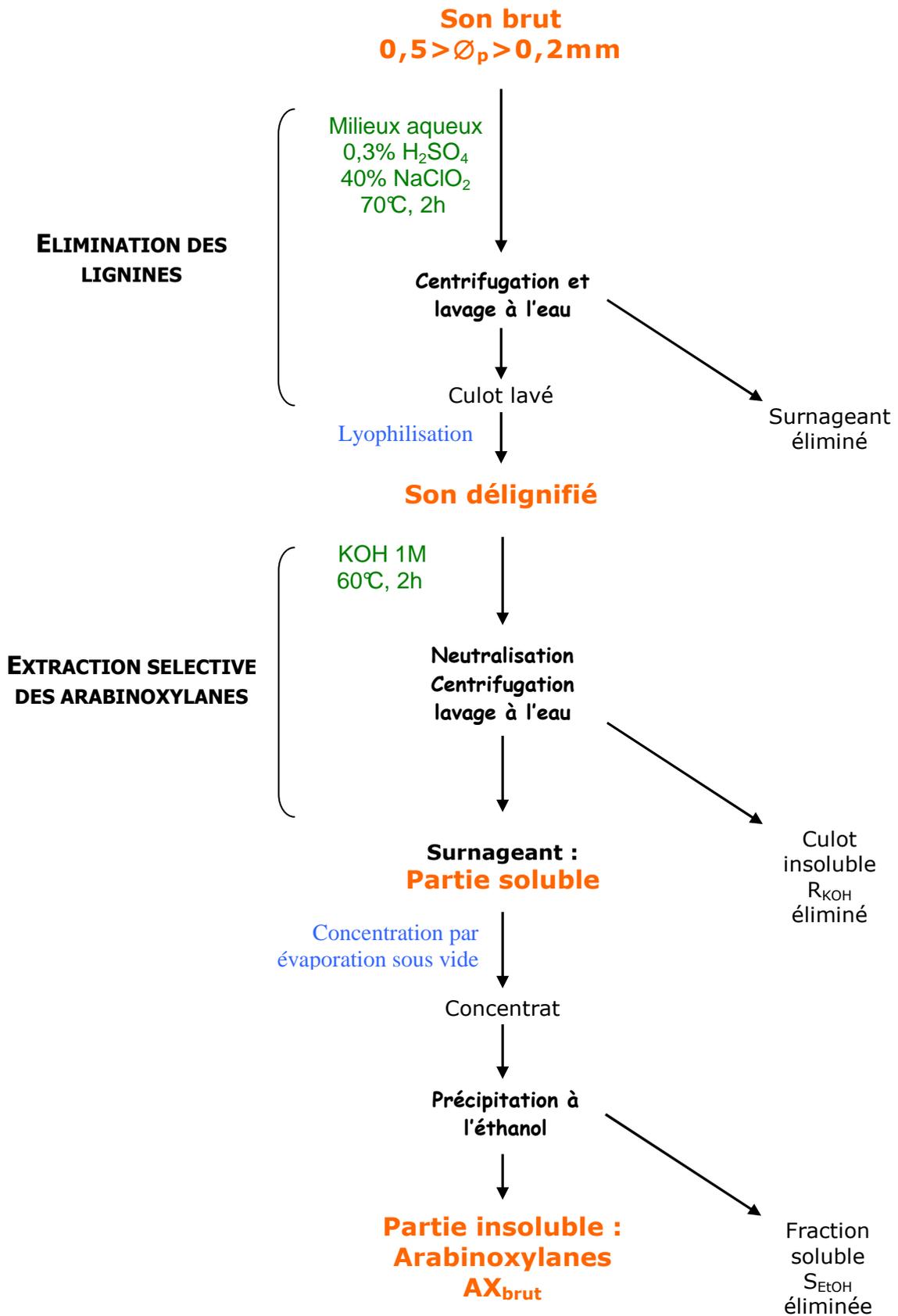


Figure 6 : Organigramme de l'extraction des arabinoxyanes de sons de céréales, par voie chimique.

I 2 1 Extraction chimique

La stratégie choisie, présentée **figure 6** ci-contre, permet, en deux étapes simples et rapides, d'aboutir à une fraction contenant majoritairement des arabinoxylanes. La première a pour fonction de délignifier le son brut et la seconde constitue l'étape d'extraction proprement dite.

Dans une première phase, la délignification, adaptée de BATAILLON (1998), par oxydation à l'hypochlorite de sodium à 40% pds/pds par rapport au son et à 70°C pendant 2h, permet non seulement d'éliminer les lignines mais également de déstructurer le réseau polysaccharidique, par gonflement des fibres de cellulose (CHANLIAUD, 1995a). Ceci autorise un meilleur rendement d'extraction des hémicelluloses.

La phase d'extraction des arabinoxylanes est réalisée en présence d'hydroxyde de potassium à 1M, 60°C pendant 2h, comme préconisé par CHANLIAUD (1995a). Le traitement à chaud, en milieu alcalin, conduit à la solubilisation des arabinoxylanes. Celle-ci résulte de l'hydrolyse des liaisons ester entre hémicelluloses et acides phénoliques et de la déacétylation de certaines unités xylose. Les interactions faibles, principalement de type hydrogène, entre hémicelluloses, cellulose et constituants protéiques sont également affectées par ce traitement, contribuant ainsi à la solubilisation observée (MANDALARI, 2005) **figure 7**.

Dans ces conditions alcalines et en présence d'oxygène, il peut se produire une oxydation des extrémités réductrices des polysaccharides, engendrant une dépolymérisation mettant en jeu des réactions de β -élimination. Ce phénomène, appelé peeling, apparaît surtout lors de l'extraction alcaline d'hémicelluloses linéaires. Compte tenu du caractère ramifié des hémicelluloses des sons de céréales faisant l'objet de notre étude, nous n'avons pas jugé utile de travailler en milieu réducteur pour nous affranchir d'un éventuel peeling. Après neutralisation, la partie soluble est concentrée puis traitée à l'éthanol de façon à précipiter les arabinoxylanes, identifiés AX_{brut} , puis à les récupérer par filtration.

Lors de la mise au point de la procédure d'extraction à l'échelle analytique, nous avons constaté des fluctuations importantes des caractéristiques chimiques des arabinoxylanes, attribuables principalement à l'hétérogénéité du matériel végétal de départ, d'un essai à l'autre. Afin de surmonter cette difficulté et d'obtenir une fraction arabinoxylane homogène, en quantité suffisante pour l'étude ultérieure envisagée, nous avons réalisé une extraction préparative à partir de 200g de sons de blé et de seigle.

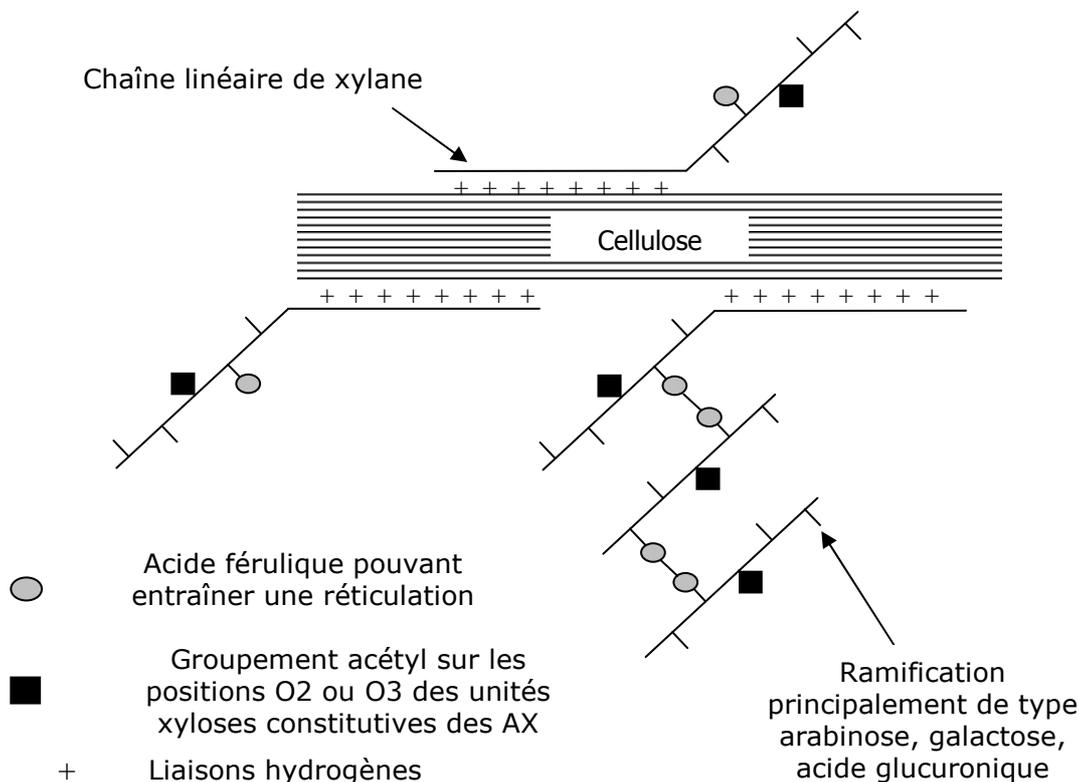


Figure 7 : Structure schématisée des interactions entre les différents constituants du son, d'après Mandalari (2005).

Les rendements d'obtention en arabinoxylanes sont de **34g** et **33g** respectivement pour 100g de son de blé et de seigle traités selon la procédure décrite précédemment. La caractérisation de chacune de ces fractions, au niveau de leur contenu en matière sèche, amidon, protéines et cendres, est présentée dans le **tableau 7**. Leur composition osidique, établie par CPG/SM après méthanolyse et dérivation au TMSIm, est indiquée dans le **tableau 8** :

Tableau 7 : Composition des fractions arabinoxylanes extraites, exprimée en g pour 100g de fraction.

Composition	AX _{brut} blé	AX _{brut} seigle
Matière sèche	94,3 ± 0,9	93,7 ± 0,9
dont Amidon	19 ± 1	31 ± 2
Protéines	6,3 ± 0,3	6,6 ± 0,3
Cendres	28 ± 1	28 ± 1
<i>Autres dont AX :</i>	<i>47 ± 1</i>	<i>34 ± 2</i>

Tableau 8 : Composition osidique des fractions arabinoxylanes extraites exprimée en moles pour 100 moles.

Monosaccharides	AX_{brut} blé	AX_{brut} seigle
Arabinose	34,5	18,2
Xylose	34,4	28,0
Galactose	3,1	3,7
Glucose	28,0	50,1
Rapport A/X	1,0	0,65

On peut remarquer qu'une partie de l'amidon initialement présent dans les sons contamine encore les AX_{brut}. Ceux-ci contiennent également des protéines ayant probablement co-précipitées lors du traitement à l'éthanol ainsi qu'un taux de cendres élevé, induit par l'apport massif de sels durant le traitement alcalin. Une étape complémentaire de purification de cette fraction brute apparaît indispensable afin d'abaisser les teneurs en contaminants. L'analyse de la composition osidique confirme la présence d'amidon dans les échantillons extraits, la teneur de ce polysaccharide est plus importante dans le seigle que dans le blé.

La présence de galactose à des concentrations comprises entre 3 et 4 moles pour 100 moles d'oses, révèle que le traitement d'extraction n'a pas engendré une élimination sélective des ramifications sur les chaînes xylanes. Les concentrations mesurées pour le galactose sont en accord avec celles publiées par (STEVENS, 1988) pour des fractions purifiées d'arabinoxylanes de blé. Le rapport A/X reste inchangé entre les substrats d'origine et les fractions arabinoxylanes bruts qui en sont issues.

I 2 2 Purification des arabinoxylanes

Dans le but d'augmenter la pureté des extraits bruts, nous avons utilisé un traitement combinant des étapes d'hydrolyses enzymatiques, pour abaisser les teneurs résiduelles en amidon et protéines, d'extraction en phase solide, pour éliminer sélectivement les pigments et autres contaminants ionisés et enfin de dialyse, afin de réduire les teneurs en sels ou molécules de solutés de faibles masses.

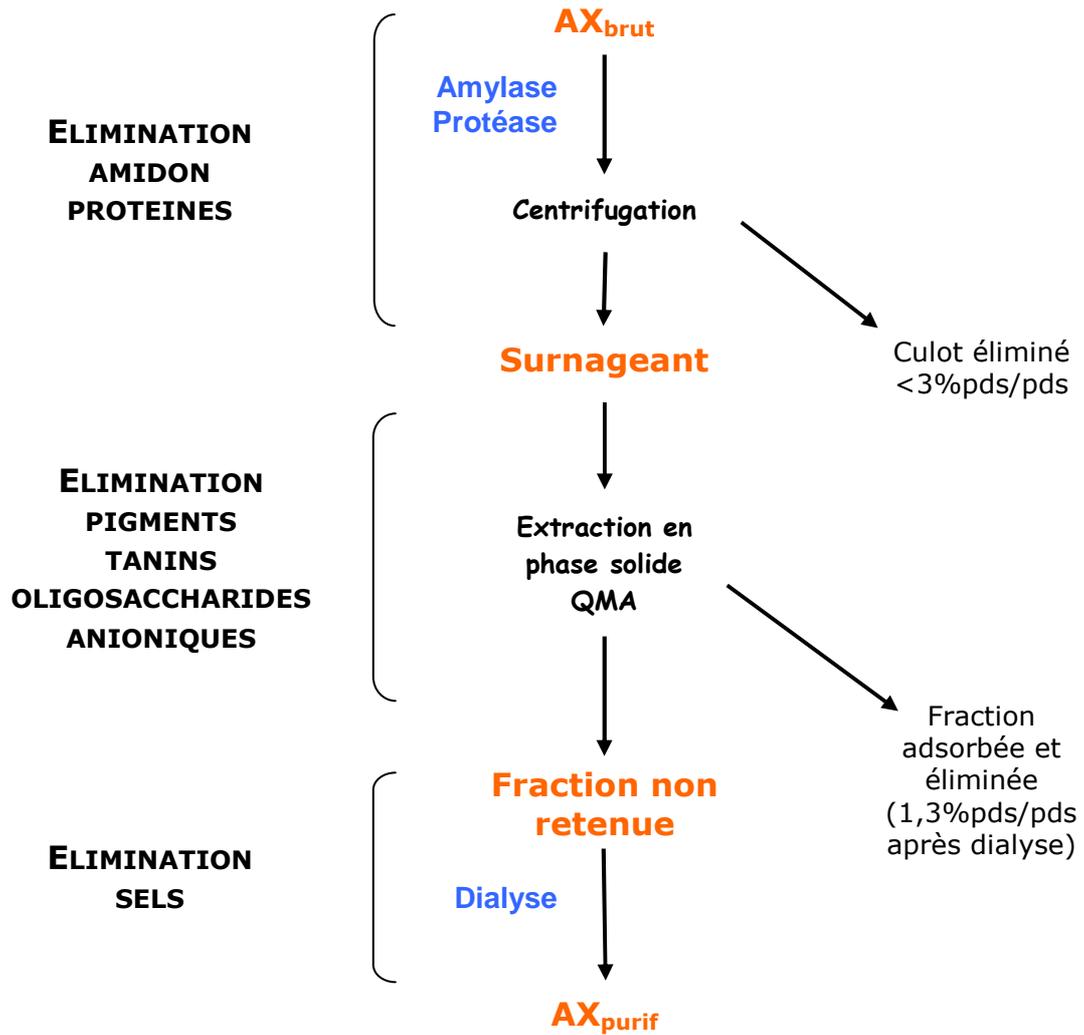


Figure 8 : Organigramme du traitement de purification des AX_{brut}

La démarche est illustrée **figure 8**. L'application d'un tel traitement aux AX_{brut} conduit à des rendements de récupération **30,5g** et **20,7g** d' AX_{purif} pour 100g d' AX_{brut} respectivement pour le blé et le seigle. Les valeurs observées pour les rendements d'obtention des fractions arabinoxylanes purifiées sont en accord avec une élimination exhaustive des contaminants amidon, protéines et sels, initialement présents dans les fractions brutes.

La composition osidique des fractions purifiées, présentée **tableau 9**, confirme l'élimination de l'amidon, le taux de glucose résiduel étant inférieur à 3 moles pour 100 moles d'oses. La teneur en galactose n'est pas affectée et le rapport A/X des échantillons est proche de 1. Dans les AX_{purif} obtenus, ces valeurs attestent d'un très fort taux de ramification des chaînes xylanes.

Tableau 9 : Composition osidique des fractions AX_{purif} de blé et de seigle, exprimée en mole pour 100 moles.

Monosaccharides	AX_{purif} de blé	AX_{purif} de seigle
Arabinose	50,4	45,6
Xylose	44,2	46,1
Galactose	3,8	5,6
Glucose	1,7	2,7
Rapport A/X	1,14	0,99

L'accroissement du rapport A/X s'explique par une élimination sélective de xylose sous forme monomérique et/ou oligosaccharidique, notamment lors de la dialyse, mais également par une rétention sélective possible de xylooligosaccharides associés à des résidus ionisés ou à des composés polyphénoliques, lors de l'extraction sur échangeur d'anions.

En effet, certains constituants fortement colorés, tels que des pigments et des tanins, en mélange avec les arabinoxylanes bruts, sont éliminés par adsorption sur l'échangeur d'ions lors de l'étape d'extraction en phase solide. Des essais menés en parallèle sur cartouches Sep pak (Waters) contenant un gel de silice greffé ammonium quaternaire (QMA), échangeur d'anions ou carboxyméthyle (CM), échangeur de cations, ont montré que la rétention des contaminants colorés et/ou chargés était plus importante sur l'échangeur d'anions type QMA, **figure 9** ci-après :

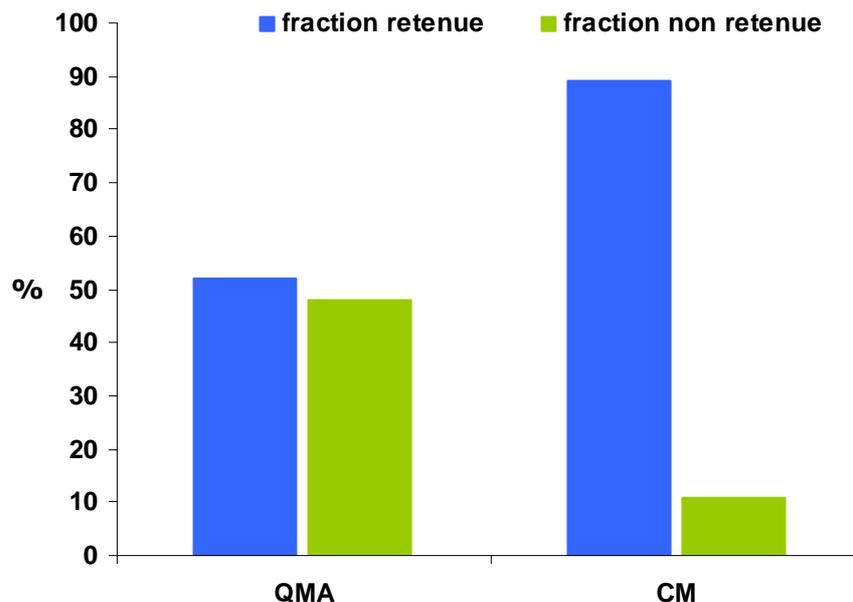


Figure 9 : Purification des AX_{brut} par extraction en phase solide sur échangeur d'ions. La représentativité des fractions est exprimée en g d'oses pour 100g d'oses déposés, dosés par la méthode de Dubois.

Dans tous les cas, la fraction polysaccharidique non retenue sur échangeur d'anions QMA est faiblement colorée, comparativement à celle obtenue dans les mêmes conditions sur échangeur de cations CM.

Les contaminants pigmentés ne sont pas les seuls composés retenus sur la cartouche échangeuse d'anions. Ils sont associés à une fraction osidique qui représente environ 45% des AX_{brut} . Cette fraction est susceptible de contenir entre autre des arabinoxylanes chargés négativement du fait de leur substitution par des acides uroniques. La rétention sélective de ceux-ci est souhaitable car ils sont difficilement hydrolysables par les traitements enzymatiques envisagés ultérieurement pour produire les arabinoxylooligosaccharides, AXOS de faible degré de polymérisation. De plus les AXOS, lorsqu'ils sont fortement substitués, sont difficilement métabolisables par les bactéries et par conséquent présentent un très faible intérêt prébiotique (KABEL 2002c). Pour les raisons évoquées précédemment, nous avons retenu l'extraction en phase solide sur l'échangeur d'anions, type QMA, pour la purification des AX_{brut} à l'échelle préparative.

I 2 3 Bilan de l'extraction

Le rendement final d'obtention des arabinoxylanes purifiés à l'issue de la procédure décrite aux paragraphes I 2 1 et I 2 2, exprimé en g d'AX_{purif} pour 100 g de son traité, est de **10g** et **7g** respectivement pour le blé et le seigle. Les fractions purifiées obtenues ne représentent pas la totalité des arabinoxylanes naturellement présents dans les deux céréales, d'après les teneurs citées dans la littérature (cf. chapitre I). Lors de l'analyse de la composition osidique, réalisée sur des prélèvements effectués au cours du traitement alcalin (résultat non présenté), nous avons constaté la présence non négligeable d'arabinose et de xylose dans les fractions insolubles résiduelles, notées R_{KOH} (cf. **figure 6**). Il est donc probable que la concentration de la potasse, utilisée lors du traitement d'extraction, n'était pas assez importante pour permettre une solubilisation complète des arabinoxylanes, justifiant ainsi leur faible rendement de récupération (MANDALARI 2005). L'augmentation du rapport A/X, observée à l'issue de la phase de purification, est attribuable à l'élimination sélective d'une fraction enrichie en xylose.

I 3 Caractérisation d'une source commerciale d'arabinoxylanes

Afin d'accroître la diversité de structures des arabinoxylanes mis en œuvre ultérieurement pour la production d'arabinoxyloligosaccharides d'intérêt prébiotique, nous avons retenu une préparation commerciale d'arabinoxylanes extraite de son de maïs. Celle-ci sera identifiée AX_{com}. Une comparaison des principales caractéristiques physico-chimiques des AX_{purif} issus de blé et de seigle avec celles de l'AX_{com} a été réalisée.

Les arabinoxylanes commerciaux de maïs, fournis par la société Ulice Limagrin (63, France) sont produits par extraction alcaline à partir de son de maïs. Les analyses, réalisées dans des conditions identiques à celles citées précédemment, révèlent une pureté élevée, comme en atteste le **tableau 10**. Le degré de pureté de la préparation commerciale est compatible avec les études ultérieures envisagées, notamment la production des arabinoxyloligosaccharides.

Tableau 10 : Composition des arabinoxylyanes commerciaux de maïs, les teneurs sont exprimées en g pour 100g d'AX_{com}.

Composition		AX_{com} maïs
Matière sèche		83,8 ± 0,8
dont	Amidon	< 2
	Protéines	1,5 0,5
	Cendres	2,8 ± 0,2
Autres dont AX		78 ± 2

Leur composition osidique, établie dans des conditions expérimentales identiques à celles mises en œuvre pour les sons de blé et de seigle, incluant méthanolyse et dérivation au TMSIm des échantillons, est présentée ci-dessous :

Tableau 11 : Composition osidique des arabinoxylyanes commerciaux de maïs, exprimée en moles pour 100 moles d'oses.

Monosaccharides	AX_{com} maïs
Arabinose	31,8
Xylose	54,3
Galactose	6,7
Glucose	7,3
Rapport A/X	0,58

Les proportions des monosaccharides dans les arabinoxylyanes, issus de maïs, sont sensiblement différentes de celles observées pour les extraits de blé et de seigle. Les taux de glucose et de galactose sont légèrement supérieurs pour le maïs. Le rapport A/X, proche de 0,60, témoigne d'un taux de ramification des chaînes xylyanes moindre, comparativement à celui des AX_{purif} de blé ou de seigle. La valeur plus faible du rapport A/X peut ne pas être seulement liée à l'origine du substrat. En effet, le procédé de production, mis en place à l'échelle du pilote industriel par la société Ulice, peut différer de la procédure que nous avons retenue au laboratoire. Les informations communiquées à ce sujet par la société font seulement état d'une extraction alcaline à partir de son de maïs. Or, nous avons montré précédemment l'influence de l'étape de purification sur le rapport A/X, dans les arabinoxylyanes de blé et de seigle.

I 4 Etude comparée de la distribution des masses moléculaires des arabinoxylanes

L'estimation de la distribution en masses moléculaires des extraits arabinoxylanes, purifiés à partir de blé et de seigle, ou commerciaux issus de maïs, a été réalisée par chromatographie liquide haute performance d'exclusion moléculaire sur gel (High Performance Size Exclusion Chromatography : HPSEC) dans les conditions décrites page 207 du chapitre Matériels et méthodes. L'étalonnage de la colonne Aquagel OH-60 a été effectué à l'aide de dextrans (Fluka). Les masses moléculaires ainsi que les temps de rétention T_R de chacun des marqueurs de masse sont indiqués dans le **tableau 12** suivant :

Tableau 12 : Masses moléculaires et T_R des dextrans utilisés pour la calibration de la colonne HPSEC.

Référence Fluka :	MM en Da	T_R en minutes	Identification sur la figure 5
Dextran 31 428	4 900 000	9,710	1
Dextran 31 426	750 000	10,334	2
Dextran 31 424	410 000	10,639	3
Dextran 31 422	150 000	11,031	4
Dextran 31 420	50 000	11,381	5

L'analyse chromatographique par HPSEC de chacun de ces marqueurs permet d'établir la courbe d'étalonnage de la colonne présentée **figure 10** ci-après :

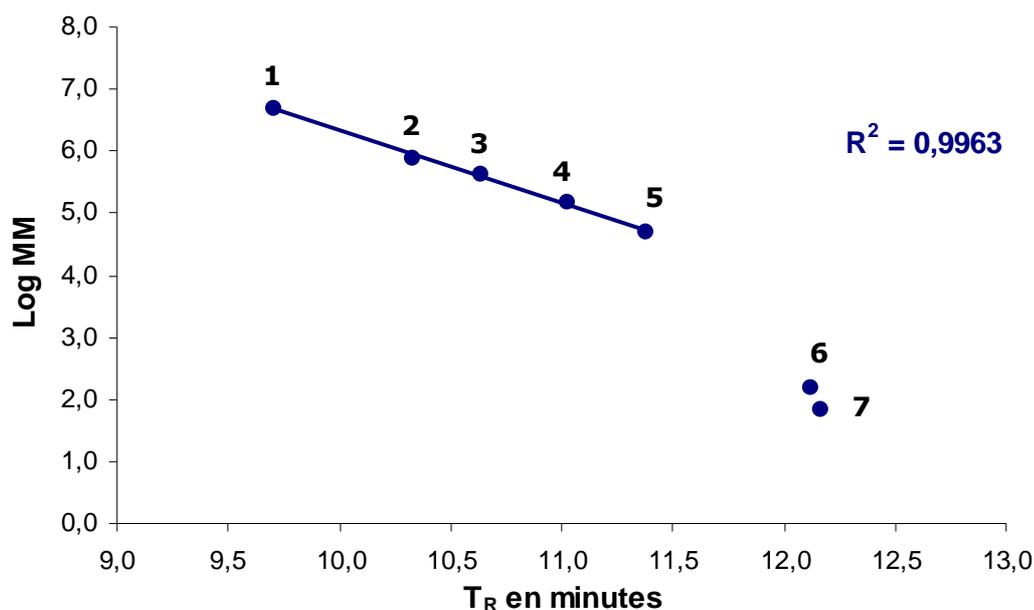


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la colonne polyol Aquagel OH-60, les marqueurs 6 et 7 correspondent respectivement au xylose et au NaCl.

L'estimation de la distribution des masses moléculaires des AX_{purif} et AX_{com} est réalisée en se référant à la courbe étalon présentée **figure 10**. Les masses des arabinoxylanes, exprimées en masse équivalentes de dextrans linéaires, sont indiquées dans le **tableau 13**. Pour chacun des AX analysés, nous indiquons le T_R ainsi que la valeur de la masse moléculaire correspondants au sommet du pic chromatographique relatif à l'élution de l'échantillon :

Tableau 13 : Estimation des masses moléculaires des arabinoxylanes extraits et commerciaux, par HPSEC sur colonne Aquagel OH-60.

Nature des AX		T _R en min	MM moyenne en Da
Maïs	AX _{com}	10,774	270 000
Blé	AX _{brut}	10,910	187 000
	AX _{purif}	10,931	177 000
Seigle	AX _{brut}	10,889	197 000
	AX _{purif}	10,982	155 000

Le pic chromatographique relatif à l'élution de chaque type d'AX recouvre une plage de temps de rétention d'environ 3min, traduisant une forte amplitude de la distribution des masses moléculaires, allant de plus de 2.10^3 kDa à moins de 50 kDa.

En conclusion, l'application des traitements de délignification et d'extraction alcaline aux sons de blé et de seigle, conduit après purification à deux fractions arabinoxylanes de composition voisine et sensiblement différente de celle de la source commerciale issue de maïs. Cette différence est aussi constatée au niveau des masses moléculaires moyennes estimées, celle la fraction AX_{com} étant supérieure à celles des extraits obtenus au laboratoire.

II Hydrolyse des arabinoxylanes en arabinoxyloligosaccharides

La mise en place puis l'optimisation d'un procédé d'hydrolyse d'arabinoxylanes purifiés, ou commerciaux, en arabinoxyloligosaccharides (AXOS) d'intérêt prébiotique potentiel a nécessité le choix d'une méthodologie appropriée pour son suivi.

II 1 Mise au point de la méthode de suivi d'hydrolyse

Le critère que nous avons choisi pour suivre qualitativement et quantitativement l'hydrolyse des arabinoxylanes est l'évolution de la distribution des masses moléculaires des oligosaccharides engendrés. Pour cela, nous avons employé la chromatographie liquide haute performance d'exclusion moléculaire sur gel. La technique HPSEC, couplée à une détection réfractométrique ou à diffusion de lumière décrite pages 207 du chapitre Matériels et méthodes, permet de qualifier et de quantifier les produits d'hydrolyse séparés sur le critère masse moléculaire. La zone de fractionnement linéaire des colonnes Aquagel OH-30 utilisées dans ce but est comprise entre 30 000 et 200Da.

Afin de réaliser l'analyse qualitative et quantitative de la distribution des tailles, le système chromatographique est étalonné à l'aide de marqueurs de masse moléculaire dont la nature et les domaines de temps de rétention, T_R , sont indiqués dans le **tableau 14** :

Tableau 14 : Nature, masse moléculaire et temps de rétentions des marqueurs utilisés pour l'étalonnage de la colonne HPSEC Aquagel OH-30.

NATURE DU MARQUEUR	DOMAINE DE MM EN Da	DOMAINE DE T_R EN MIN	IDENTIFICATION
Arabinoxylane de maïs	> 30 000	9,5 à 11,0	P1 : polymères de haute masse
	< 30 000	11,0 à 15,5	P2 : polymères de faible masse
Inuline	≈ 10 000	15,5 à 18,4	O1 : oligomères 10 < DP < 60
Fructooligosaccharides RP 95	de 1500 à 300	18,4 à 19,5	O2 : oligomères DP ≤ 10
Xylose et arabinose	150	19,5 à 21,0	M : monomères

Un mélange étalon de maltooligosaccharides a aussi été testé, le profil chromatographique est présenté en annexe 1.

La zone d'éluion correspondant aux polymères est subdivisée en deux sous-fractions identifiées P1 et P2 :

- **P1** correspond aux polysaccharides non retenus par la phase stationnaire, donc de masses moléculaires supérieures à 30kDa, ce qui correspond à la limite d'exclusion de la colonne.
- **P2** correspond aux polysaccharides faiblement retenus, dont les masses moléculaires sont comprises entre 30 000 Da et 10 000Da.

La validité de l'étalonnage, pour l'application envisagée, dépend étroitement de la structure des solutés marqueurs de masse utilisés. En exclusion moléculaire sur gel, ce n'est pas la masse moléculaire mais le volume occupé par la molécule en solution dans la phase mobile qui détermine son aptitude à diffuser de façon plus ou moins importante au sein des pores de la phase stationnaire. Dans ces conditions, on comprend aisément qu'à masses

identiques, des oligosaccharides linéaires et ramifiés peuvent présenter des temps de rétention différents, ce qui rend l'interprétation du chromatogramme délicate. Ainsi, considérons nous, les valeurs de masses moléculaires déterminées à partir de l'étalonnage, seulement comme des estimations, qui permettront toutefois de bien visualiser l'avancement de la réaction d'hydrolyse des arabinoxylanes, **figure 11**.

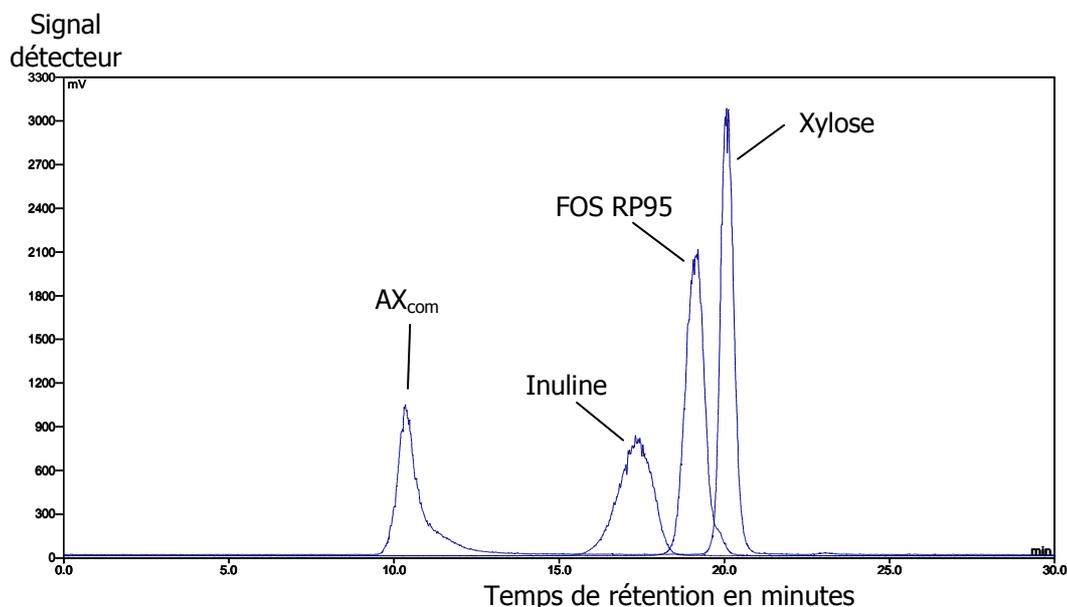


Figure 11 : Profils chromatographiques des marqueurs de masse utilisés pour l'étalonnage de la colonne Aquagel OH-30.

L'analyse quantitative est réalisée sur la base de l'exploitation du signal du détecteur à diffusion de lumière, DDL, ou evaporative light scattering detector ELSD. Celui-ci autorise la quantification des familles moléculaires éluées dans les domaines de temps de rétention indiqués dans le **tableau 14**. La coélution des sels et des solutés organiques de faibles masses moléculaires, tels que les monosaccharides, est souvent un problème perturbant la quantification de ces derniers. Grâce à la mise en œuvre du DDL et du caractère volatil de la phase mobile, tampon acétate d'ammonium 50mM, on s'affranchit de l'interférence des sels lors de la détection des monosaccharides, ce que n'aurait pas permis un réfractomètre différentiel.

La réponse du détecteur à diffusion de lumière en fonction de la quantité de matière n'est pas linéaire, elle est traduite par la relation suivante :

$$A = \alpha m^\beta$$

où A = aire du pic correspondant à l'élution des solutés détectés

m = la masse de soluté déposée sur la colonne

α et β = coefficients dont les valeurs dépendent, pour une température d'évaporation donnée et constante pendant l'analyse, de la taille des gouttelettes dans le nébulisat, de la nature et de la concentration des solutés (CHARLESWORTH 1978, STOLYHWO 1984, DESCHAMPS 2002).

En conséquence, le coefficient de réponse du DDL dépend, pour un soluté oligosaccharidique donné, de sa structure (linéaire ou ramifiée) et de son degré de polymérisation. Aussi, avons-nous réalisé un étalonnage du détecteur pour chacun des marqueurs de masse définis précédemment (cf. **tableau 14**). La réponse du détecteur en fonction des quantités injectées est linéarisée en utilisant une représentation en coordonnées logarithmiques, **figure 12** ci-dessous :

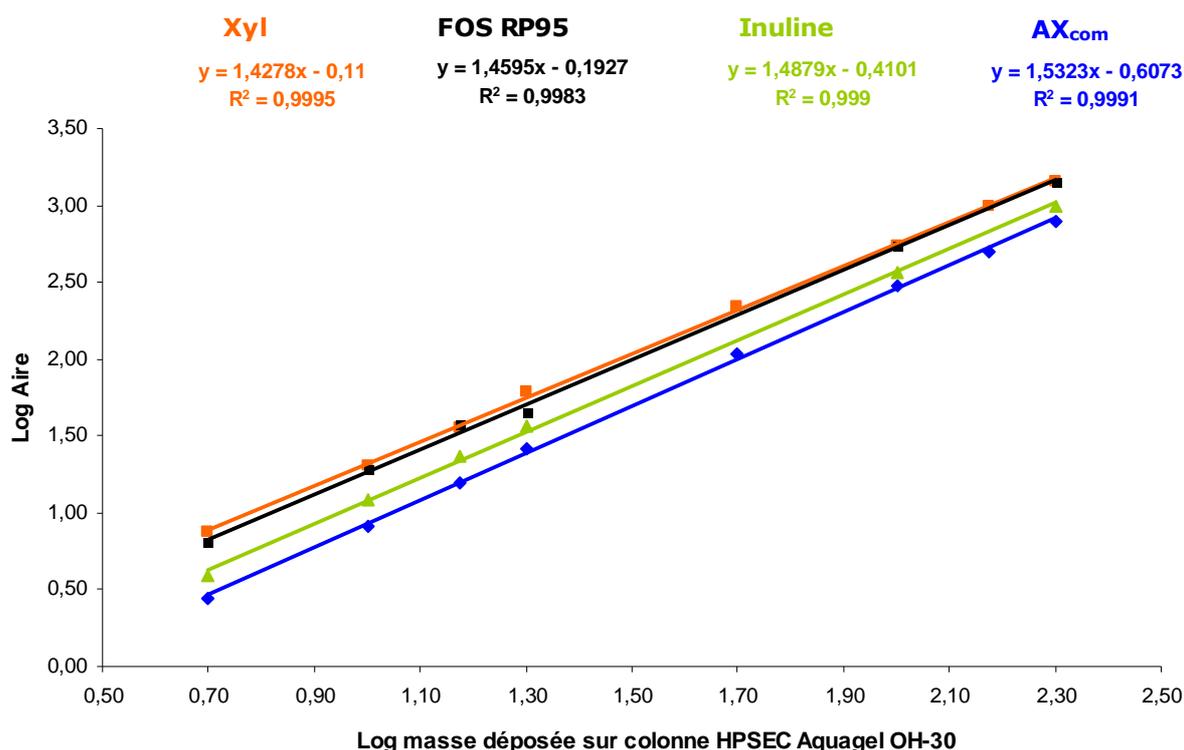


Figure 12 : Etalonnage du DDL à l'aide des différents marqueurs de masse moléculaire : AX_{com}, Inuline, FOS RP95 et Xylose. Les quantités déposées, m , de chaque marqueur sont comprises entre 5 μ g et 200 μ g.

L'exploitation des données graphiques conduit à l'établissement d'une équation reliant l'aire du pic d'élution à la masse de solutés oligosaccharidiques élués, pour chacune des 5

familles moléculaires que l'on souhaite quantifier au cours de l'hydrolyse des arabinoxyanes. Les résultats sont présentés dans le **tableau 15** ci-après :

Tableau 15 : Etablissement de la relation entre l'aire du pic chromatographique et la quantité de soluté élué.

Famille moléculaire dosée		Relation A = f(m)
P1	Polysaccharides de hautes masses	$A (P) = 0,2470 \times m^{1,5323}$
P2	Polysaccharides de faibles masses	
O1	Oligomères : $10 < DP < 60$	$A (O1) = 0,3890 \times m^{1,4879}$
O2	Oligomères : $DP \leq 10$	$A (O2) = 0,6417 \times m^{1,4595}$
M	Monomères	$A (M) = 0,7762 \times m^{1,4278}$

Avec A = aire du pic chromatographique, en unité arbitraire ; m = masse ou quantité de soluté élué, en µg.

Cet outil analytique, rapide est bien adapté au suivi qualitatif et quantitatif de l'hydrolyse des arabinoxyanes afin de produire les arabinoxyooligosaccharides recherchés.

II 2 Hydrolyse des arabinoxyanes

La production d'oligosaccharides de faible DP, à partir d'arabinoxyanes, nécessite d'hydrolyser un nombre suffisant de liaisons osidiques diverses, incluant à la fois celles du squelette linéaire de xylanes, liaisons de type β 1-4, et celles des ramifications, principalement de types β 1-2 et β 1-3. Le clivage de ces liaisons peut être obtenu à l'issue d'un traitement à chaud en milieu acide ou bien en présence de catalyseurs biologiques spécifiques, telles que des xylanases et des arabinases. Ces deux approches vont être abordées dans les paragraphes suivants. Dans tous les cas, on cherchera à déterminer les conditions expérimentales qui permettent de concilier un rendement élevé de production d'oligosaccharides, $2 < DP < 10$, sans libération concomitante de monosaccharides.

II 2 1 Hydrolyse chimique

Pour ce qui concerne l'hydrolyse chimique, on ne peut pas parler de spécificité au sens propre du terme. Le clivage de la liaison osidique, en présence d'acide minéral ou organique

et à chaud, dépend essentiellement de la stabilité du lien covalent dans les conditions opératoires imposées.

Dans le cadre de notre problématique, nous souhaitons obtenir une déstructuration importante des polymères arabinoxylyanes, sans toutefois en altérer irréversiblement la structure des oses constitutifs. Cet impératif implique de choisir des conditions opératoires douces, compatibles avec une absence de destruction sélective des résidus osidiques constitutifs. Pour satisfaire cette condition, nous avons choisi d'utiliser un protocole expérimental déjà mis en œuvre pour l'hydrolyse acide de fructanes (POLLOCK 1979, HEYRAUD 1984, WOLF 1975, SUZUKI 1968). En effet, parmi les oses constitutifs des polysaccharides, le fructose est l'un des plus fragile, sa dégradation étant aisée en milieu acide. Le premier essai est conduit à 60°C, en présence d'acide trifluoroacétique, TFA, à 0,5M. L'avancement de l'hydrolyse des AX_{com} de maïs, ou des AX_{purif} de blé et de seigle à 10mg.mL⁻¹, est suivi par HPSEC sur colonne Aquagel OH-30. Les résultats sont illustrés **figure 13** :

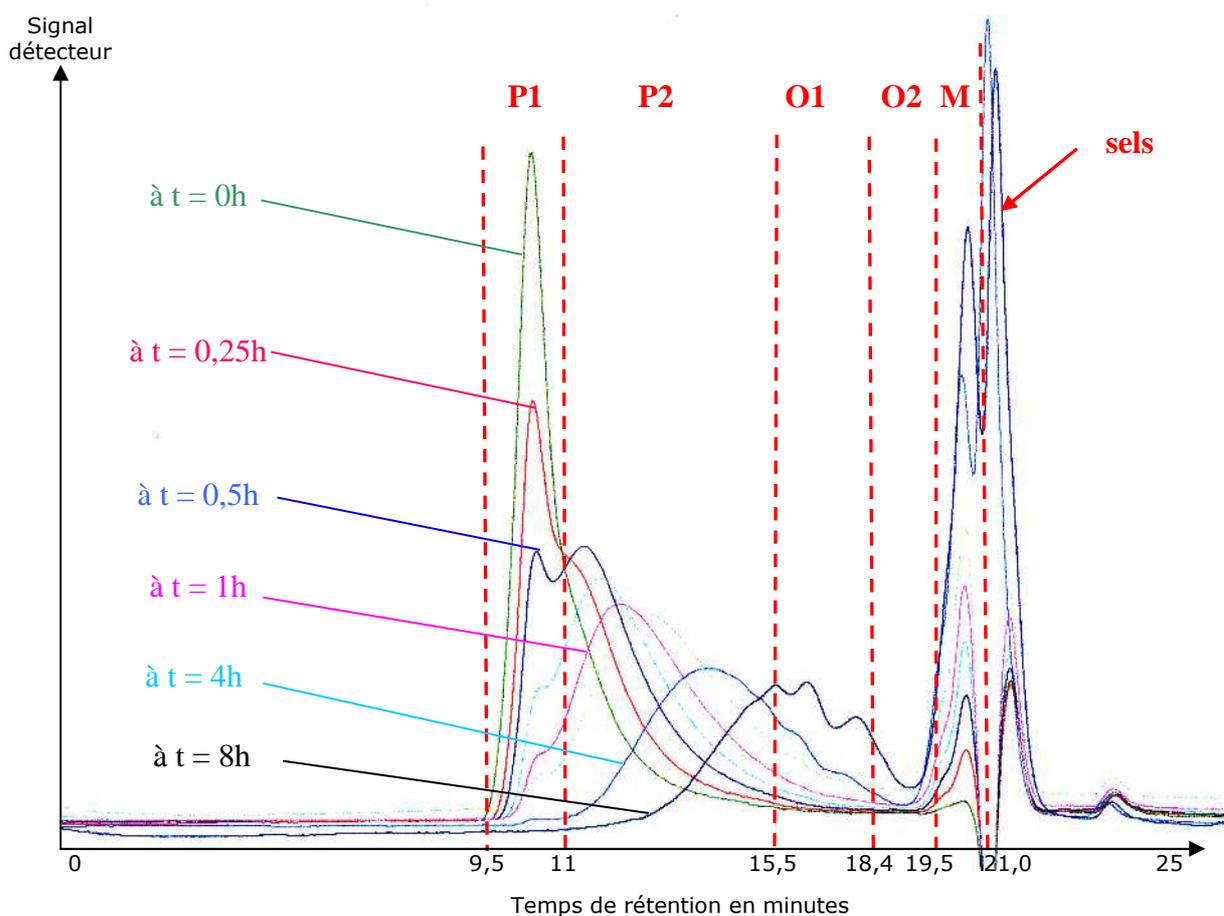


Figure 13 : Suivi cinétique de l'hydrolyse acide de AX_{com} de maïs par HPSEC et détection réfractométrique.

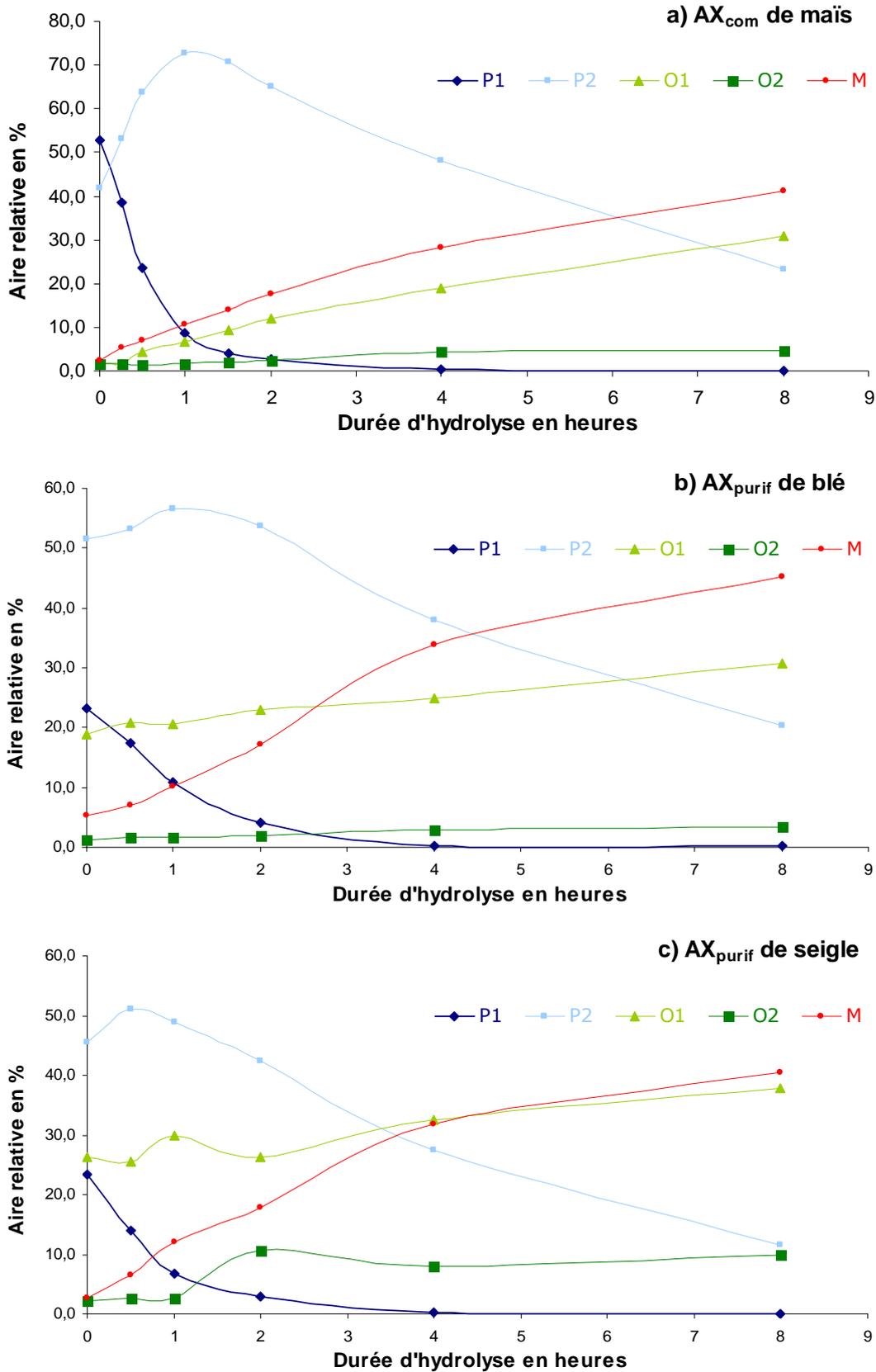


Figure 14 : Suivi cinétique de l'hydrolyse chimique des AX, par HPSEC et détection réfractométrique : a) AX_{com} de maïs, b) AX_{purif} de blé et c) AX_{purif} de seigle.

Remarque : l'utilisation du détecteur à diffusion de lumière sera systématique seulement dans le chapitre suivant, où la quantification précise de chaque famille moléculaire est indispensable.

Au cours de cette première approche expérimentale de l'hydrolyse des arabinoxylanes, purifiés ou commerciaux, nous avons utilisé un détecteur de type réfractomètre différentiel, en aval de la colonne. L'évaluation des proportions des différentes familles moléculaires d'intérêt est traduite en considérant seulement les aires des pics chromatographiques relatifs à leur élution. Les résultats, exprimés en aires relatives par la relation ci-dessous, sont présentés **figure 14a 14b et 14c**.

$$A_{rel} = \frac{\text{aire du pic d'élution de la famille considérée}}{\text{aire totale du chromatogramme}} \times 100$$

Quel que soit le substrat soumis à l'hydrolyse acide, au cours de la première heure d'incubation, on constate une rapide diminution de la fraction polysaccharidique de haute masse moléculaire, fraction P1, avec une apparition concomitante de polymères de masse inférieure à la limite d'exclusion de la colonne, correspondant à la fraction P2. La deuxième phase du processus d'hydrolyse acide entre 1h et 8h, se traduit par la libération prépondérante de deux familles moléculaires :

- des arabinoxyloligosaccharides de DP compris entre 10 et 60, identifiés O1
- des monosaccharides, notés M

Dans de telles conditions, la représentativité des oligosaccharides d'intérêt, de DP compris entre 2 et 10, reste constante et très insuffisante. Un accroissement de la température d'hydrolyse de 60°C à 80°C accentue la production de monosaccharides de façon significative, figure 15. Dans la limite des conditions expérimentales testées, il semble qu'il ne soit pas possible de concilier la production d'arabinoxyloligosaccharides de faible DP, avec un rendement élevé, et l'absence ou la faible libération de monosaccharides, comme en atteste la **figure 15**.

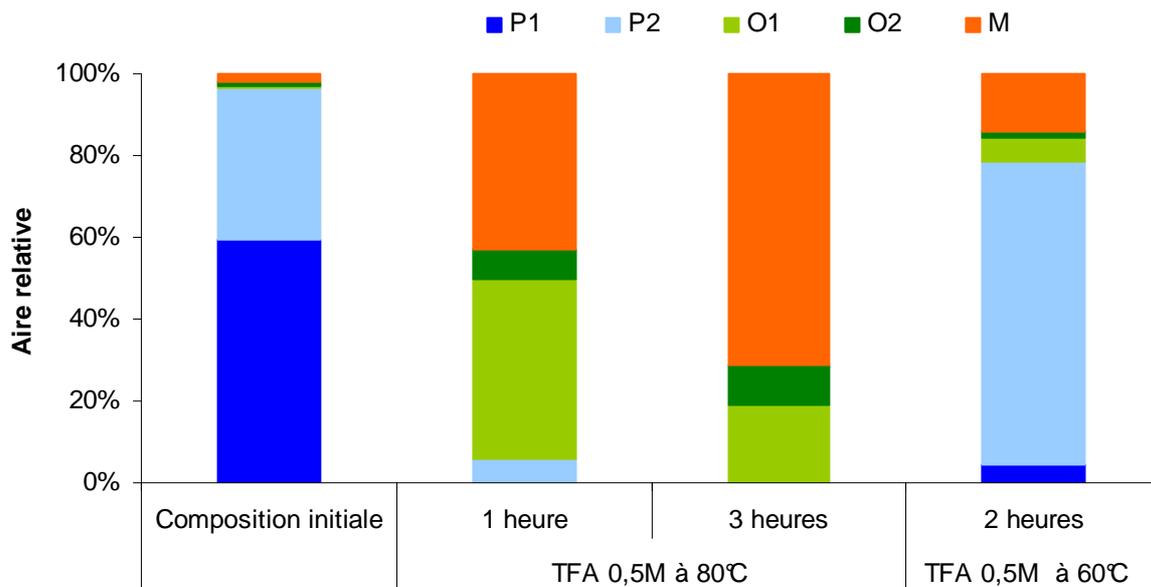


Figure 15 : Effet de la durée et de la température sur la distribution en taille des produits d'hydrolyse des AX_{com} , estimée par HPSEC sur colonne Aquagel OH-30.

Toutefois, dans ce processus de dépolymérisation d'AX, au cours duquel, pour un acide donné, on peut influencer l'avancement de la réaction d'hydrolyse en agissant sur la concentration en acide, la température et la durée du traitement, il apparaît nécessaire d'avoir recours à une approche rationnelle telle que celle du plan d'expériences pour définir, parmi les multiples combinaisons possibles entre les trois paramètres cités, celle(s) qui permet(tent), au mieux de s'approcher des objectifs fixés. Cela sera abordé au chapitre IV.

II 2 2 Hydrolyse enzymatique

II 2 2 1 Choix des enzymes et contrôle des activités

Trois xylanases d'origines différentes ainsi qu'une arabinase ont été mises en œuvre individuellement ou en combinaison pour hydrolyser les arabinoxylanes. Celles-ci sont identifiées XS, XL, XM et AM, leurs principales caractéristiques sont indiquées pages 189 du chapitre Matériels et méthodes. Afin de normaliser les essais d'hydrolyse enzymatique, nous

avons contrôlé la pureté et mesuré l'activité des différentes préparations commerciales de xylanases. Pour l'arabinase AM, seule sa pureté a été contrôlée.

Les conditions expérimentales pour l'analyse de la pureté par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes ainsi que pour le contrôle de l'activité glycolytique sont indiquées respectivement pages 214 et 187 du chapitre Matériels et méthodes. L'unité d'activité, UE, est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mole équivalent xylose, dosable par la méthode de LEVER (1972), spécifique des sucres réducteurs, par minute dans les conditions du test à pH 5 et T = 40°C. Les résultats sont présentés **tableau 16** :

Tableau 16 : Caractéristiques des xylanases utilisées au cours de l'étude.

Symbole	Origine	Fournisseur	Activité UE.mg ⁻¹ de solide lyophilisé
XS	fongique (<i>Trichoderma viride</i>)	Sigma	72
XL	Non communiquée	Lyven	3,5
XM	Fongique (<i>Trichoderma longibrachiatum</i>)	Megazyme	100

L'activité de la préparation industrielle de xylanase Lyven, XL, est 20 à 30 fois inférieure à celles des xylanases Sigma, XS, et Megazyme, XM. L'analyse électrophorétique, **figure 16**, indique la présence d'une protéine identique et très majoritaire à MM \approx 19,5 kDa pour les préparations XS et XM. La masse estimée est en accord avec celle publiée dans la littérature pour les xylanases de *Trichoderma* par YAGUCHI (1992). En ce qui concerne la préparation industrielle XL, le taux de protéines contaminantes est très supérieur à celui observé pour XS et XM et justifie la plus faible activité mesurée pour cette enzyme. De plus, aucune bande protéique n'apparaît dans la zone de masse équivalente à celle des xylanases Sigma et Megazyme, ce qui tendrait à prouver que la glycosidase industrielle est différente des deux précédentes. Lors de la mise en œuvre des enzymes pour l'hydrolyse des arabinoxylanes, nous tiendrons compte des différences d'activité mesurées afin de travailler à concentration en xylanases identique, exprimée en UE.mL⁻¹ de milieu réactionnel, au cours de chaque essai.

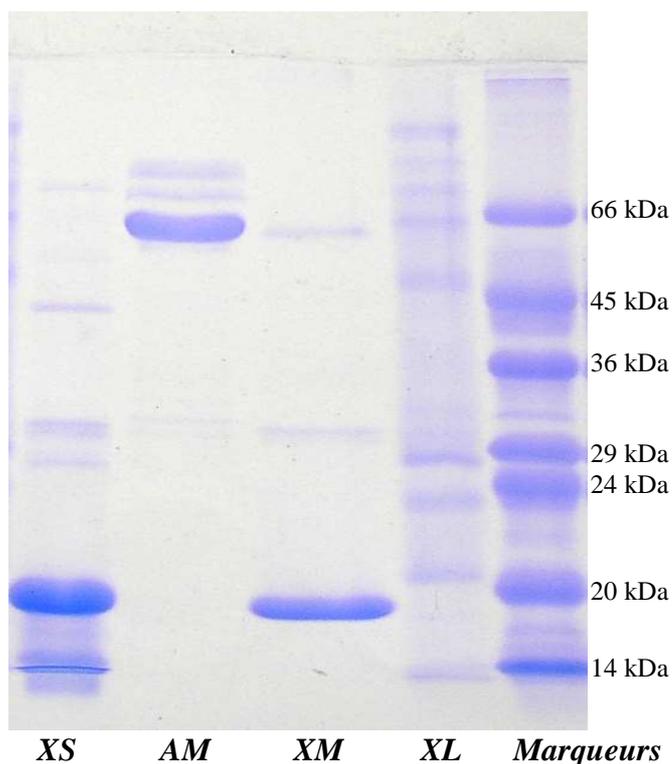


Figure 16 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12%, des différentes préparations enzymatiques utilisées pour l'hydrolyse des AX.

La préparation d'arabinase produite par *Aspergillus niger*, commercialisée par Megazyme, présente un degré de pureté élevé caractérisé par la bande de protéine très majoritaire de masse moléculaire estimée à environ 64 kDa, en accord avec les observations de Van der VEEN (1991).

II 2 2 2 Hydrolyse enzymatique des arabinoxylanes

Les essais d'hydrolyse enzymatique sont réalisés dans les conditions expérimentales définies pages 196 du chapitre Matériels et méthodes. La concentration en enzyme est fixée à $0,2 \text{ UE.mL}^{-1}$ de milieu réactionnel. Lorsque plusieurs xylanases sont utilisées simultanément pour dégrader les polysaccharides, les concentrations de chacune d'entre elles sont également fixées à $0,2 \text{ UE.mL}^{-1}$. Au cours de certains essais, nous avons testé des combinaisons xylanase/arabinase. Lorsque cette dernière enzyme est mise en œuvre, sa concentration est ajustée à $0,25 \text{ UE.mL}^{-1}$ en se référant à la définition de l'unité d'activité donnée par le fournisseur de l'arabinase.

Le suivi de l'hydrolyse est assuré par HPSEC sur colonne Aquagel OH-30 dans des conditions identiques à celles décrites pour le suivi de l'hydrolyse acide (cf. II 2 1). Les AX_{com} de maïs, sont utilisés en tant que substrat à 10mg.mL^{-1} , les résultats sont illustrés **figure 17** ainsi qu'en *annexe 2*.

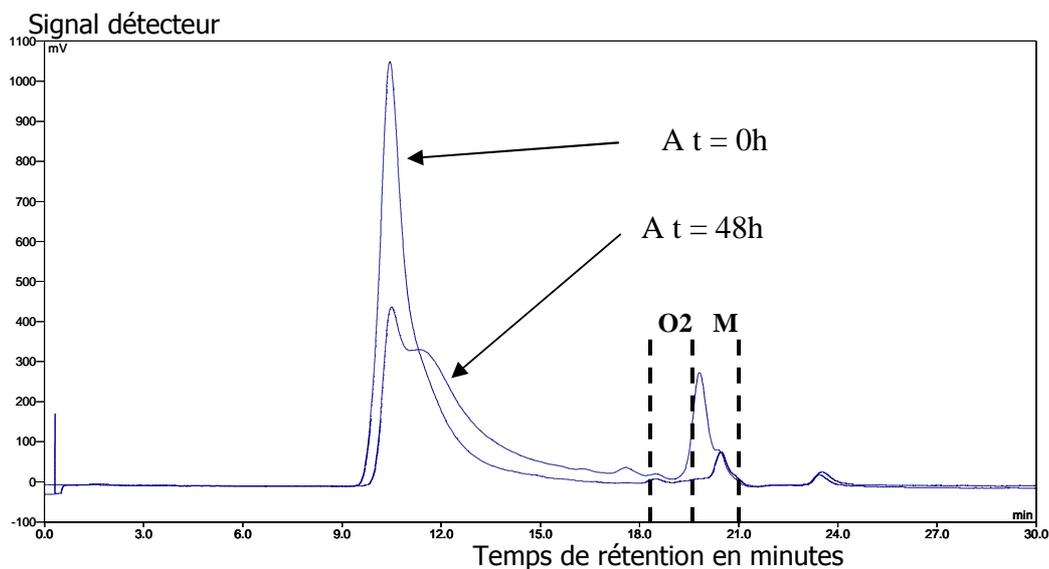


Figure 17 : Suivi par HPSEC de la distribution des masses moléculaires des AX_{com} de maïs au cours de l'hydrolyse par la xylanase XL.

La dégradation enzymatique du substrat est très limitée après 48h d'incubation avec la xylanase XL. Les mêmes observations sont faites avec les deux autres préparations de xylanases. L'enzyme industrielle XL engendre la libération de monosaccharides, ceci peut être attribué à la présence d'exo-glycosidases contaminantes dans la préparation commerciale utilisée. Aucune des trois enzymes utilisées seules n'engendre la libération d'oligosaccharides dans le domaine de taille souhaité : $2 < DP < 10$. Toutes ces observations nous amènent à conclure que le substrat dans son état purifié, fortement ramifié ($0,6 < A/X < 1$), est peu accessible aux xylanases. Des essais complémentaires impliquant l'utilisation simultanée de plusieurs xylanases avec ou sans addition d'arabinase ont été réalisés. Les résultats sont présentés **figure 18** :

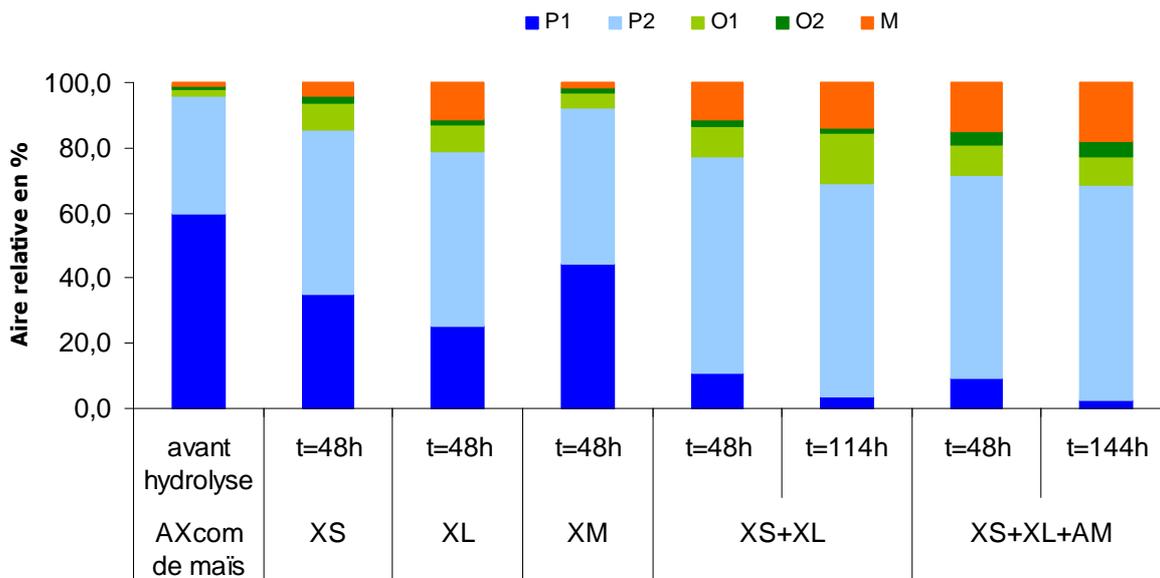


Figure 18 : Hydrolyses d'AX_{com} de maïs par différentes combinaisons enzymatiques, les proportions de chaque famille moléculaire, déterminées par HPSEC, sont exprimées en aire relative.

Même si l'on atteint une dégradation complète du polymère dans son état natif, caractérisé par la disparition du pic d'éluion correspondant au volume mort de la colonne HPSEC, aucune des combinaisons enzymatiques testées ne conduit à la production d'AXOS de $2 < DP < 10$, avec un rendement intéressant. Dans le meilleur des cas, la combinaison XS+XL+AM engendre la formation d'environ 13,4 % d'AXOS dans le domaine de degré de polymérisation d'intérêt.

En conclusion, il apparaît difficile de produire, dans les conditions fixées, des oligosaccharides de DP inférieur à 10 avec un rendement important. Chaque xylanase, utilisée seule, possède une activité faible vis à vis du substrat AX_{com} issu de maïs. La plus performante d'entre elles reste l'enzyme XL, bien que celle-ci engendre la plus forte libération de monosaccharides. L'ajout de l'arabinofuranosidase dans le milieu réactionnel, dans le but d'éliminer les ramifications sur les chaînes principales de xylanes et donc d'augmenter l'accessibilité des sites de clivage des xylanases, ne permet pas d'améliorer ce résultat. On peut conclure ici, que la nature relativement complexe, hautement substituée, des arabinoxylanes purifiés de haut poids moléculaire, soit limitante pour leur hydrolyse

enzymatique. En effet, les xylanases inopérante sur les AX, hydrolysent rapidement un substrat linéaire non ramifié tel que le xylane de hêtre, **figure 19** :

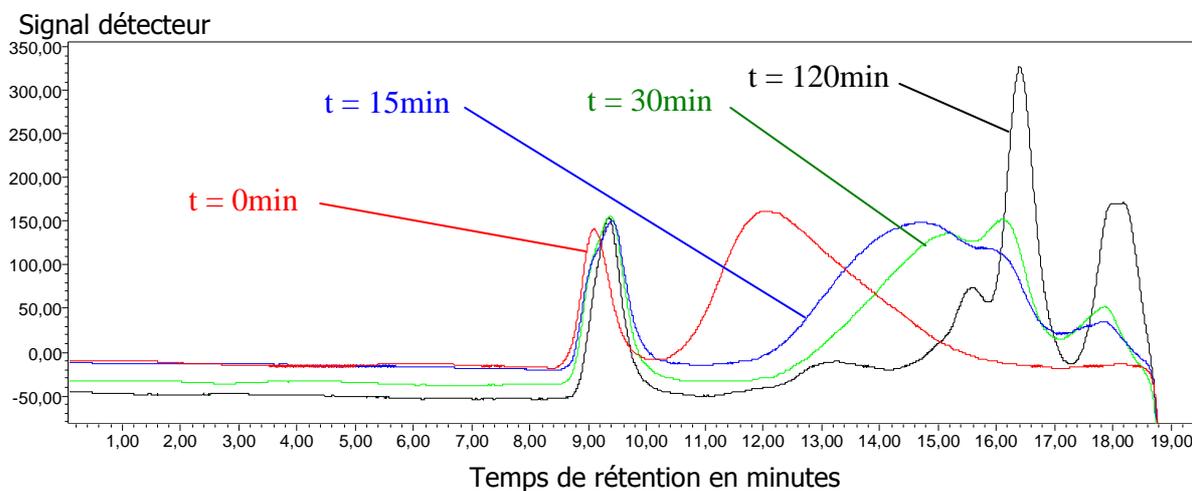


Figure 19 : Suivi cinétique de l'hydrolyse de xylane linéaire de hêtre par la xylanase XS. Les concentration en enzyme et en substrat sont respectivement de $0,2 \text{ UE.mL}^{-1}$ et 10 mg.mL^{-1} .

L'accroissement du rendement de production d'oligosaccharides de $2 < DP < 10$ à partir d'AX n'est pas significatif lorsque l'on multiplie par 10 la concentration en enzyme (résultats non présentés). Afin de surmonter les difficultés rencontrées, il est nécessaire d'augmenter l'accessibilité des liaisons β 1-4 des AX aux xylanases. Un prétraitement physique (KABEL 2002a) ou chimique des substrats macromoléculaires peut engendrer une déstructuration des polymères compatible avec une attaque enzymatique ultérieure. Nous allons vérifier expérimentalement la validité de cette approche.

II 2 3 Combinaison d'hydrolyses chimique et enzymatique

L'attaque directe des arabinoxylanes, soit à chaud en milieu acide dilué, soit par des biocatalyseurs, ne permet pas d'aboutir à la production d'oligosaccharides de faible degré de polymérisation. Le problème inhérent à l'hydrolyse chimique réside dans le contrôle du procédé. Il apparaît difficile de concilier la dépolymérisation des AX_{purif} ou AX_{com} en AXOS de faible DP sans une libération importante de monosaccharides. De plus, les polysaccharides

extraits de sons de blé, de seigle et de maïs possèdent des structures hautement ramifiées qui leur confèrent une grande résistance à l'action des glycohydrolases utilisées.

Pour toutes ces raisons, la combinaison des deux modes d'hydrolyse a été envisagée comme une solution probable pour la production d'AXOS. Lors d'une première étape l'hydrolyse chimique douce doit déstructurer les arabinoxylanes, augmentant ainsi l'accessibilité des sites de clivage aux xylanases et arabinases mise en œuvre dans une deuxième étape. Les différentes combinaisons de traitement chimique puis enzymatique testées sont reportées dans le **tableau 17** suivant :

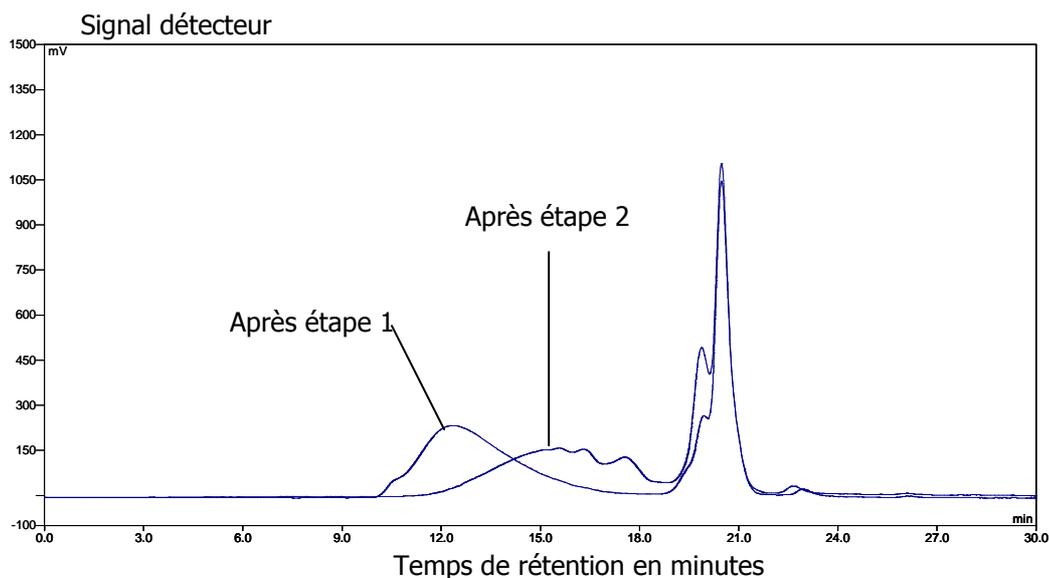
Tableau 17 : Liste des combinaisons hydrolyses chimique puis enzymatique testées.

Référence de l'essai	Conditions du traitement chimique	Conditions d'hydrolyse enzymatique*
1	TFA 0,5M, 80°C, 1h	XS + XL pendant 48h
2	TFA 0,5M, 60°C, 2h	XS pendant 48h
3	TFA 0,5M, 60°C, 2h	XL pendant 48h
4	TFA 0,5M, 60°C, 2h	XL pendant 110h
5	TFA 0,5M, 60°C, 8h	XS pendant 48h
6	TFA 0,5M, 60°C, 8h	XL pendant 48h

* : les concentrations de chacune des enzyme sont fixées à $0,2 \text{ UE.mL}^{-1}$ de milieu réactionnel.

L'étape d'hydrolyse chimique est réalisée selon le protocole décrit page 196 du chapitre Matériels et méthodes, sur un AX_{com} de maïs. A l'issue du traitement, le TFA est éliminé par deux cycles de lyophilisation. Le résidu sec obtenu est solubilisé dans un tampon acétate d'ammonium, 50mM pH 5, équilibré sous agitation à 40°C, puis les xylanases sont additionnées au milieu réactionnel.

L'évolution de la distribution des familles moléculaires P1, P2, O1, O2, et M définies précédemment est suivie par HPSEC, couplée au détecteur réfractométrique. Les résultats sont illustrés **figure 20** et **figure 21**.



**Figure 20 : Suivi par HPSEC de l'évolution de la distribution des masses des produits d'hydrolyse des AX après :
étape 1 (TFA 0,5M, 60°C 2h) puis étape 2 (XL pendant 110h)**

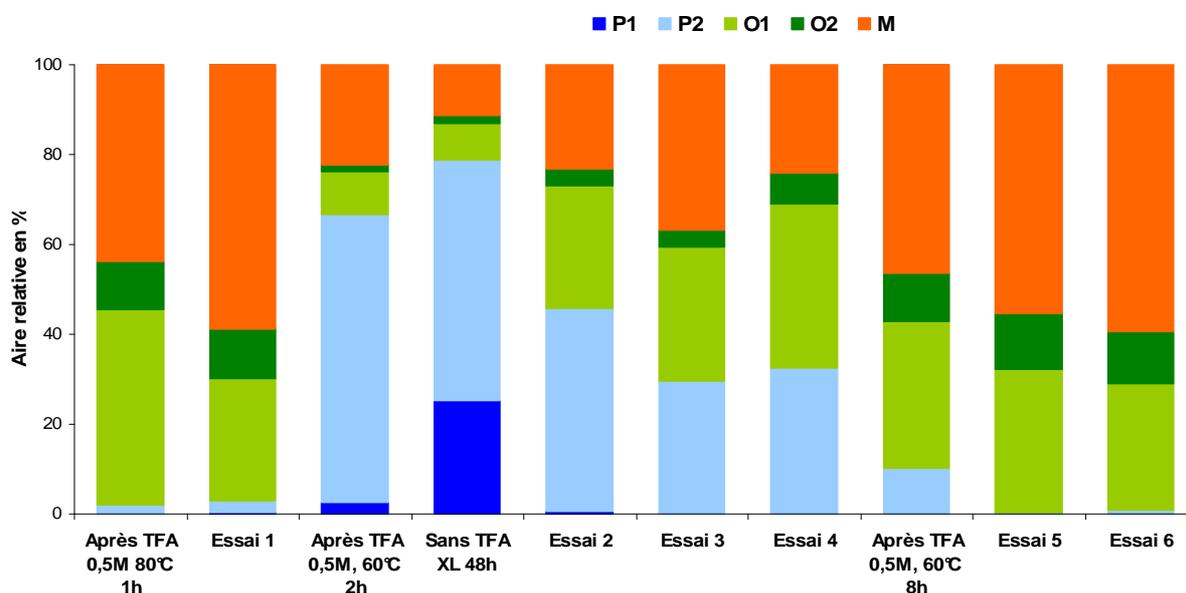


Figure 21 : Effet de diverses combinaisons d'hydrolyses chimique puis enzymatique des AX_{com} issus de maïs, sur la distribution en taille des produits de la réaction.

La production d'arabinoxyloligosaccharides de faible degré de polymérisation, à partir des extraits de blé, seigle ou maïs, est rendue difficile du fait de la complexité des substrats

utilisés. Une hydrolyse directe des polysaccharides, qu'elle soit chimique ou enzymatique, ne permet pas d'atteindre les objectifs fixés. Par contre, la combinaison de ces deux modes de dépolymérisation d'AX_{purif} donne des résultats encourageants. Même si les rendements de production d'oligosaccharides de DP compris entre 2 et 10 (O2) ne sont pas suffisants, on constate qu'en combinant un traitement par le TFA (0,5M, à 60°C pendant 2h) suivi d'une hydrolyse par la xylanase XL, pendant 110h, la distribution des familles moléculaires évolue dans le sens souhaité. On observe une augmentation d'un facteur 4,5 de la famille O2 sans accroissement simultané des monosaccharides. Un tel constat incite à explorer de manière plus rationnelle ce double processus hydrolytique. Compte tenu du nombre important de paramètres qu'il est possible de faire varier pour rendre maximale la libération d'AXOS de faible DP, il est apparu opportun de mettre en place un plan d'expériences pour aborder l'optimisation du procédé. Cette approche va être développée dans le chapitre suivant.

CHAPITRE III

OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'AXOS : MISE EN ŒUVRE D'UNE APPROCHE PAR PLANS D'EXPERIENCES

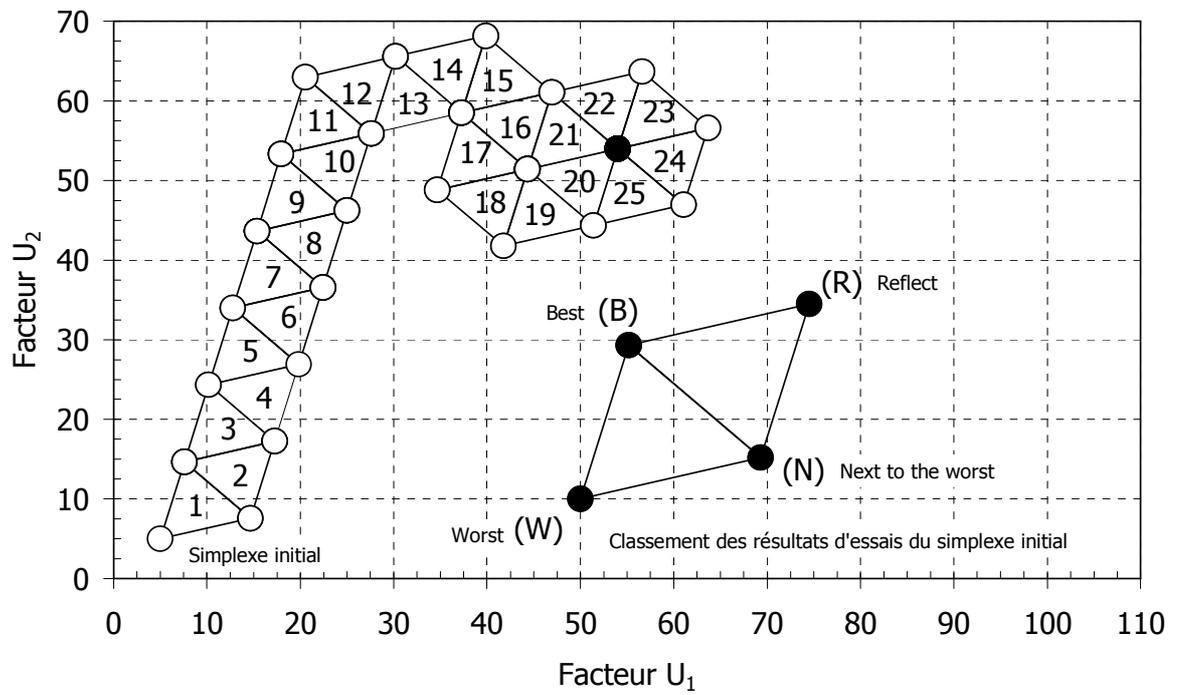


Figure 22 : Représentation de la recherche d'un optimum par la méthode du simplexe, d'après Louvet 2005.

L'approche consistant à produire directement les AXOS à partir d'AX, à l'issue d'un traitement d'hydrolyse unique, soit enzymatique soit chimique, conduit à des résultats non satisfaisants tant au niveau qualitatif que quantitatif. Ce constat nous a amené à envisager la combinaison de ces deux modes d'hydrolyse pour produire les oligosaccharides d'intérêt. Les deux processus d'hydrolyse ne peuvent être conduits que successivement, compte tenu de la dénaturation des biocatalyseurs dans les conditions requises pour le traitement chimique acide. L'ordre dans lequel doivent se succéder les deux étapes d'hydrolyse découle logiquement de l'étude présentée au chapitre précédent. Un premier traitement de nature chimique doit engendrer très majoritairement des oligomères qui constitueront les futurs substrats des glycosidases mises en œuvre au cours du second traitement et ceci sans apparition concomitante d'une trop forte proportion de monomère.

L'optimisation de ce double processus de transformation des AX en AXOS implique la prise en considération d'un nombre considérable de paramètres pouvant influencer la qualité des résultats. Dès lors, plusieurs démarches rationnelles conduisant à cette optimisation sont accessibles :

- Les méthodes directes : convergence séquentielle vers un optimum local, utilisant la méthode du simplexe. C'est une méthode de progression géométrique basée sur un classement des résultats d'essais (SPENDLEY W. 1962, NELDER J.A. 1965). Elle représente une approche simple, modulable et évolutive mais relativement longue, nécessitant beaucoup d'essais, et ceci d'autant plus que le point de départ se situe loin de l'optimum (cf. **figure 22** ci-contre).
- Les méthodes indirectes qui consistent à postuler *a priori* un modèle pour explorer un domaine expérimental. Dans ce cas, la taille du domaine, le nombre de paramètres étudiés ainsi que le type de modèle choisi permettent d'estimer avec une incertitude minimale les coefficients propres à ce modèle ainsi que les réponses qui en découlent, une réponse étant une grandeur mesurable qui permet d'apprécier l'évolution du processus. L'interpolation, à partir du modèle obtenu, nous renseigne sur les choix possibles des réglages des différents paramètres pour atteindre l'optimum de fonctionnement visé. La démarche qui consiste à réaliser plusieurs essais successifs dans des conditions prédéterminées pour la construction d'un tel modèle, relève de la méthodologie des plans d'expériences.

Cette dernière approche nous a semblé être la mieux adaptée à notre problématique d'optimisation du fait du nombre restreint d'essais à réaliser, tout en garantissant une incertitude minimale sur les réponses prédites. Cette approche a été menée en utilisant l'arabinoxylane de maïs commercial.

I Définitions et approche théorique

Dans un domaine expérimental défini, on attend d'une campagne d'essais qu'elle donne accès à des valeurs de réglage pour les différents paramètres choisis permettant d'atteindre un optimum de fonctionnement du processus étudié. Ces valeurs particulières, ou niveaux, peuvent être déterminés grâce à la construction puis à l'analyse d'un modèle. Dans cette approche les modèles choisis sont essentiellement des modèles polynomiaux du second degré. Leurs coefficients sont estimés à l'aide de la méthode des moindres carrés appliquée à l'analyse de la variation des résultats d'essais (MYERS R.H. 1995).

La construction d'un plan d'expériences nécessite la définition de 4 éléments :

- les objectifs de l'étude (optimisation d'un processus ou étude de l'effet des facteurs)
- la nature du domaine expérimental,
- la nature du modèle (additif ou polynomial),
- la méthode d'analyse des résultats (simple comparaison de moyennes arithmétiques ou méthodes des moindres carrés).

Le domaine expérimental est défini par l'amplitude de variation de chacun des paramètres, dénommés facteurs, qui interviennent dans le phénomène étudié. Lorsque ce domaine est défini, par sa nature et sa taille, il est raisonnable de penser qu'en son sein, la variation des réponses est continue et à dérivée continue. Or d'un point de vue mathématique, il est toujours possible d'adopter au voisinage d'un point (le centre du domaine) un développement limité qui s'exprime sous la forme d'un polynôme. De manière générale, un problème d'optimisation nécessite un polynôme de degré au moins égal à deux ; en revanche, l'utilisation d'un polynôme de degré plus élevé engendre, par nature, un nombre plus important de coefficients p (cf. équation E 1) à estimer

et donc entraîne la multiplication des essais à réaliser. De ce fait, il est communément admis qu'un polynôme du second degré est un bon compromis pour une première modélisation.

$$E 1) \quad p = \frac{(k + d)!}{k!d!}$$

k étant le nombre de facteur et d le degré du polynôme

Il est important de rappeler ici qu'un modèle est également un propagateur d'incertitudes. La disposition particulière des expériences au sein du domaine expérimental, permet de garantir une propagation minimale des incertitudes lors de l'utilisation du modèle polynomial d'interpolation.

Pour qu'un plan d'expériences, construit en N essais, soit optimal par rapport au phénomène étudié, il doit répondre à trois critères :

- L'incertitude sur les prévisions réalisées à partir du modèle doit être du même ordre de grandeur que les incertitudes expérimentales constatées sur les N essais réalisés. Ce critère, quantifié par l'efficacité-G (General variance), doit être maximal.
- Le nombre N d'essais doit être le plus proche possible de p, tout en respectant les exigences économiques, ce qui se traduit par une valeur de l'efficacité-R (redondance) qui doit être maximale.
- Dans toutes les directions et pour une distance donnée par rapport au centre du domaine, il faut que l'incertitude propagée par le modèle soit constante (isovariance par rotation).

Il n'est pas possible de satisfaire ces 3 critères simultanément. Or, d'un point de vue historique, plusieurs auteurs (BOX 1951, 1960, DOEHLERT 1970) ont proposé des solutions permettant différents compromis entre ces trois critères.

Le réseau uniforme de DOEHLERT (1970) constitue le meilleur compromis économique pour la définition des essais à réaliser, cet ensemble étant appelé matrice d'expériences. Ce type de réseau permet la construction d'un modèle correspondant aux critères énoncés précédemment, notamment l'isovariance par rotation, avec un nombre limité d'essais défini par la relation :

$$E 2) \quad N = k^2 + k + 1 \text{ voir tableau 18}$$

Tableau 18 : Nombre de coefficients p et d'essais N , fixés par le réseau de Doehlert pour un modèle polynomial du second degré.

Nombre de facteurs k	Coefficients p à estimer	N essais à réaliser définis par Doehlert
1	3	3
2	6	7
3	10	13
4	15	21
5	21	31

On peut constater ici, que dans le cas d'un polynôme du second degré, à partir de deux facteurs, le nombre N d'essais à réaliser est strictement supérieur à p .

La construction de ce réseau, basée sur la méthode du simplexe, consiste à disposer uniformément les essais sur l'enveloppe du domaine expérimental : c'est un maillage régulier d'une hyper-sphère de rayon unitaire. Cette construction repose uniquement sur des critères géométriques. De ce fait, ce type de réseau est relativement simple à construire, il peut être translaté dans l'espace expérimental sans perte de ses propriétés, tout en conservant la majeure partie des premières expériences réalisées. Dans un domaine expérimental, défini par deux facteurs, il peut être représenté comme ci-dessous :

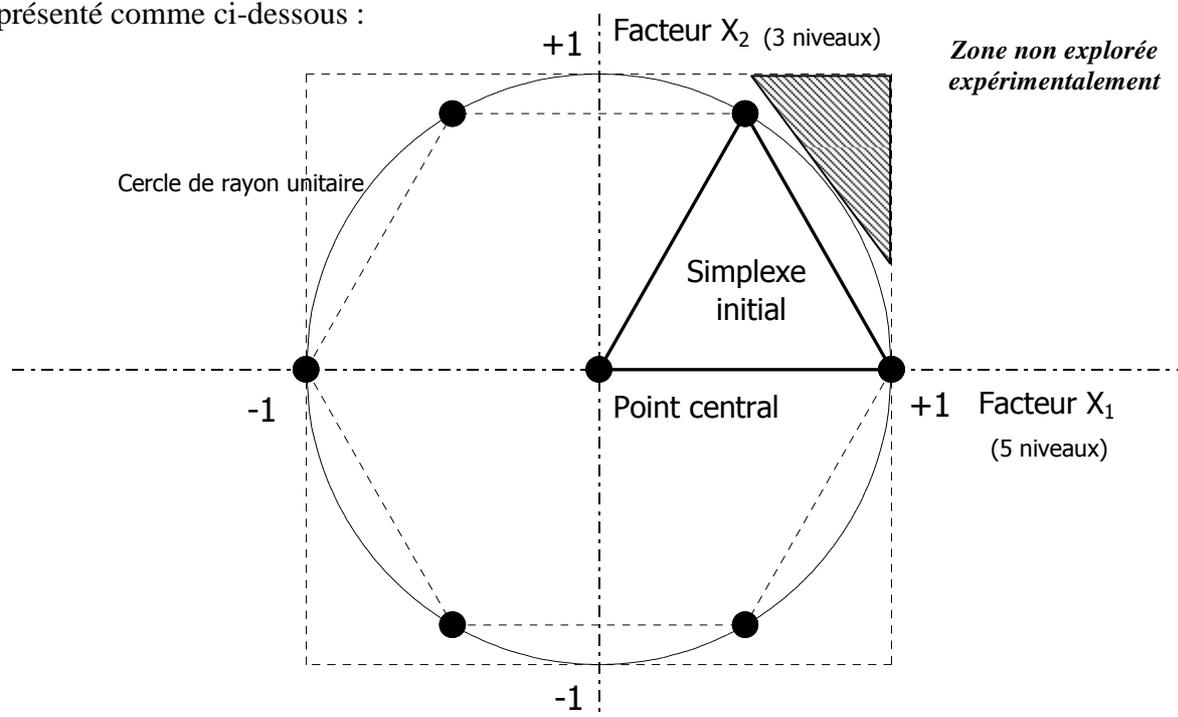


Figure 23 : Représentation schématique des essais à réaliser et définis par le réseau de Doehlert avec 2 facteurs.

Ses inconvénients majeurs sont d'une part liés au fait qu'il ne couvre pas les extrémités du domaine expérimental. Le cercle est inscrit dans un carré ce qui entraîne, d'une part, une incertitude sur les réponses prévues plus grande pour les combinaisons des niveaux estimés des facteurs aux frontières du domaine et d'autre part, un nombre différent de niveaux pour les facteurs, ce qui n'est pas toujours possible en fonction de la précision de leur réglage.

II Application à l'optimisation de l'hydrolyse chimique : processus n°1

Pour réaliser cette étude, nous avons construit un plan d'expériences, en utilisant un réseau uniforme de Doehlert à trois facteurs ($k = 3$) pour répartir les essais dans le domaine. D'après l'équation *E 2*, un tel réseau impose un nombre N d'essais à réaliser égale à 13.

Le type de modèle choisi est un polynôme du second degré ($d=2$) de la forme :

$$\begin{aligned} \eta = & \alpha_0 + \alpha_1 x_1 + \alpha_2 x_2 + \alpha_3 x_3 \\ \text{E 3) } & + \alpha_{1-1} x_1^2 + \alpha_{2-2} x_2^2 + \alpha_{3-3} x_3^2 \\ & + \alpha_{1-2} x_1 x_2 + \alpha_{1-3} x_1 x_3 + \alpha_{2-3} x_2 x_3 \end{aligned}$$

Dans notre cas, nous avons trois facteurs, le nombre p de coefficients à estimer est donc égal à 10 (cf. *E 1* et *E3*). La condition nécessaire $N \geq p$ est bien respectée.

II 1 Définition du domaine :

La nature de l'acide étant fixée (TFA, cf. Chapitre II, § II 2 1), l'hydrolyse chimique peut être pilotée par plusieurs facteurs telles que la concentration en acide, la température et la durée de l'hydrolyse. Tous ces facteurs sont quantitatifs, indépendants les uns des autres et à variation continue. Le domaine expérimental est défini en limitant l'amplitude de variation de chacun d'eux.

Le **tableau 19** indique les amplitudes de variation que nous avons choisies, en se basant sur les expériences décrites au chapitre précédent.

Les valeurs supérieures des bornes du domaine expérimental sont choisies afin de concilier une durée et une température de traitement non excessives, afin de garantir l'intégrité des produits engendrés. On remarque ici que les inconvénients liés à l'utilisation du réseau de Doehlert ne sont pas limitants : les extrémités du domaine ne sont pas des zones que nous chercherons à explorer pour les raisons cités ci-dessus. De plus, chacun des facteurs peut être ajusté précisément sur la plage de variation établie.

Pour des raisons d'homogénéité d'unité et de standardisation, on utilise une transformation mathématique bijective pour définir les niveaux de ces facteurs dans un espace mathématique borné (entre -1 et 1) et adimensionnel. Cette transformation est indiquée dans le **tableau 19** ci-dessous, pour chaque facteur.

Tableau 19 : Définitions des facteurs, de l'étendue de leur domaine de variation et de la transformation bijective utilisée.

Facteur	Notation	Domaine de variation	Transformation bijective
Concentration en TFA (mol.L ⁻¹)	U ₁	0,1 à 1	$x_1 = \frac{U_1 - 0,55}{0,45}$
Durée d'hydrolyse (h)	U ₂	1 à 10	$x_2 = \frac{U_2 - 5,5}{4,5}$
Température (°C)	U ₃	40 à 80	$x_3 = \frac{U_3 - 60}{20}$

De cette manière, tous les facteurs étant ainsi transformés, le domaine expérimental peut être représenté sous la forme d'un cube dans lequel va s'inscrire une sphère, **figure 24**.

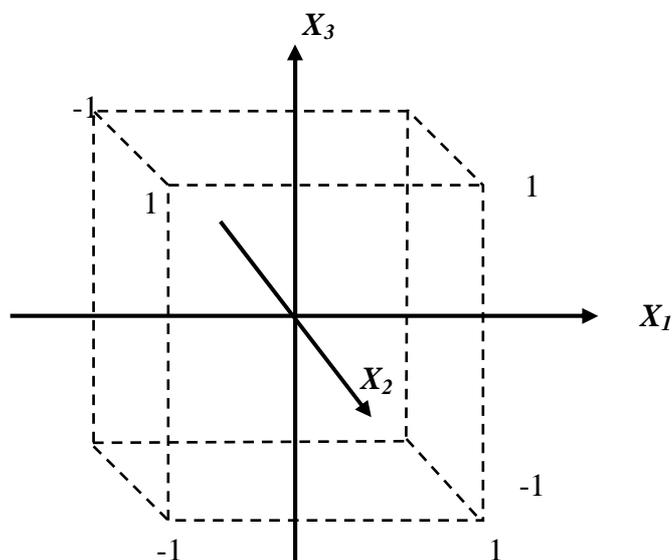


Figure 24 : Représentation schématique du domaine expérimental.

II-2 Matrice d'expériences

Dans un tel domaine, le réseau uniforme de Doehlert, précédemment défini, répartit les essais de la manière suivante, **tableau 20a**, ce qui correspond aux essais à réaliser dans les conditions reprises dans le **tableau 20b**. La figure suivante est la représentation graphique de cette disposition particulière des essais.

Les treize essais définis dans le **tableau 20b** ont été réalisés. Afin de rechercher les conditions optimales du processus n°1 d'hydrolyse chimique, nous avons défini 3 réponses sur la base de l'exploitation des profils HPSEC, avec détection DDL, obtenus pour chacun de ces essais.

Tableau 20 : a) Matrice d'expériences d'après le réseau uniforme de Doehlert à trois facteurs dans l'espace mathématique.

b) : Valeurs réelles des conditions opératoires après transformation bijective.

a)				b)		
Essai	X_1	X_2	X_3	Conc	Durée	Temp
1	1,00	0,00	0,00	1,00	6,00	60
2	-1,00	0,00	0,00	0,10	6,00	60
3	0,50	0,86	0,00	0,77	10,33	60
4	-0,50	-0,86	0,00	0,32	1,67	60
5	0,50	-0,86	0,00	0,77	1,67	60
6	-0,50	0,86	0,00	0,32	10,33	60
7	0,50	0,28	0,82	0,77	7,44	80
8	-0,50	-0,28	-0,81	0,32	4,56	40
9	0,50	-0,28	-0,81	0,77	4,56	40
10	0,00	0,57	-0,81	0,55	8,88	40
11	-0,50	0,28	0,81	0,32	7,44	80
12	0,00	-0,57	0,81	0,55	3,11	80
13	0,00	0,00	0,00	0,55	6,00	60

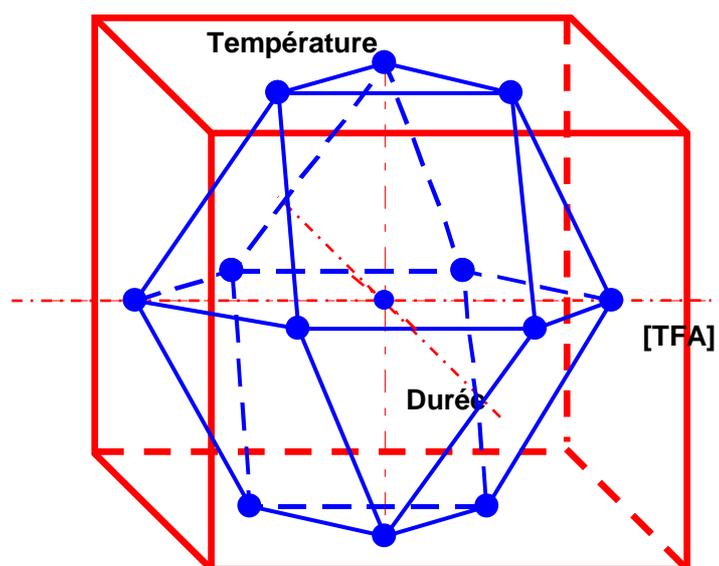


Figure 25 : Représentation graphique du domaine expérimental et positionnement des essais définis par le réseau uniforme de Doehlert.

Le **tableau 21** suivant indique les définitions, notations, et objectifs pour chacune des réponses

Tableau 21 : Définition des réponses et des objectifs visés pour chacune.

Réponses	Notation	Définition	Objectif
Teneur en polymères résiduels	Y_1	Rapport de la surface de pic, entre 9,5min et 11min, et l'aire totale du chromatogramme, en %	Minimiser
Teneur en monomères libérés	Y_2	Rapport de la surface du pic entre 19,5min et 21min, en %.	Minimiser
Taille de oligosaccharides	Y_3	Estimation à partir du temps de rétention au barycentre du massif correspondant à l'élution de la fraction oligomérique, en minutes.	Cibler

Les résultats obtenus pour les 13 essais de la matrice d'expériences sont repris dans le **tableau22** :

Tableau 22 : Evolution des réponses pour chacun des essais de la matrice d'expériences issue de l'utilisation du réseau de Doehlert.

Essai	Y_1 (%)	Y_2 (%)	Y_3 (min)
1	0,07	50,79	15,88
2	7,61	11,40	12,40
3	0,01	55,51	16,64
4	20,51	6,20	11,90
5	4,08	16,19	12,63
6	0,09	44,81	15,32
7	0,00	97,69	18,16
8	19,59	7,51	11,91
9	3,88	17,39	12,58
10	1,41	24,12	13,07
11	0,00	80,09	17,99
12	0,00	71,19	17,84
13	0,01	38,08	15,03

II 3 Analyse des résultats

II 3 1 Analyse globale

L'analyse directe des résultats est toujours difficile lorsque le nombre de réponses choisies est important. On est alors confronté au problème de comparaison multidimensionnelle. Afin de faciliter cette analyse, il est nécessaire de transformer les résultats bruts pour les exprimer dans une unité commune. Pour ce faire, nous avons utilisé des fonctions de désirabilité. Dans un premier temps, il faut exprimer un indice de satisfaction d (compris entre 0 et 1) pour chacune des valeurs des réponses obtenues et dans un deuxième temps, il faut fusionner, par un calcul de moyenne géométrique, pour chaque essai, les indices d_1 , d_2 et d_3 , relatifs aux trois réponses, ce qui permet de définir un indice de satisfaction global d_g de l'essai. La comparaison des résultats du plan d'expériences, sur la seule base des indices globaux ainsi calculés devient alors plus aisée.

Le calcul de l'indice de satisfaction peut être réalisé de deux manières : soit à l'aide de fonctions à dérivé continue (HARRINGTON, 1965), soit l'aide de fonction à dérivée discontinue (DERRINGER, 1980). Ces deux types de fonctions sont représentés **figure 21** ci-dessous :

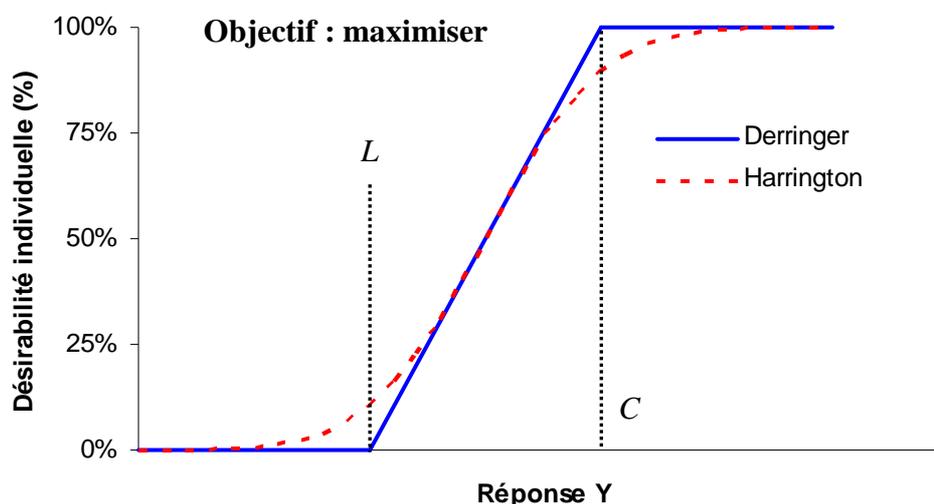


Figure 26 : Représentation graphique générale d'une fonction de désirabilité continue (pointillé rouge) ou discontinue (trait plein bleu), en fonction de la valeur d'une réponse Y, lorsque celle-ci doit être maximisée.

Sur cette figure, plusieurs valeurs particulières de la réponse Y sont indiquées par :

L (lower) : limite basse de la réponse fixée par l'utilisateur,

C : cible fixée correspondant à la valeur optimale de la réponse,

Une troisième limite U (upper), correspondant à la limite haute acceptée pour la réponse (U>C), apparaît lorsque l'on souhaite minimiser une réponse.

Nous avons retenu la méthode à dérivée discontinue pour sa simplicité de mise en œuvre. Dans ce cas, l'indice de satisfaction d peut s'exprimer de la manière suivante en fonction des objectifs de l'étude :

Tableau 23 : Evolution de l'indice de satisfaction individuel en fonction de la réponse Y associée.

Objectif	$Y \leq L$	$L \leq Y \leq C$	$C \leq Y \leq U$	$U \leq Y$
Minimiser	$d = 1$	$d = 1$	$d = \frac{U - Y}{U - C}$	$d = 0$
Maximiser	$d = 0$	$d = \frac{Y - L}{C - L}$	$d = 1$	$d = 1$
Cibler	$d = 0$	$d = \frac{Y - L}{C - L}$	$d = \frac{U - Y}{U - C}$	$d = 0$

Lorsque les fonctions de désirabilités individuelles d_1 , d_2 et d_3 sont calculées, il est possible de les fusionner en une désirabilité globale d_g par la relation :

$$E 4) \quad d_g = \left(d_1^{w_1} \times d_2^{w_2} \times d_3^{w_3} \right)^{\frac{1}{w_1 + w_2 + w_3}}$$

où w_1 , w_2 , w_3 sont les poids respectifs affectés aux réponses Y_1 , Y_2 et Y_3 , représentant l'importance accordée à chacune d'elles par l'expérimentateur.

Appliqué à notre problématique, le choix des limites basses (L_3), hautes (U_1 , U_2 et U_3) et des cibles (C_1 , C_2 ou C_3) pour définir les désirabilités individuelles relatives aux réponses Y_1 , Y_2 et Y_3 est fonction de l'objectif que l'on souhaite atteindre : la teneur résiduelle en polymères (Y_1) doit être minimale, la libération de monomères (Y_2) doit être la plus faible possible et les temps de

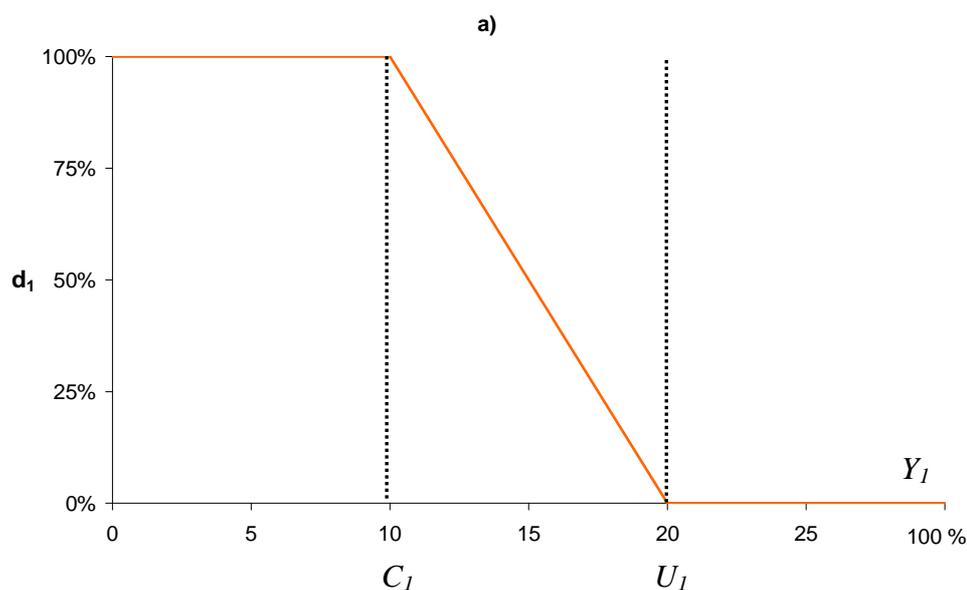
répartition au barycentre de la fraction oligomérique résultante (Y_3) doit être relativement élevée afin de répondre à la nécessité d'atteindre de faibles degrés de polymérisation.

Le respect de ces conditions nous a conduit à définir les bornes et les fonctions d_1 , d_2 et d_3 suivantes, indiquées **tableau 24** :

Tableau 24 : Evolution des fonctions de désirabilités individuelles pour chacune des réponses Y_1 , Y_2 et Y_3 .

Réponse	Objectif	$Y \leq L$	$L \leq Y \leq C$	$C \leq Y \leq U$	$U \leq Y$
Y_1	Minimiser		$C_1 = 10\%$		$U_1 = 20\%$
		$d_1 = 1$	$d_1 = 1$	$d_1 = \frac{20 - Y_1}{10}$	$d_1 = 0$
Y_2	Minimiser		$C_2 = 20\%$		$U_2 = 40\%$
		$d_2 = 1$	$d_2 = 1$	$d_2 = \frac{40 - Y_2}{20}$	$d_2 = 0$
Y_3	Cibler	$L_3 = 15$ min	$C_3 = 16,5$ min		$U_3 = 18$ min
		$d_3 = 0$	$d_3 = \frac{Y_3 - 15}{1,5}$	$d_3 = \frac{18 - Y_3}{1,5}$	$d_3 = 0$

Les représentations graphiques de ces fonctions sont indiquées **figure 27 a, b et c** ci-dessous pour d_1 , d_2 et d_3 :



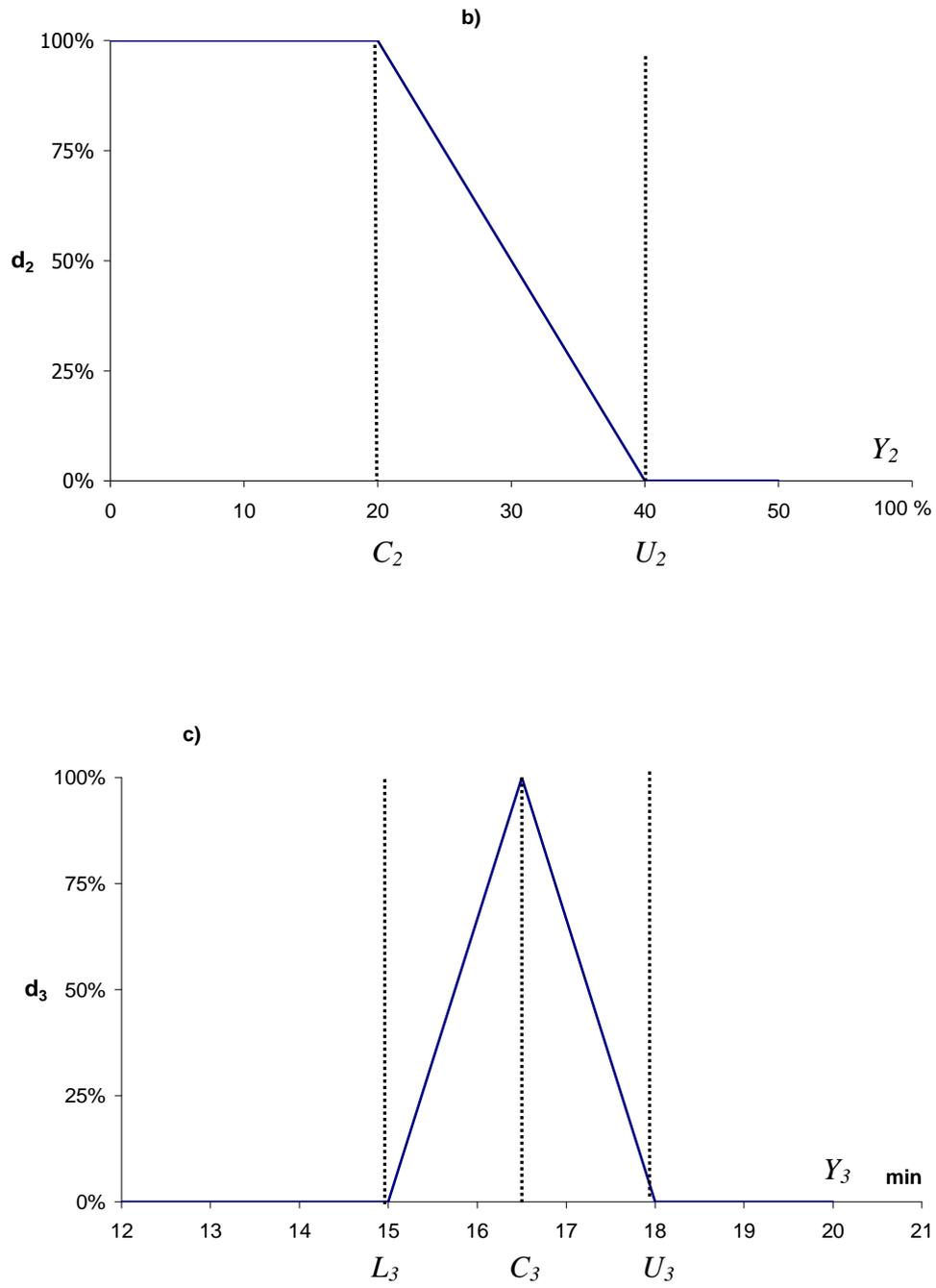


Figure 27 : Représentation graphique des fonctions :
a) Désirabilité d_1 associée à Y_1 ; b) Désirabilité d_2 associée à Y_2 ;
c) Désirabilité d_3 associée à Y_3 .

Les désirabilités de chacune des trois réponses étant définies, il devient possible de déduire une désirabilité globale, d_g , pour chaque essai du plan d'expériences, **tableau 25**. Pour cela, nous avons employé l'équation **E4**, dans laquelle nous avons accordé un poids identique aux réponses Y_1 et Y_2 ($w_1 = w_2 = 1$), mais un poids beaucoup plus important à Y_3 ($w_3 = 5$). En effet, les glycosidases utilisées dans la deuxième phase d'hydrolyse sont, comme nous l'avons montré au chapitre précédent, peu actives sur des substrats de tailles moléculaires trop importantes. Il est donc indispensable que le degré de polymérisation des produits issus de l'hydrolyse chimique, traduits par le temps de rétention au barycentre du massif de la fraction oligomérique, soit bien adaptée au traitement enzymatique ultérieur.

L'équation **E 4** s'écrit dans notre cas :

$$E 4) \quad d_g = (d_1 \times d_2 \times d_3^5)^{\frac{1}{7}}$$

Les résultats, présentés au **tableau 25**, sont convertis en désirabilités individuelles, puis en désirabilités globales pour chaque essai :

Tableau 25 : Calcul des désirabilités pour chacune des réponses du plan d'expériences et expression de la désirabilité globale pour chaque essai.

	d_1	d_2	d_3	d_g
1	100,0 %	0,0 %	58,7 %	0,0 %
2	100,0 %	100,0 %	0,0 %	0,0 %
3	100,0 %	0,0 %	90,7 %	0,0 %
4	0,0 %	100,0 %	0,0 %	0,0 %
5	100,0 %	100,0 %	0,0 %	0,0 %
6	100,0 %	0,0 %	21,3 %	0,0 %
7	100,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
8	4,1 %	100,0 %	0,0 %	0,0 %
9	100,0 %	100,0 %	0,0 %	0,0 %
10	100,0 %	79,4 %	0,0 %	0,0 %
11	100,0 %	0,0 %	0,7 %	0,0 %
12	100,0 %	0,0 %	10,7 %	0,0 %
13	100,0 %	9,6 %	2,0 %	4,4 %

L'examen du **tableau 25** conduit à deux constats :

- Un seul essai de la matrice d'expérience (essai n° 13 : le centre du domaine, notre point d'origine) présente une désirabilité non nulle. On peut conclure, à partir de ce constat, que l'ensemble des conditions d'hydrolyse utilisées pour réaliser les 13 essais est éloigné de l'optimum, si celui-ci existe.
- Le nombre élevé de désirabilités globales nulles est principalement lié aux réponses Y_2 et Y_3 , souvent nulle (6 sur 13 pour Y_2 et 7 sur 13 pour Y_3). De plus, ces réponses semblent avoir un comportement antagoniste : dans 8 essais sur 13, on observe qu'une des deux réponses a une désirabilité supérieure à 60% alors que celle de l'autre est nulle.

Il est clair qu'aucun des essais réalisés (cf. tableau 25) ne permet de concilier, au cours de l'hydrolyse chimique, un faible taux de monomères libérés avec un faible degré de polymérisation de la fraction oligosaccharidique, futurs substrats des enzymes au cours de la deuxième phase hydrolytique.

Cependant la construction d'un modèle mathématique sur la base de ces essais nous permettra, par l'exploration numérique du domaine, de vérifier si un point particulier peut satisfaire cette exigence.

II 3 2 Analyse mathématique : Construction d'un modèle

Comme nous l'avons présenté en introduction de ce chapitre, les résultats des essais réalisés permettent, en utilisant la méthode des moindres carrés ordinaires (sous forme matricielle), d'estimer les p coefficients α_i d'un polynôme du second degré, qui autorise la modélisation du processus. Grâce au modèle ainsi construit, il est possible d'explorer numériquement l'ensemble du domaine de variation des facteurs afin de prévoir les trois réponses Y_1 , Y_2 et Y_3 en tous points et donc d'en déduire les désirabilités globales en utilisant les fonctions définies précédemment. Ceci a été réalisé à l'aide d'un tableur informatique (*annexe 3* tableau des coefficients).

Avant d'utiliser le modèle obtenu pour la recherche d'un optimum de fonctionnement du processus n°1, il est important de vérifier ses qualités descriptives et prédictives. Parmi les outils statistiques disponibles, nous avons utilisé deux indicateurs. La qualité descriptive est quantifiée par le coefficient de détermination ajusté : R_{aj}^2 . Celui-ci tend vers 100% lorsque le modèle est

parfaitement descriptif. La qualité prédictive, quant à elle, peut être estimée par le coefficient Q^2 , dont une valeur proche de 100% correspond à des prédictions idéales. Le **tableau 26** présente les résultats.

Tableau 26 : Quantification des qualités descriptive et prédictive du modèle pour chacune des réponses.

Qualité	Indicateur	Y ₁	Y ₂	Y ₃
Descriptive	R^2_{aj}	87,6 %	96,7 %	83,1 %
Prédictive	Q^2	49,8 %	86,7 %	31,9 %

L'analyse de ces résultats nous conduit à conclure sur une bonne qualité descriptive du modèle et une qualité prédictive plus faible mais suffisante pour réaliser l'interpolation. Une analyse graphique des valeurs des réponses calculées en fonction des valeurs mesurées expérimentalement, est une bonne confirmation du caractère descriptif.

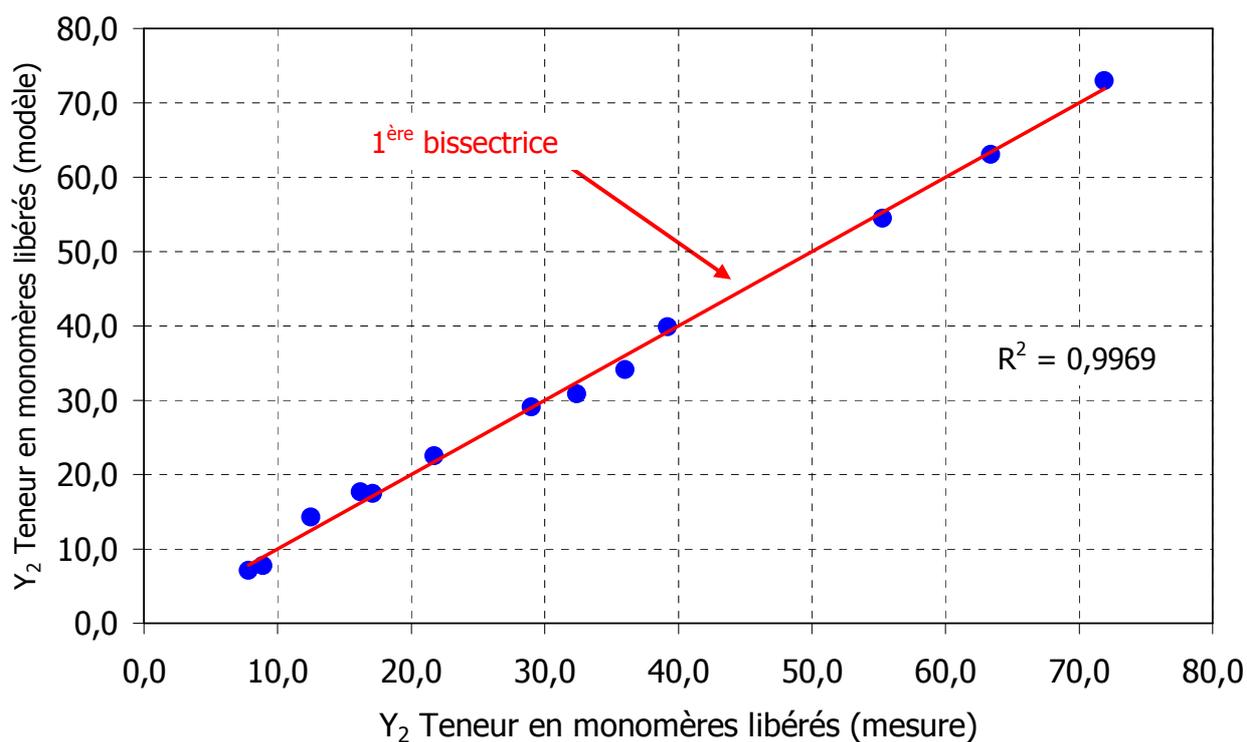


Figure 28 : Adéquation entre les valeurs de la réponse Y₂ calculées par le modèle et mesurées expérimentalement.

La première bissectrice représente l'adéquation parfaite entre les réponses calculées et mesurées. Nous pouvons constater que les points, dont les coordonnées sont fournies par le modèle construit et les résultats des essais, s'alignent sur cette droite. L'adéquation du modèle pour la réponse Y_2 est bonne. Cette même observation peut être faite pour les réponses Y_1 et Y_3 (*annexe 4*).

II 4 Utilisation du modèle pour l'optimisation du processus n°1

Le modèle construit ayant de bonnes qualités descriptive et prédictive, il est possible de l'utiliser pour la recherche d'un optimum dans le domaine expérimental défini précédemment. Cette recherche est basée sur un calcul itératif (réalisé par un logiciel ou un tableur classique), qui compare les désirabilités globales d'essais simulés numériquement. Au cours de chacun de ces essais, les 3 réponses Y sont calculées puis transformées en indice de satisfaction individuel d qui sont ensuite fusionnés pour exprimer la désirabilité globale d_g . Le programme fait varier les valeurs des facteurs x_1 , x_2 et x_3 jusqu'à atteindre une valeur de d_g maximale.

Grâce à cette méthode, nous avons identifié une zone dans le domaine expérimental, où la désirabilité globale est significativement supérieure à la valeur maximale obtenue au cours du plan d'expériences précédent (Tableau 21, essai 13). Pour les réglages des facteurs de ce point de fonctionnement, les réponses prévues et les désirabilités correspondantes sont présentées dans le **tableau 27** :

Tableau 27 : Conditions optimales prévues, réponses et désirabilités calculées par le modèle.

	Conditions			Réponses prévues			Désirabilités prédites (%)			
	TFA (M)	Durée (h)	Temp (°C)	Y1 (%)	Y2 (%)	Y3 (min)	d1	d2	d3	d_g
Optimum	0,16	2,03	80	12,9	38,7	15,36	71,1	6,5	23,8	23,1

Les conditions optimales fournies par le modèle sont assez inattendues et nous ne serions pas allé intuitivement explorer cette zone du domaine. En effet, les niveaux de réglages des trois facteurs sont situés dans une zone périphérique du domaine défini. De notre point de vue, ce résultat, s'il est validé expérimentalement, est un véritable apport de l'approche plan d'expériences ;

en effet la désirabilité globale prévue est dans ce cas 5,2 fois supérieure à la plus forte valeur observée à l'issue des essais.

II 5 Validation expérimentale du modèle

Nous avons réalisé un essai d'hydrolyse, en respectant les conditions proposées par le modèle, afin de vérifier sa validité. Les résultats expérimentaux, reportés dans le **tableau 28**, ont été transformés en indice de désirabilité globale comme précédemment :

Tableau 28 : Réponses mesurées et désirabilités calculées de l'essai réalisé dans les conditions expérimentales optimales fournies par le modèle.

	Réponses mesurées			Désirabilités calculées (%)			
	Y1 (%)	Y2 (%)	Y3 (min)	d1	d2	d3	dg
Optimum	0,1	55,6	16,71	100	0	86,0	0

Nous pouvons constater que la d_g est nulle ; en conséquence sur ce seul critère le modèle mathématique ne peut être validé.

Toutefois, si l'on considère individuellement les désirabilités, on constate que d_1 et d_3 sont très satisfaisantes et même supérieures aux valeurs prévues par le modèle (cf. tableau 27). En revanche, d_2 est toujours nulle, ce qui justifie une d_g nulle. Le fait que d_2 soit égale à 0 est attribuable au choix de la valeur de la limite supérieure ($U_2 = 40\%$) de cette fonction de désirabilité.

Afin d'exploiter pleinement les apports du plan d'expériences, à ce niveau de l'optimisation, il est nécessaire de trouver un compromis permettant de concilier des valeurs élevées pour chacune des trois fonctions de désirabilités. L'analyse de l'évolution des réponses Y_1 , Y_2 et Y_3 ainsi que leur désirabilités respectives d_1 , d_2 et d_3 révèle un fort antagonisme entre les fonctions d_2 et d_3 . La libération, non souhaitée, de monosaccharides, quantifié par Y_2 , est indissociable de la réduction en taille des oligosaccharides, mesurée par Y_3 . Compte tenu des poids relatifs accordés aux fonctions de désirabilité ($w_1 = 1$, $w_2 = 1$ et $w_3 = 5$), il semble pertinent de reconsidérer seulement la définition des limites de la fonction d_2 pour atteindre le compromis souhaité. Dans ces conditions, un accroissement de 40% à 60% de la limite supérieure U_2 , correspondant à une augmentation réelle de

12% de la concentration en monomère libérés, doit être envisagé. Les modifications de d_2 et donc de d_g , consécutives à l'accroissement de la valeur de U_2 , sont indiquées dans le **tableau 29** ci-dessous :

Tableau 29 : Evolution des désirabilités individuelles et globales avec la nouvelle définition de d_2 .

Essai	Réponses mesurées			Désirabilités calculées (%)			
	Y_1 (%)	Y_2 (%)	Y_3 (min)	d_1	d_2	d_3	d_g
1	0,07	50,79	15,88	100,0	23,0	58,7	55,4
2	7,61	11,40	12,40	100,0	100,0	0,0	0,0
3	0,01	55,51	16,64	100,0	11,2	90,7	68,2
4	20,51	6,20	11,90	0,0	100,0	0,0	0,0
5	4,08	16,19	12,63	100,0	100,0	0,0	0,0
6	0,09	44,81	15,32	100,0	38,0	21,3	28,9
7	0,00	97,69	18,16	100,0	0,0	0,0	0,0
8	19,59	7,51	11,91	4,1	100,0	0,0	0,0
9	3,88	17,39	12,58	100,0	100,0	0,0	0,0
10	1,41	24,12	13,07	100,0	89,7	0,0	0,0
11	0,00	80,09	17,99	100,0	0,0	0,7	0,0
12	0,00	71,19	17,84	100,0	0,0	10,7	0,0
13	0,01	38,08	15,03	100,0	54,8	2,0	5,6
Optimum	0,1	55,6	16,71	100,0	10,9	86,0	65,4

Parmi les treize essais réalisés au cours du plan d'expériences, quatre d'entre eux conduisent à une désirabilité globale non nulle. Les conditions expérimentales issues du modèle permettent d'obtenir une d_g de 65,4 %, parfaitement comparable à la valeur maximale de 68,2 %, mesurée expérimentalement pour l'essai 3 du plan. Cependant, les réglages des niveaux des facteurs concentration en TFA, durée et température, conduisant à ces deux valeurs optimales de d_g sont très différentes.

Tableau 30 : Comparaison des conditions expérimentales conduisant aux valeurs optimales de d_g .

Conditions expérimentales			
	[TFA] (M)	Durée (h)	Temp (°C)
<i>Essai 3</i>	<i>0,77</i>	<i>10,33</i>	<i>60</i>
Optimum	0,16	2,03	80

Il est toutefois possible de choisir objectivement entre ces deux optima de fonctionnement en prenant en considération les coûts associés. Avec une concentration en acide 5 fois plus faible, pour une durée 5 fois plus courte et avec une différence de 20°C seulement, les réglages proposés par le modèle présentent un réel intérêt économique par rapport à l'essai 3 du plan d'expériences.

L'optimum étant validé aux niveaux théorique et expérimental, nous avons testé sa robustesse, en effectuant une série d'essais dans le voisinage immédiat de ce point de fonctionnement.

II 6 Etude de robustesse

Afin de confirmer expérimentalement le résultat obtenu, nous avons étudié l'évolution des réponses au voisinage de l'optimum, en réduisant et centrant le domaine de variation de chacun des facteurs sur ses coordonnées.

Le voisinage ainsi défini peut être représenté de la manière suivante :

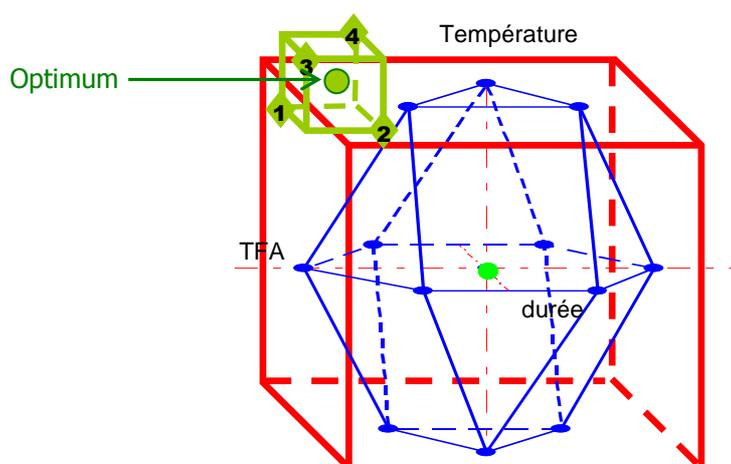


Figure 29 : Représentation du domaine expérimental proche de l'optimum pour l'étude de robustesse.

Comme précédemment, afin de minimiser les incertitudes, les essais doivent être répartis de façon homogène, suivant un plan factoriel fractionnaire. La disposition de 4 essais sur les sommets du cube, opposés 2 à 2 permet de garantir cette condition. Les résultats expérimentaux correspondants, traduits en désirabilité, sont indiqués dans le **tableau 31** ci-après :

Tableau 31 : Conditions et résultats obtenus pour les essais consacrés à l'étude de la robustesse du point de fonctionnement.

	Conditions			Réponses mesurées			Désirabilités calculées (%)			
	[TFA] mol.L ⁻¹	Durée h	Temp °C	Y1 (%)	Y2 (%)	Y3 (min)	d1	d2	d3	dg
1	0,10	1,5	75	0,23	28,03	14,23	100,0	80,0	0,0	0,0
2	0,20	1,5	85	0,04	54,03	17,28	100,0	14,9	48,1	45,1
3	0,10	2,5	85	0,06	54,16	17,07	100,0	14,6	62,0	54,0
4	0,20	2,5	75	0,08	49,83	16,06	100,0	25,4	70,7	64,2

Nous pouvons constater ici qu'aucun des quatre essais réalisés ne permet d'accroître la désirabilité globale mesurée précédemment pour l'optimum, tout en gardant des performances comparables.

En conclusion, les résultats sont du même ordre de grandeur autour de l'optimum et montrent un léger infléchissement, ce qui prouve que le point de fonctionnement choisi représente la meilleure solution et atteste de sa robustesse.

II 7 Bilan de l'optimisation du processus n°1 :

Initialement, l'hydrolyse acide au TFA permettait seulement d'obtenir, en très faible quantité, des oligosaccharides dont la taille et la structure n'étaient pas idéalement adaptées à la poursuite de l'étude. De plus cette hydrolyse engendrait une dégradation trop importante des polymères en monomères.

L'utilisation d'une méthodologie faisant appel à des approches mathématiques pour la modélisation d'un phénomène, nous a permis d'explorer rapidement le domaine expérimental et de

déterminer des conditions d'hydrolyse dont les valeurs n'étaient pas évidentes. De plus, ces conditions conduisent à un rendement très intéressant en oligosaccharides, de l'ordre de 50% pds/pds par rapport aux polymères, ce qui était primordial compte tenu des quantités de matière nécessaire pour la poursuite de l'étude et notamment les tests d'évaluation des propriétés biologiques. Enfin, les arabinoxylooligosaccharides obtenus avec les réglages fixés sont de tailles et de structures parfaitement adaptées au processus n°2 d'hydrolyse enzymatique.

III L'hydrolyse enzymatique : processus n°2

Les oligomères ainsi obtenus vont nous servir de nouveaux substrats pour l'hydrolyse enzymatique. Or dans cette étape, nous avons le choix entre plusieurs combinaisons de biocatalyseurs, à savoir des xylanases de différentes origines, pouvant être utilisées seules ou avec une arabinase (cf. Chapitre II, § II 2 2). L'emploi de plusieurs xylanases simultanément (ou en cascade) n'a pas été retenu, en raison du nombre trop important de combinaisons possibles.

La nature qualitative de ce facteur interdit, à elle seule, le recours à une approche similaire à celle appliquée à l'hydrolyse chimique. En effet, le domaine expérimental est discontinu, ce qui empêche l'utilisation d'un polynôme du second degré pour modéliser le processus. Toutefois, des modèles de type additif, peuvent être construits, en utilisant des principes mathématiques identiques à ceux utilisés précédemment. Dans ces conditions, plusieurs matrices d'expériences sont alors disponibles et conduisent, après expérimentation, à l'estimation des coefficients et des effets des facteurs.

III 1 Définition des objectifs, des réponses et du domaine expérimental

L'optimisation, proprement dite, n'étant pas envisageable, nous allons chercher à connaître l'effet de la variation de la nature de l'enzyme, de sa concentration et de la durée du traitement sur la production d'oligosaccharides et la libération de monosaccharides. Les réponses sont donc la

concentration en oligosaccharides, notée Y_1 et correspondant à la somme fractions **O1** et **O2** définies au chapitre précédent. Une deuxième réponse, notée Y_2 , est définie comme étant l'augmentation de la concentration en monomères, par rapport à la teneur initiale obtenu à l'issue du processus n°1. Les facteurs pris en compte sont au nombre de trois : la nature de la préparation enzymatique, sa concentration et la durée du traitement.

Le domaine expérimental est discontinu, il est à noter que dans ce type de plan d'expériences, même les facteurs quantitatifs sont exprimés de façon discontinue. Les bornes de leur domaine de variation respectif sont généralement choisies comme valeurs des niveaux, afin de pouvoir déterminer l'effet d'un changement sur les réponses. Les valeurs qualitatives que peuvent prendre chacun de ces facteurs sont appelées des modalités. Leur nombre est dans notre cas différent pour chacun des facteurs. En effet, comme nous l'avons présenté en introduction de ce paragraphe, nous avons le choix entre 3 xylanases d'origines différentes, et chacune d'elle peut être combinée avec l'arabinase, ce qui fait un total de 6 combinaisons. Nous avons choisi de faire varier seulement la concentration de la xylanase, entre 1% et 10% vol/vol et la concentration de l'arabinase, lorsqu'elle est employée, est fixée à 2,5% vol/vol. Ceci équivaut à un nombre d'unité allant de $0,1\text{UE.mL}^{-1}$ à 1UE.mL^{-1} pour les xylanases et à $0,25\text{UE.mL}^{-1}$ pour AM. La durée du traitement peut varier de 1h à 10h. En résumé, les modalités retenues pour cette partie de l'étude sont indiquées dans le **tableau 32**.

Tableau 32 : Nombre de modalités par facteurs.

	Nature des enzymes m1	Concentration m2	Durée m3
Nombres de modalités	6	2	3

Le choix de ce nombre de modalités est justifié par la limitation, volontaire de notre part, de la taille du domaine expérimental. Il peut donc être représenté par la juxtaposition de petits domaines expérimentaux, **figure 30**, en prenant en considération le nombre des modalités.

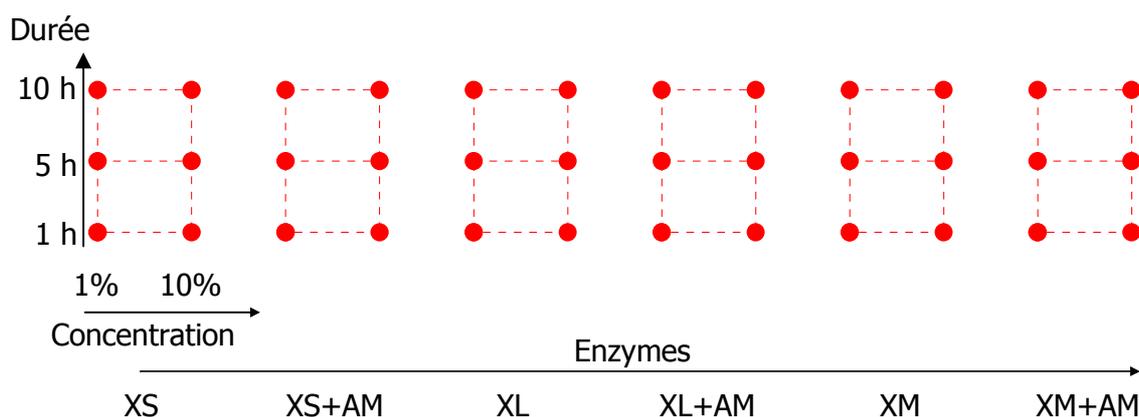


Figure 30 : Représentation du domaine expérimental discontinu relatif au processus n°2.

III 2 Choix du modèle

Pour le type de problématique auquel nous sommes confrontés, les modèles additifs sont les mieux adaptés. Ils peuvent être avec ou sans couplage, cela signifie qu'ils peuvent intégrer des interactions éventuelles entre les effets des facteurs.

Dans notre cas, les changements de modalités des facteurs sont indépendants. Nous avons logiquement opté pour le modèle additif sans couplage. La formule générale de ce type de modèle est la suivante :

$$E 5) \quad Y = c^{ste} + \sum_{i=1}^k W_i \quad \text{avec } W_i = \text{poids du facteur } i \text{ sur la réponse.}$$

La réponse est décrite par ce modèle comme étant la somme des poids de chacun des facteurs. Appliqué à notre processus :

$$E 5) \quad Y_1 = c^{ste} + W_1 + W_2 + W_3$$

Le nombre d'inconnues à estimer obéit ici à la relation suivante :

$$E 6) \quad p = 1 + \sum_{i=1}^k (m_i - 1) \quad \text{où } m_i \text{ est le nombre de modalité du facteur } i.$$

Soit : $p = 1 + (m_1 - 1) + (m_2 - 1) + (m_3 - 1) = 9$ inconnues à estimer.

Comme dans le premier processus, le nombre N d'essais à réaliser pour estimer ces coefficients doit être supérieur à p et sera au maximum de 36, nombre total des combinaisons distinctes dans le plan complet.

III 3 Matrice d'expériences

La nature du domaine, avec trois facteurs qui n'ont pas le même nombre de modalités rend impossible la construction d'un plan d'expériences classique. En effet il n'existe pas de solution dans ce cas pour construire une matrice orthogonale (qui fait intervenir un même nombre de fois chaque modalité pour tous les facteurs). Une matrice d'expériences optimale doit être construite dans ce cas afin d'équilibrer les essais de la manière la plus homogène possible, de sorte que chaque modalité d'un facteur intervienne un même nombre de fois.

Il peut être démontré qu'un nombre N de 12 essais permet de concilier une incertitude minimale sur l'estimation des effets avec un nombre restreint d'essais. La répartition de ces 12 essais au sein du domaine expérimental est obtenue par un algorithme d'échanges. Les combinaisons retenues pour la matrice d'expériences sont matérialisées ci-dessous, **figure 31** :

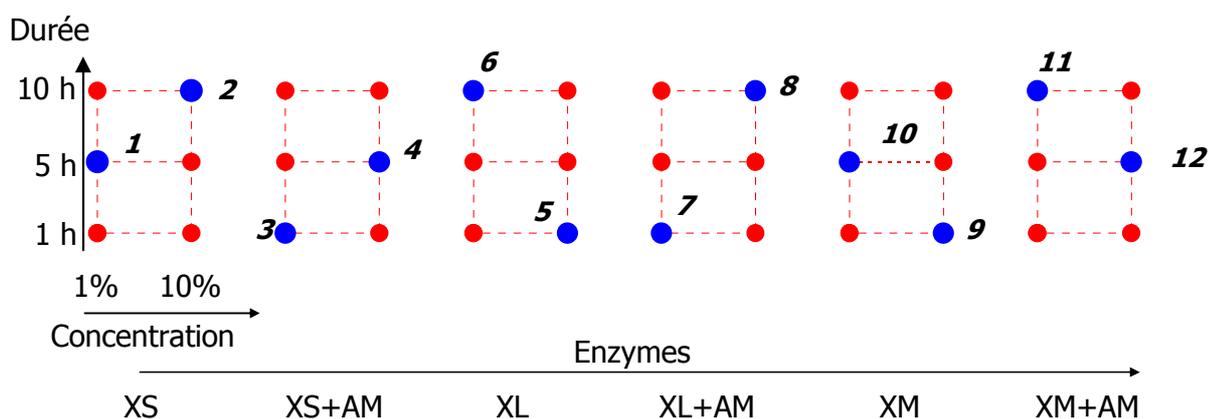


Figure 31 : Répartition des 12 essais à réaliser pour estimer les coefficients du modèle additif.

Il apparaît que cette matrice répartit uniformément les essais. On ne privilégie pas la mise en œuvre d'une modalité particulière pour chacun des facteurs :

- Pour la concentration : 6 essais à 1% (vol/vol) soit 0,1UE.mL⁻¹ et 6 essais à 10% (vol/vol) équivalent à 1UE.mL⁻¹,
- Pour la durée : 4 essais à 1h, 4 essais à 5h et 4 essais à 10h,
- Pour la nature de l'enzyme : 2 essais pour chacune des modalités choisies.

Cette matrice, traduite en plan d'expérimentation aboutit au **tableau 33** suivant :

Tableau 33 : Conditions expérimentales issues de la matrice d'expérience établie par l'algorithme d'échange pour le processus n°2.

Essai	Nature de l'enzyme	Concentration (%vol)	Durée (h)
1	XS	1	5
2	XS	10	10
3	XS+AM	1	1
4	XS+AM	10	5
5	XL	10	1
6	XL	1	3
7	XL+AM	1	1
8	XL+AM	10	10
9	XM	10	1
10	XM	1	5
11	XM+AM	10	5
12	XM+AM	1	10

Les essais ont été réalisés en respectant ces conditions opératoires.

III 4 Analyse des résultats

Nous avons mesuré la concentration en oligosaccharides Y_1 et en monomères dans le milieu par HPSEC avec détection DDL. Les résultats obtenus sont reportés dans le **tableau 34** :

L'analyse directe des résultats montre qu'en ce qui concerne la réponse Y_1 , l'amplitude de variation des valeurs obtenues n'est pas très importante, mais reste significative. Ceci montre que les facteurs ont un impacte faible sur cette réponse. En ce qui concerne la réponse Y_2 , l'étendue des

valeurs obtenues est plus importante, de 5% à 35%, ce qui traduit l'influence des facteurs sur la libération de monomères.

Tableau 34 : Résultats du plan d'expériences relatif au processus n°2.

Essai	Y1 (%)	Y2 (%)
1	36,23	10,89
2	33,97	24,42
3	34,40	5,83
4	38,77	7,17
5	35,91	13,72
6	38,44	18,74
7	36,35	9,87
8	39,31	7,56
9	37,41	28,37
10	34,54	23,11
11	35,00	35,59
12	35,78	10,62

L'analyse mathématique de ces résultats, comme dans l'étude précédente, passe par l'estimation des coefficients et des résidus du modèle. En effet, dans notre cas, il est impossible d'avoir un arrangement orthogonal, qui impliquerait un même nombre de modalités pour chacun des facteurs. Il n'est donc pas possible d'étudier l'effet des facteurs par une simple comparaison de moyennes. De ce fait, la construction du modèle additif est indispensable. Pour cela, les valeurs qualitatives des facteurs sont traduites en valeurs numériques par un système de codage, il s'agit du codage classiquement utilisé dans l'approche matricielle de l'analyse de la variance (LOUVET 2005). Les coefficients sont calculés et le caractère descriptif du modèle est estimé à l'aide des graphes d'adéquation, **figure 32**.

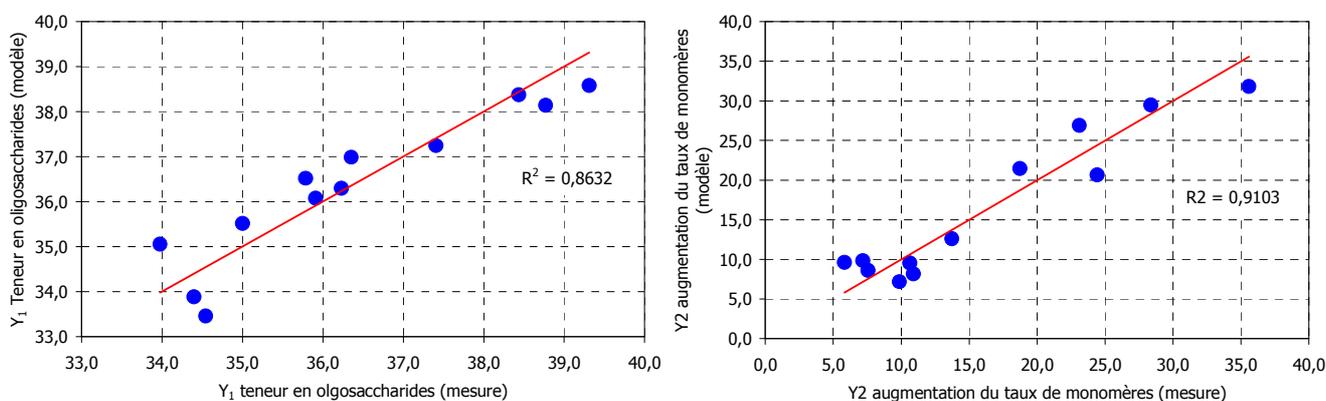


Figure 32 : Adéquation des deux réponses Y₁ et Y₂

Les représentations graphiques ainsi que les valeurs de l'indice R^2 , relatives à chacune des réponses, traduisent un caractère descriptif satisfaisant du modèle. Celui-ci peut être utilisé pour estimer l'effet des facteurs sur chacune des réponses.

L'information recherchée est, dans ce cas, fournie par une représentation graphique, **figure 33**. Les coordonnées des points représentés sur ces graphes sont obtenues à partir du modèle. On peut constater ici que la durée du traitement n'a que peu d'influence sur Y_1 , en effet les valeurs moyennes de cette réponse sont proches, quelle que soit la durée du traitement. Cependant, ce facteur a un effet positif sur Y_2 , le passage de 1h à 10 h entraîne une augmentation d'environ 15% de la teneur en monomères.

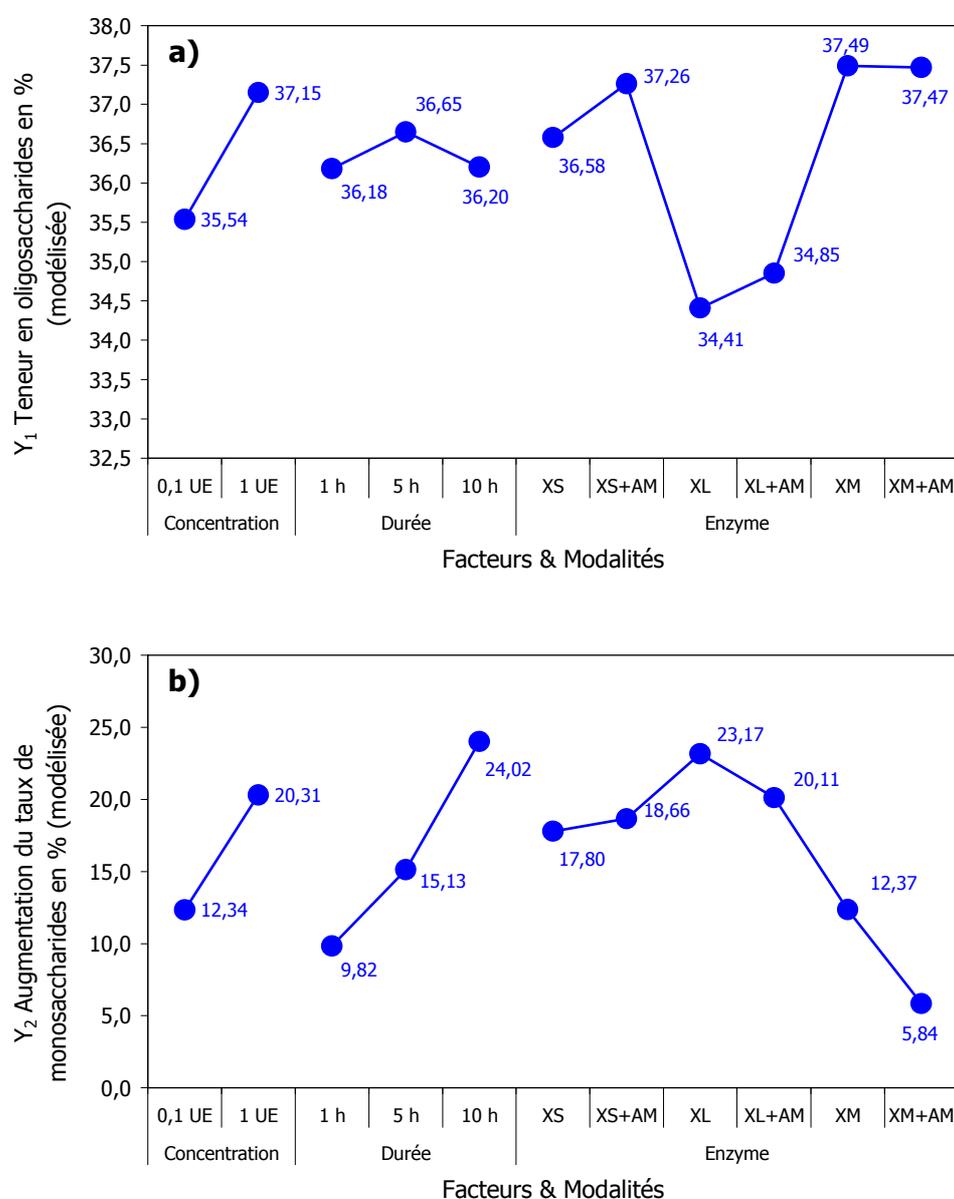


Figure 33 : Tracé de l'effet moyen des facteurs : a) sur la réponse Y₁, b) sur la réponse Y₂.

De même, une augmentation de la concentration a un effet positif sur les deux réponses, bien que plus important sur Y_2 que sur Y_1 : lorsque la concentration en xylanase passe de $0,1 \text{ UE.mL}^{-1}$ à 1 UE.mL^{-1} , les valeurs moyennes de Y_1 passent de 35,5% à 37,1% alors que dans le même temps, les valeurs moyennes de Y_2 passent de 12,3% à 20,3%. Enfin, la nature des enzymes influence fortement la variation des réponses. En effet, les valeurs moyennes calculées pour chaque modalité s'étendent sur une large plage de variation allant de 5,8% à 23,2% pour Y_2 et dans une moindre mesure pour Y_1 , allant de 34,4% à 37,5%.

Le tracé de l'effet moyen des facteurs est un outil d'aide à la prise de décision. Il nous permet, dans ce cas, de choisir les réglages de chacun des facteurs de façon à atteindre nos objectifs, à savoir : maximiser le rendement en arabinoxylooligosaccharides, ce qui correspond aux plus fortes valeurs de Y_1 , et limiter l'apparition de monosaccharides. Pour cela, on constate que l'emploi de la combinaison XM + AM, à une concentration de $0,1 \text{ UE.mL}^{-1}$ pour la xylanase et une durée d'hydrolyse de 1h, conduira au résultat souhaité.

IV Conclusion

La démarche d'optimisation mise en œuvre dans ce chapitre nous a permis de trouver des conditions extrêmement favorables à la production d'arabinoxylooligosaccharides de faible degré de polymérisation, à partir des arabinoxylyanes commerciaux ou extraits. Cette mise au point analytique effectuée avec un arabinoxylyane de maïs commercial, nous a conduit à la définition des conditions expérimentales suivantes :

- Pour le processus n°1 : une concentration de 0,16M en TFA, pour une durée de 2h et une température de 80°C permet d'aboutir à un hydrolysats contenant environ 50% d'oligosaccharides ayant une taille et une structure adaptée à l'hydrolyse enzymatique.
- Pour le processus n°2 : l'utilisation de la xylanase XM, combinée avec l'arabinase AM, à des concentrations respectives de $0,1 \text{ UE.mL}^{-1}$ et $0,25 \text{ UE.mL}^{-1}$ pour une durée de 1h conduit à la production d'un mélange contenant 45% d'AXOS ayant un DP compris entre 5 et 20, et 55% de monosaccharides.

Les conditions expérimentales ainsi fixées ont été utilisées, à une échelle préparative, avec les différents arabinoxylanes, extraits de blé, de seigle ou bien commercial pour le maïs, afin de produire des quantités satisfaisantes d'AXOS de faible DP pour mener à bien les études de propriétés biologiques potentielles.

CHAPITRE IV

PRODUCTION D'AXOS A L'ECHELLE PREPARATIVE ET CARACTERISATION CHIMIQUE

PARTIE A

PRODUCTION D'AXOS A L'ECHELLE

PREPARATIVE

La production d'arabinoxyloligosaccharides, AXOS, à l'échelle préparative, est réalisée à partir des arabinoxylanes commerciaux issus de maïs et des fractions AX_{purif} extraites des sons de blé et de seigle, au laboratoire. Le double traitement hydrolytique mis en œuvre pour l'obtention des AXOS est effectué dans les conditions optimales définies par le plan d'expériences décrit au chapitre précédent.

Toutefois, l'expertise par HPSEC, de la distribution en masses moléculaires des produits obtenus indique une teneur trop importante en monosaccharides par rapport à nos objectifs. La présence de ceux-ci n'est pas souhaitable dans la fraction AXOS qui sera soumise aux tests ultérieurs de mesure d'activité prébiotique. En effet, des concentrations élevées en arabinose et xylose libres sont susceptibles d'engendrer un biais lors de l'interprétation des résultats concernant la stimulation de la croissance des différentes souches probiotiques testées.

Afin d'attribuer l'éventuel effet mesuré à la seule présence des AXOS, il est nécessaire d'éliminer le plus possible de monosaccharides libérés au cours du processus d'obtention des hydrolysats. Parmi les deux étapes consécutives du procédé de préparation des arabinoxyloligosaccharides, nous observons que c'est principalement la phase d'hydrolyse chimique qui est responsable de la libération d'arabinose et de xylose à l'état monomérique. Les deux oses représentent environ 40% de la masse totale de substance glucidique présente dans l'hydrolysats issu de la combinaison des processus n°1 et n°2.

Ce constat nous a conduit à mettre en place un traitement spécifique visant à abaisser la concentration en monosaccharides dans le produit final. La séparation sur le critère taille ou masse moléculaire a été retenue. Pour être efficace, la mise en œuvre de la technique d'extraction sélective des monosaccharides doit intervenir à l'issue de l'étape de traitement chimique, mettant à profit l'importante différence de masses entre les oligosaccharides et les monosaccharides présents dans l'hydrolysats à cette étape. Deux techniques différentes ont été testées :

- la filtration moléculaire sur gel à l'échelle préparative
- l'ultrafiltration.

I Elimination sélective des monosaccharides par FPLC d'exclusion moléculaire sur gel superdex

Afin d'économiser les arabinoxylooligosaccharides dont nous disposons, l'étude est réalisée initialement sur des mélanges modèles d'oligosaccharides et de monosaccharides. Leurs compositions sont indiquées ci-dessous :

Tableau 35 : Composition des mélanges étalons utilisés en FPLC

	Composition	Concentration mg.mL⁻¹
Mélange 1	Inuline : FOS 10 < DP < 60	10
	Xylose	10
Mélange 2	Synergy (Inuline + RP 95) FOS : 2 < DP < 60	10
	Xylose	10

Les mélanges 1 et 2 ont été analysés dans un premier temps par HPSEC sur colonne Aquagel OH-30, afin de vérifier si leur distribution qualitative en masses moléculaires était représentative de celle de l'hydrolysat chimique d'AX_{purif}, **figure 34**.

L'analyse du chromatogramme, **figure 34**, nous permet de constater que les oligosaccharides de masses élevées, produits après hydrolyse des AX_{com} par le TFA, possèdent une distribution de masses moléculaires qualitativement comparables à celle des mélanges 1 et 2, commerciaux. Par contre, les fructooligosaccharides (FOS, RP95) coéluent seulement partiellement les oligosaccharides de faible masse libérés au cours de l'hydrolyse chimique.

Dans un deuxième temps, le mélange 1 représentatif qualitativement de la distribution en masses moléculaires de l'hydrolysat est analysé par FPLC d'exclusion moléculaire sur gel superdex 75. Les résultats sont présentés **figure 35**.

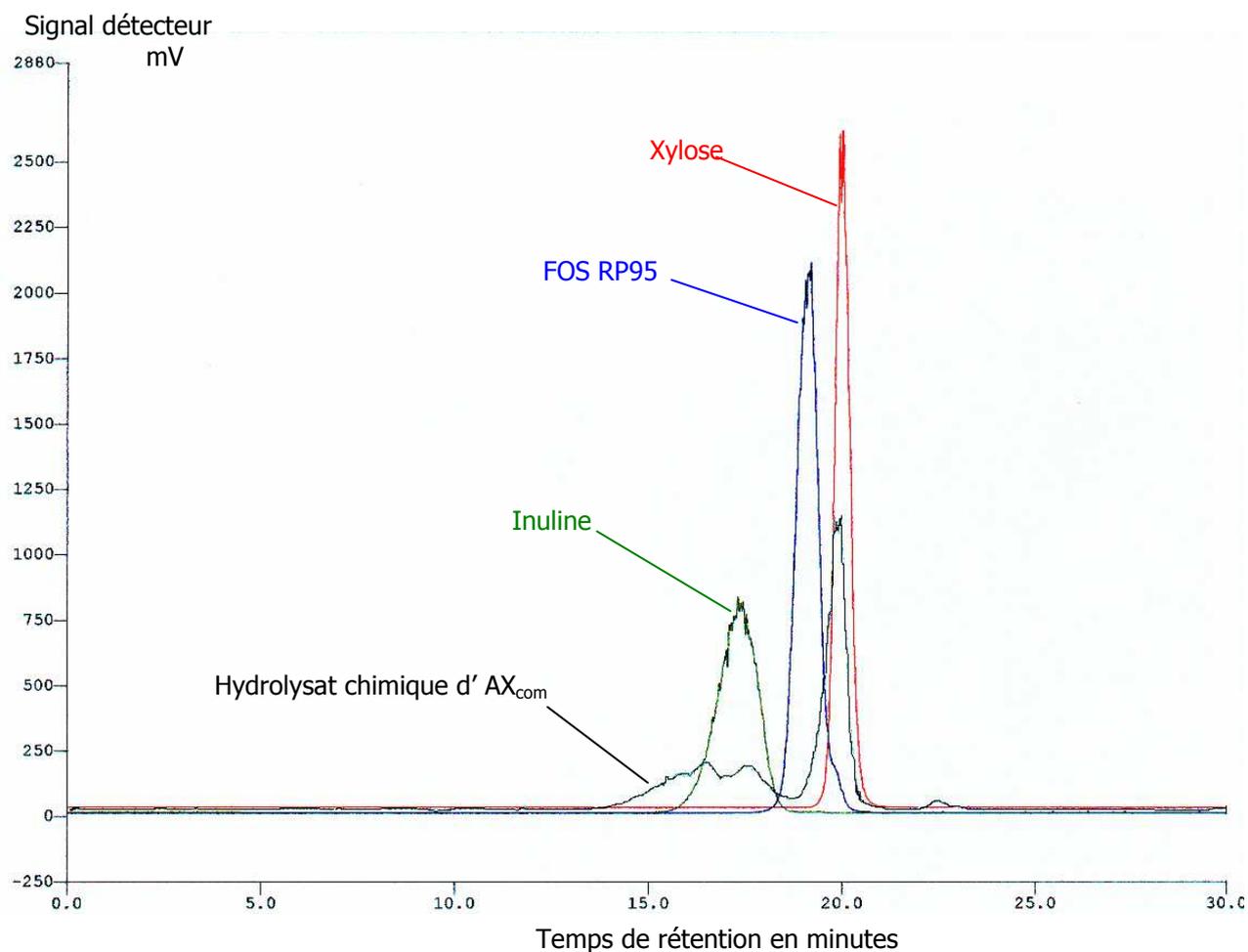


Figure 34 : Superposition des profils chromatographique HPSEC de l'inuline, FOS RP95, xylose, et hydrolysate chimique de AX_{com} de maïs.

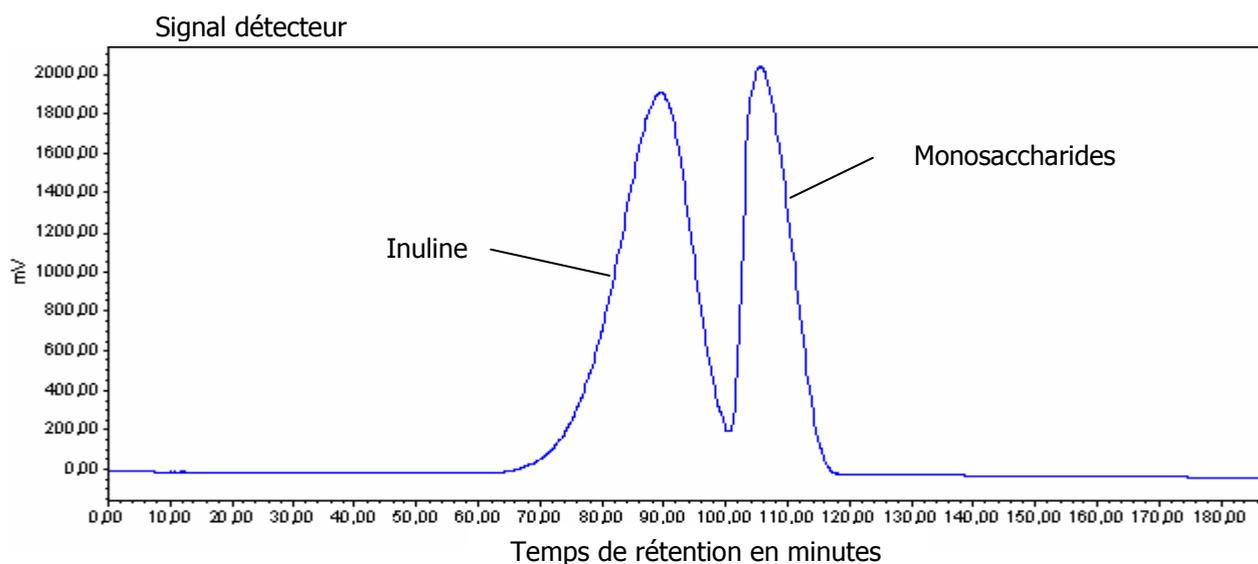


Figure 35 : Chromatogramme du mélange 1 Inuline + Xylose obtenu sur Superdex 75 et détection réfractométrique.

La résolution R_s , entre les fractions oligosaccharides et monosaccharides ($R_s = 0,79$) est acceptable (figure 35). Toutefois, si l'on peut conclure que la filtration moléculaire sur gel est adaptée à l'élimination sélective des monosaccharides, ses performances en terme quantitatif restent limitées. En effet, si l'on ne souhaite pas affecter la résolution des familles oligosaccharidique et monosaccharidique, la quantité de matériel glucidique séparable par cycle d'analyse, exprimée en équivalent xylose, ne peut excéder 50mg. Le volume de dépôt doit quant à lui rester inférieur à 2% du volume de la phase stationnaire. Dans de telles conditions, l'élimination de la fraction monosaccharidique présente dans 5g d'hydrolysat chimique, obtenu dans les conditions préparatives optimales, nécessiterait 100 cycles d'une durée de deux heures chacun. Ce simple calcul nous amène à disqualifier cette technique dans les conditions où nous pouvons la mettre en œuvre au laboratoire, pour atteindre l'objectif initialement fixé.

II Elimination sélective des monosaccharides par ultrafiltration

II 1 Vérification de la sélectivité de la membrane d'ultrafiltration

Les conditions opératoires sont décrites page 200 du chapitre Matériels et méthode. L'étude est réalisée sur 40mL d'hydrolysat chimique d'arabinoxylanes de maïs, obtenu dans les conditions optimales définies à l'issue du plan d'expériences (AX_{com} à $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $[\text{TFA}] = 0,16\text{M}$, pendant 2h à 80°C). Le système d'ultrafiltration (UF) est utilisé en mode diafiltration discontinue. Le schéma de principe de ce mode de fonctionnement est illustré **figure 36** (d'après Ultrafiltration and microfiltration Hand Book). On peut éliminer sélectivement et jusqu'à la teneur résiduelle souhaitée, les solutés de taille ou de masse inférieure au seuil de coupure de la membrane semi-perméable utilisée.

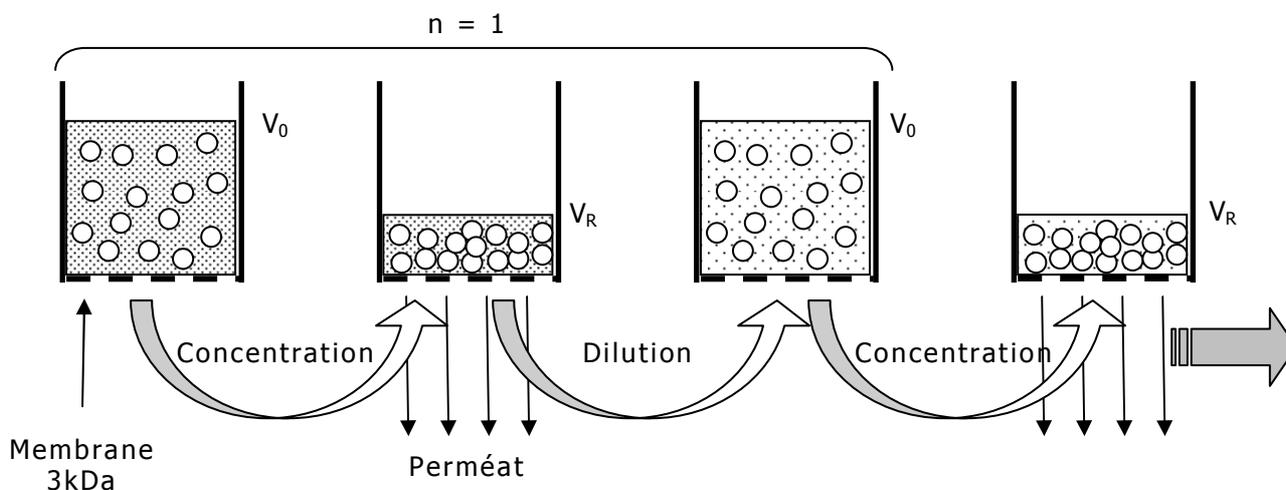


Figure 36 : Schéma de principe de la diafiltration en mode discontinu.

V_0 = volume initial, V_R = volume de rétentat final.

Au cours de l'opération, on mesure le débit de perméat ainsi que la concentration en oligosaccharides de hautes masses et monosaccharides dans les compartiments rétentat et perméat. Ces deux familles moléculaires sont dosées par HPSEC sur colonne Aquagel OH-30 selon la méthode décrite pages 69 à 72 et les conditions opératoires, page 207 du chapitre Matériels et méthodes. Sur la base de ces mesures, on peut calculer le flux J de perméat, le taux de rétention, T_{RET} , ainsi que le rendement de récupération, R , dans le rétentat, de chacune des deux familles moléculaires précédemment caractérisées, à l'aide des relations suivantes :

$$J = \frac{Q}{S}$$

où Q est le débit en $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$; S est l'aire de la membrane en cm^2 ; J est en $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$.

$$T_{RET} = \frac{C_R - C_P}{C_R} \times 100$$

où C_R concentration de la famille moléculaire considérée dans le rétentat et C_P , sa concentration dans le perméat.

$$R = \frac{C_R \times V_R}{C_0 \times V_0}$$

où V_R est le volume de rétentat, C_0 la concentration initiale de la fraction considérée et V_0 son volume initial.

Les évolutions du flux de perméat ainsi que celle du taux de rétention sont illustrées **figures 37 et 38** ci-après :

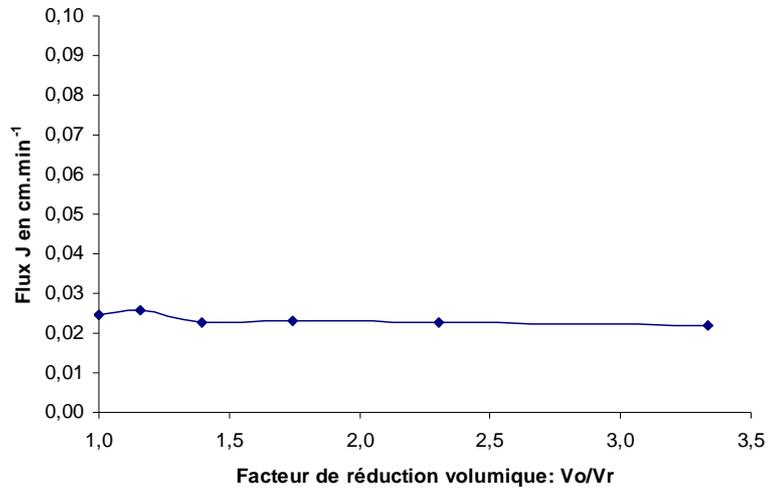


Figure 37 : Evolution du flux de perméat en fonction du facteur de réduction volumique.

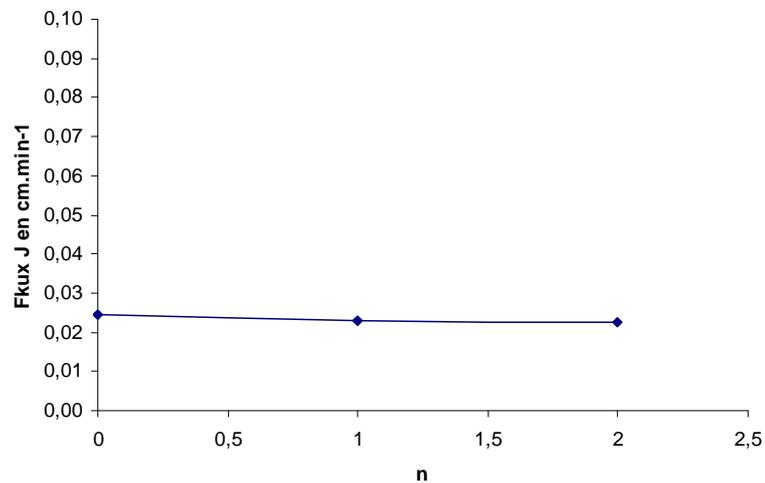


Figure 38 : Evolution du flux de perméat J en fonction du nombre de cycles n de concentration/dilution.

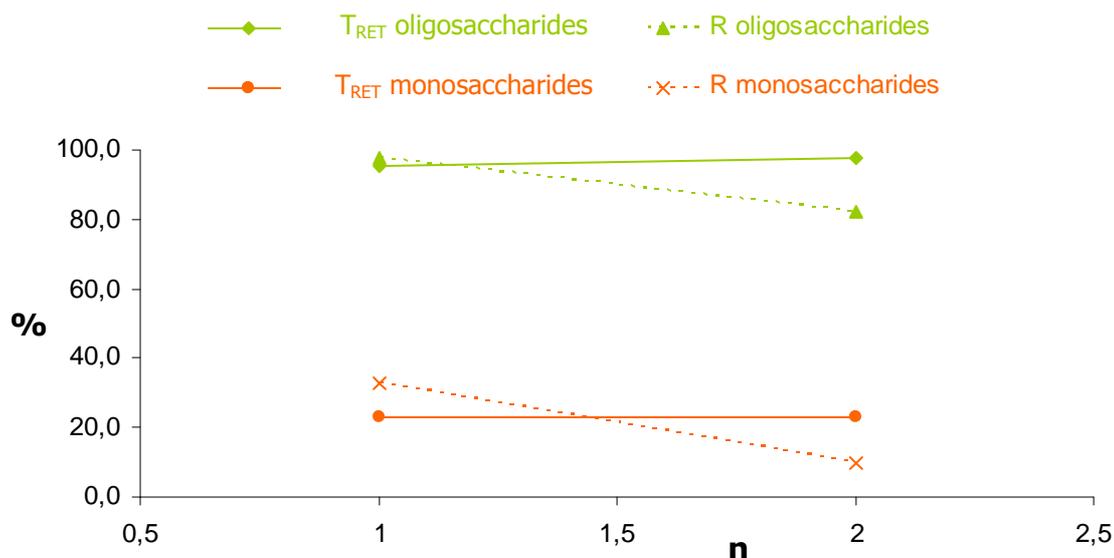


Figure 39 : Evolutions du taux de rétention des oligosaccharides et des monosaccharides ainsi que du rendement de récupération de chacune de ces familles de composés en fonction du nombre, n, d'opérations successives de concentration / dilution.

La constance du flux de perméat, lorsque le facteur de réduction volumique $\frac{V_0}{V_R}$ varie de 1 à 3,5 atteste de l'absence d'une incidence négative du phénomène de polarisation de concentration¹ sur les performances de la membrane d'ultrafiltration. Cette observation est importante dans le cadre d'un transfert d'échelle du procédé, même si les flux de perméat mesurés à l'échelle du laboratoire ne sont pas transposables à une échelle supérieure (pilote ou industrielle). Dans les limites de concentration de matière, atteintes dans le rétentat, le contrôle de son accumulation à la face amont de la membrane sera facilement gérable à l'échelle pilote en agissant sur la vitesse d'écoulement de la solution traitée, tangentiellement à la surface de la membrane.

Le seuil de coupure de la membrane est bien adapté à la rétention d'oligosaccharides de hautes masses issus de l'hydrolyse chimique puisque leurs taux moyens de rétention sont de 96,5%. Le perméat, bien que majoritairement constitué de monosaccharides, contient également une faible proportion d'oligosaccharides de degré de polymérisation inférieur à 5, comme en témoigne la **figure 40** :

¹ Accumulation réversible de matière à la face amont de la membrane se traduisant généralement par une baisse du flux de perméat.

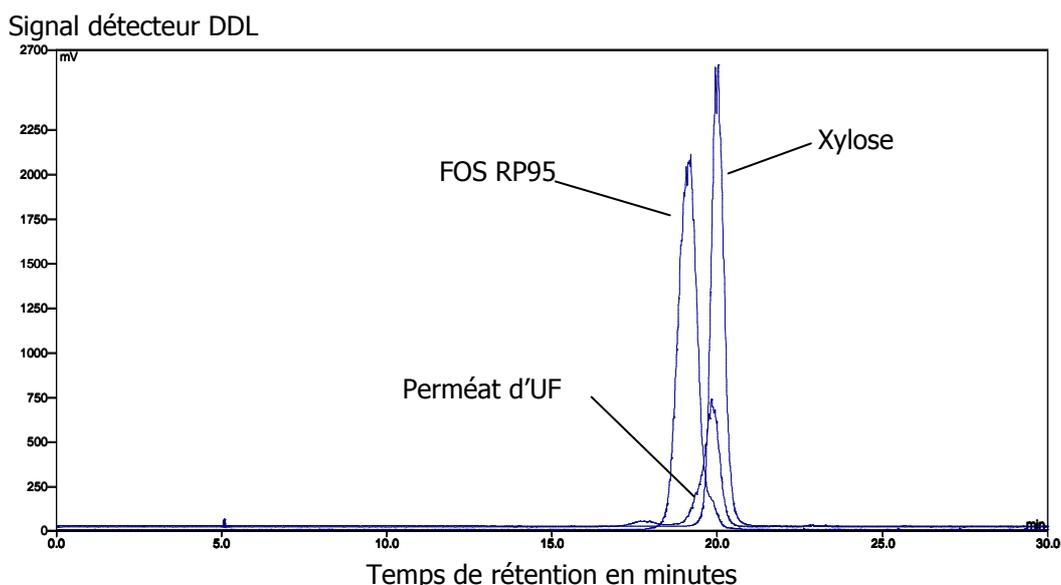


Figure 40 : Comparaison des profils chromatographiques de perméat, de xylose et de FOS type RP95. Analyse effectuée par HPSEC sur colonne Aquagel OH-30 et détection DDL.

Le taux moyen de rétention de la famille moléculaire incluant les monosaccharides et les oligosaccharides de faibles DP est de 22,5%. Sur la base de la connaissance du taux de rétention mesuré expérimentalement pour chacune des deux familles moléculaires, il est possible de prévoir l'évolution de leurs concentrations respectives dans le rétentat en fonction du nombre, n, d'étapes successives de concentration/dilution, **figure 41**. Le calcul est réalisé en utilisant la relation :

$$C_{Rn} = C_0 \left[\left(\frac{V_0}{V_R} \right)^{T_{ret}-1} \right]^n$$

où C_{Rn} : concentration de la famille moléculaire considérée dans le rétentat à l'issue de n opérations de concentration/dilution,

C_0 : concentration initiale de cette même famille avant la diafiltration, V_0 le volume initial de rétentat (constant),

V_R : le volume final de rétentat à l'issue de l'étape de concentration, T_{ret} est le taux de rétention par la membrane de la famille moléculaire considérée,

n : nombre de cycle de concentration/dilution

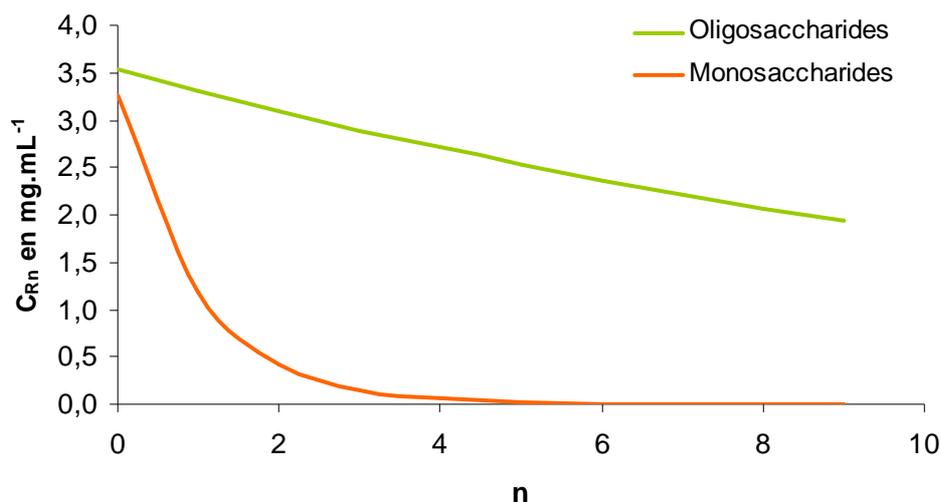


Figure 41 : Evolution de la concentration résiduelle en monosaccharides et oligosaccharides dans le rétentat en fonction du nombre de cycle, n , de concentration/dilution.

Dans les conditions expérimentales mises en œuvre, un abaissement de 89% de la teneur en monosaccharides est obtenu lorsque l'on atteint $n = 2$. On peut améliorer le taux d'élimination des monosaccharides en augmentant n . Toutefois, compte tenu de l'allure asymptotique de l'évolution de la concentration de monosaccharides, en fonction de n , il semble raisonnable de trouver un compromis permettant de concilier un taux d'élimination élevé des monosaccharides avec une durée non excessive de l'opération de diafiltration. Au cours l'application ultérieure de cette technique, en mode diafiltration discontinue, nous fixerons n égal à 2.

La présence d'oligosaccharides de faible DP, dans le perméat, n'est pas surprenante compte tenu du seuil de coupure de la membrane, annoncée à 3kDa par le fabricant. La solution alternative consistant à utiliser une membrane de seuil inférieur, 1kDa par exemple, était envisageable pour limiter la perte d'oligosaccharides d'intérêt au niveau du perméat. Toutefois, la comparaison des performances de ces deux membranes, exprimées en terme de perméabilité à l'eau dans des conditions standard, nous a conduit à disqualifier l'emploi de la membrane 1kDa. En effet, la perméabilité est 3 fois plus faible pour la membrane 1kDa comparativement à celle de la membrane 3kDa (données fournisseur).

II 2 Application de la diafiltration à l'extraction sélective de la fraction oligosaccharides des hydrolysats chimiques d'AX_{purif}

Pour obtenir les AXOS recherchés, 5g d'extraits AX_{purif} de blé, seigle et de maïs ont été hydrolysés chimiquement puis enzymatiquement en utilisant les conditions optimales définies par le plan d'expériences. L'utilisation de l'ultrafiltration sur membrane 3kDa, entre les deux étapes d'hydrolyse, permet d'éliminer les monosaccharides et les oligosaccharides de très faibles masses moléculaires et d'isoler une fraction oligosaccharidique de DP élevé. Les familles moléculaires sont quantifiées par HPSEC et détection DDL, à chacune des étapes du processus de production des arabinoxylooligosaccharides, en utilisant l'étalonnage défini au paragraphe II 1 du chapitre II : les polymères de haut poids moléculaires P1 sont élués entre 9,5 min et 11 min, les polymères de DP plus faibles P2 entre 11 min et 15,5 min, les oligosaccharides de DP élevé O1 entre 15,5 min et 18,4 min, les oligosaccharides O2 de faible DP entre 18,4 min et 19,5 min et enfin les monosaccharides M sont élués entre 19,5min et 21min.. Les résultats sont présentés **figure 42**.

Le traitement intermédiaire de diafiltration permet de réduire d'un facteur 2,7 la teneur en monosaccharides contaminants dans l'hydrolysat final, comme l'illustre la figure 42c représentant un hydrolysat enzymatique obtenu avec ou sans ultrafiltration intermédiaire.

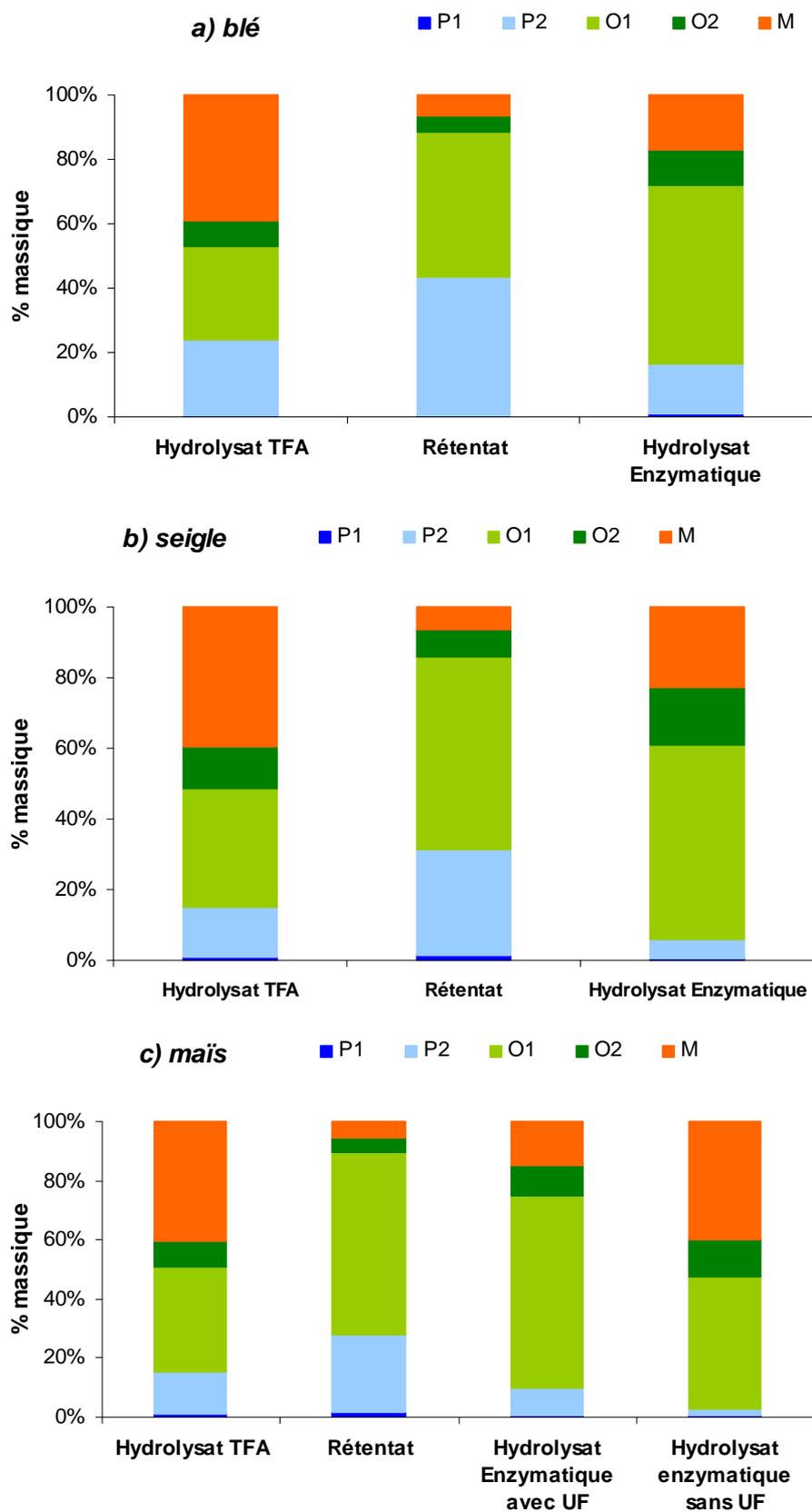


Figure 42 : Effet du traitement d'ultrafiltration sur la distribution en tailles des produits d'hydrolyse d'arabinoxylanes de :
a) blé, b) seigle et c) maïs.

PARTIE B

CARACTERISATION

PHYSICO-CHIMIQUE

DES PRODUITS D'HYDROLYSE

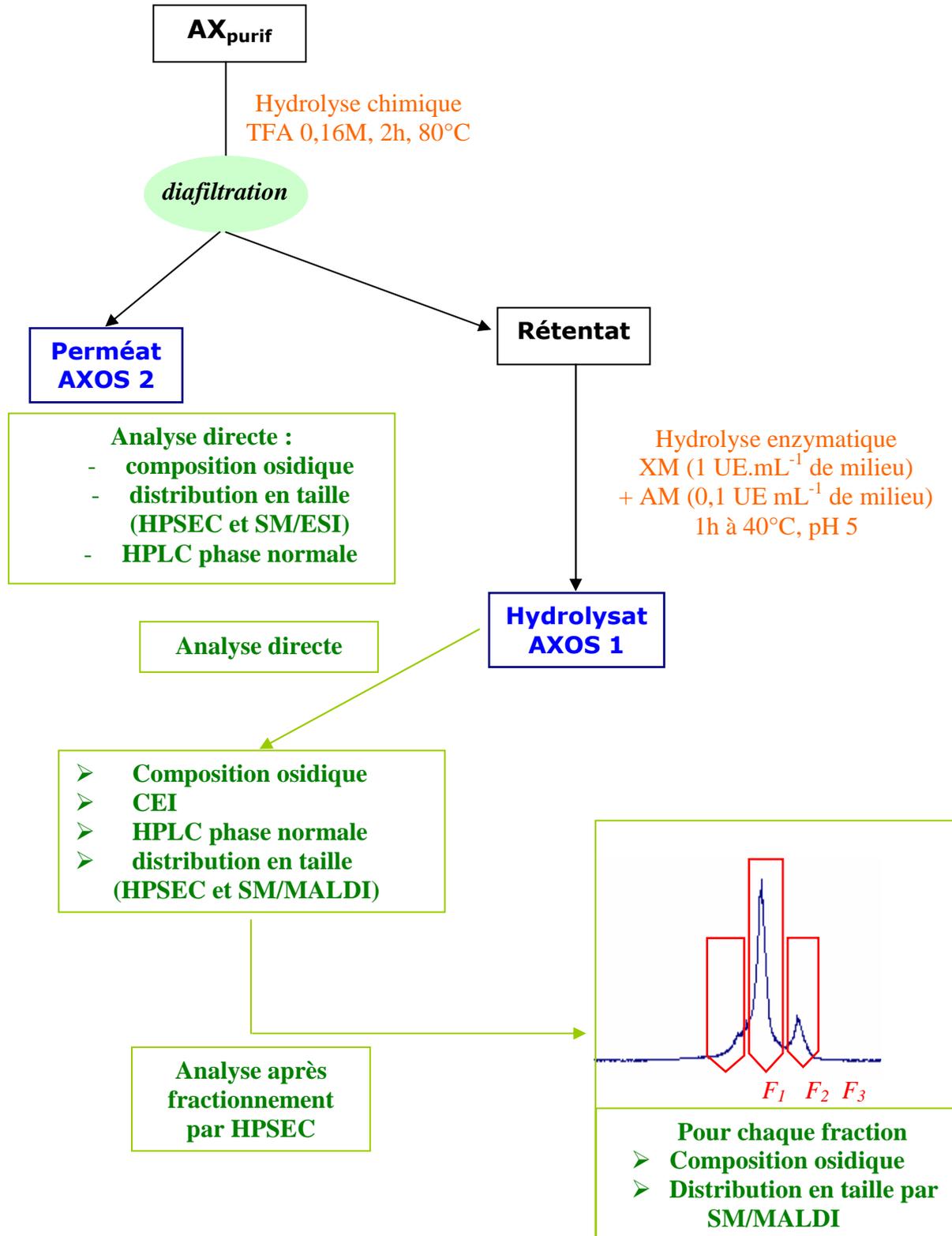


Figure 43 : Analyses physico-chimiques des hydrolysats au cours du processus d'obtention.

Les hydrolysats produits à l'échelle préparative dans les conditions optimisées sont caractérisés sur la base des critères taille, masse et composition osidique avant l'évaluation de leurs propriétés prébiotiques.

L'organigramme ci-contre, **figure 43**, présente de manière synthétique, l'ensemble des analyses physico-chimique réalisées au cours du procédé d'obtention des fractions oligosaccharidiques, identifiées AXOS 1 et AXOS 2 résultant de l'hydrolyse des arabinoxylyanes purifiés ou commerciaux.

I Analyse de la fraction AXOS 1

I 1 Composition osidique par CPG/SM

L'analyse qualitative et quantitative de la composition osidique des arabinoxylooligosaccharides est réalisée par CPG/SM dans les conditions expérimentales décrites page 204 du chapitre Matériels et méthodes. Les chromatogrammes sur la base desquels sont estimées les compositions osidiques des fractions AXOS 1 issues de blé, de seigle et de maïs sont présentés en *annexe 5*. Les résultats sont illustrés par la **figure 44** ci-dessous :

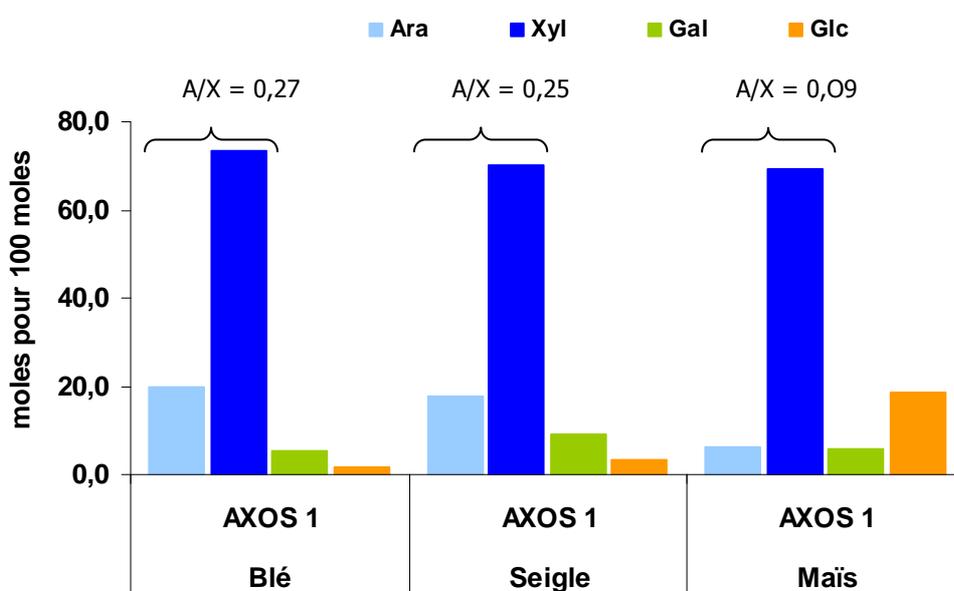


Figure 44 : Comparaison des compositions osidiques des AXOS 1 issus des différentes céréales.

L'arabinose et le xylose représentent près de 90% des oses constitutifs de la fraction AXOS 1, lorsque celle-ci est produite à partir des sons de blé et de seigle et seulement 75% pour les arabinoxylooligosaccharides issus de maïs. Cette différence, en accord avec les compositions osidiques établies pour chacun des trois substrats AX (cf. paragraphes I 2 2 et I 3 1 du chapitre II), peut être attribuée en partie au procédé de purification mis en œuvre pour obtenir les arabinoxylyanes. En effet, le traitement de désamidonnage des extraits bruts de blé et de seigle, suivi d'une étape de dialyse intensive peut justifier leur plus faible teneur en glucose comparativement à celle observée pour les arabinoxylyanes de maïs. Toutefois nous ne pouvons pas exclure la présence d'autres formes résiduelles de glucose (β glucanes) dans l'extrait commercial d'arabinoxylyanes de maïs.

La présence de galactose, à des teneurs globales comprises entre 5% et 8% dans les AXOS 1, indique l'existence de branchement, à des degrés divers, sur les chaînes principales de xylanes, ce qui est en parfait accord avec les observations de SAULNIER (1995) sur le maïs.

La présence d'acides uroniques (galacturonique et glucuronique) est mise en évidence dans chacun des trois mélanges d'AXOS 1, après dérivation des methylglycosides par le TMSIm, ou le HDMS/TMSCl. Les résultats sont en accord avec BRILLOUET (1987). La très faible amplitude des signaux relatifs à l'élution de ces solutés ainsi qu'une mauvaise résolution avec les pics adjacents et majoritaires du glucose et du galactose, n'est pas compatible avec leur quantification précise. L'existence d'acides uroniques, seulement à l'état de trace, si elle est confirmée, est justifiée par le mode de préparation des AX_{purif} . En effet, ceux-ci ont subi une purification par extraction en phase solide sur échangeur d'anions, au cours de laquelle les polysaccharides anioniques adsorbés sur la phase stationnaire ont été éliminés. La fraction polysaccharidique non retenue, théoriquement non chargée, a été collectée pour constituer les AX_{purif} . Toutefois la fraction polysaccharidique non retenue par l'échangeur d'anions peut contenir également des traces d'acide uroniques. En effet, au cours de l'extraction, la rétention des polysaccharides présentant dans leur structure des résidus chargés négativement et correspondant à des acides uroniques, peut ne pas être totale. La capacité d'adsorption des arabinoxylyanes anioniques, sur le gel de silice greffée QMA, peut être affectée par l'encombrement stérique au voisinage des résidus acides.

L'abaissement très significatif du rapport A/X dans les AXOS 1, qui atteint 0,27 pour le blé, 0,25 pour le seigle et 0,09 pour le maïs (cf. figure 44) résulte d'une élimination sélective d'arabinose et non de la destruction de celui-ci au cours du processus d'obtention des AXOS 1. En effet, la chute de la teneur en arabinose n'est observable dans l'hydrolysat chimique d'arabinoxylyanes qu'après le traitement de diafiltration. Cette observation nous permet d'émettre

l'hypothèse selon laquelle les liaisons β 1-2 arabinose-xylose sont plus sensibles à l'action du TFA que les liaisons β 1-4 xylose-xylose. Cette hypothèse doit être étayée par la présence importante d'arabinose monomère dans la fraction AXOS 2 correspondant au perméat de l'opération de diafiltration.

I 2 Mise en évidence d'oligosaccharides anioniques par CEI

Dans le but d'étayer l'hypothèse de la présence d'oligosaccharides anioniques dans la fraction AXOS 1, une séparation par chromatographie d'échange d'ions, CEI, sur une colonne plus résolutive que les simples cartouches d'extraction en phase solide, a été mise en œuvre. Les conditions expérimentales sont décrites page 208 du chapitre Matériels et méthodes.

Le chromatogramme obtenu est présenté **figure 45** :

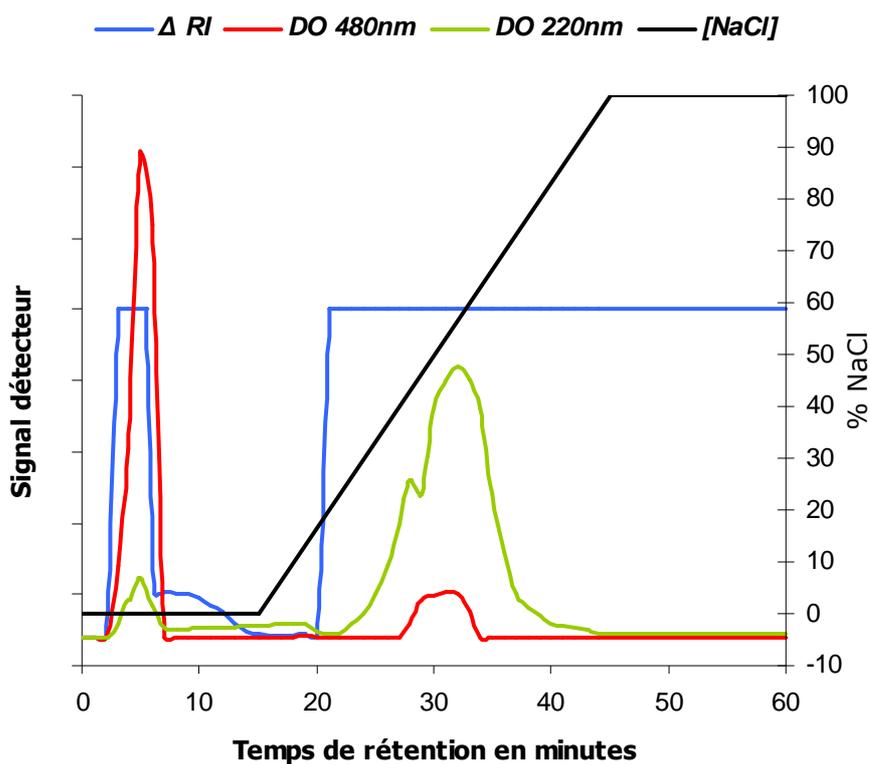


Figure 45 : Analyse des AXOS 1 de seigle, par CEI sur colonne Accel plus QMA. Détection UV à 220nm et réfractométrique, en série. Collecte de l'éluat par fractions de 1min et dosage des oses totaux par la méthode de Dubois.

La majeure partie, environ 90%, des composés osidiques dosables par la méthode de Dubois, est présente dans la fraction chromatographique contenant les solutés non retenus par la phase stationnaire échangeuse d'anions. Cependant, on observe une élution fortement retardée d'environ 10% des constituants glucidiques entrant dans la composition des AXOS 1. Ce constat, bien qu'insuffisant à lui seul, conforte l'hypothèse de la présence d'arabinoxyloligosaccharides substitués par des résidus acides uroniques. Une analyse structurale complémentaire des oligosaccharides, notamment par spectrométrie de masse en mode MALDI, doit permettre de prouver sans ambiguïté l'existence de ces acides dans les fractions considérées, issues des sons de céréales. En effet, cette technique, qui ne nécessite pas de faire subir de traitement de méthanolyse et de dérivation chimique aux échantillons avant leur analyse, permet ainsi de s'affranchir du problème limitant du rendement, souvent faible, de récupération des acides uroniques, observé lors d'une analyse par CPG.

I 3 Analyse de la distribution de tailles des oligosaccharides

La distribution des degrés de polymérisation d'un mélange d'oligosaccharides joue un rôle déterminant pour l'activité prébiotique de celui-ci (cf. Chapitre I).

L'analyse des osigrammes des AXOS 1 témoigne de la complexité des produits obtenus. La présence de 5 à 6 oses différents (arabinose, xylose, galactose, glucose, acides uroniques... cf. paragraphe I 1 de ce chapitre) et l'existence probable de ramification sur les chaînes principales de xylanes rendent délicate l'expertise, sur ce critère, des mélanges d'oligosaccharides issus des arabinoxylanes de blé, de seigle et de maïs.

Parmi les différentes techniques accessibles permettant d'établir une distribution moléculaire qualitative et quantitative sur le critère de taille, nous avons choisi de mettre en œuvre la HPSEC et la HPLC en phase normale, en combinaison avec la spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF.

I 3 1 HPLC en phase normale sur gel de silice greffée aminopropyle

I 3 1 1 Expertise de la méthode sur un mélange de référence

Les conditions opératoires sont décrites page 208 du chapitre Matériels et méthodes. La technique analytique est utilisée pour la séparation d'un mélange commercial de fructooligosaccharides (FOS : RP95, Orafiti Belgique) dont la composition qualitative, communiquée par le fournisseur, fait état de la présence majoritaire d'oligosaccharides de DP compris entre 2 et 8 (*annexe 6 : fiche technique*). Les résultats sont illustrés par le chromatogramme, **figure 46**. La résolution des différentes espèces moléculaires constitutives du produit RP95 est correcte, puisque supérieure à 1 pour chaque couple de solutés élués consécutivement. On observe 7 pics sur le chromatogramme, dont le premier correspond au fructose. Les autres pics peuvent être attribués à des oligofructoses de DP inférieur ou égal à 7, compte tenu de la composition fournie par le fabricant. Toutefois, ne disposant pas des fructooligosaccharides étalons correspondants, nous avons vérifié la validité de cette séparation, en analysant le même mélange par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF.

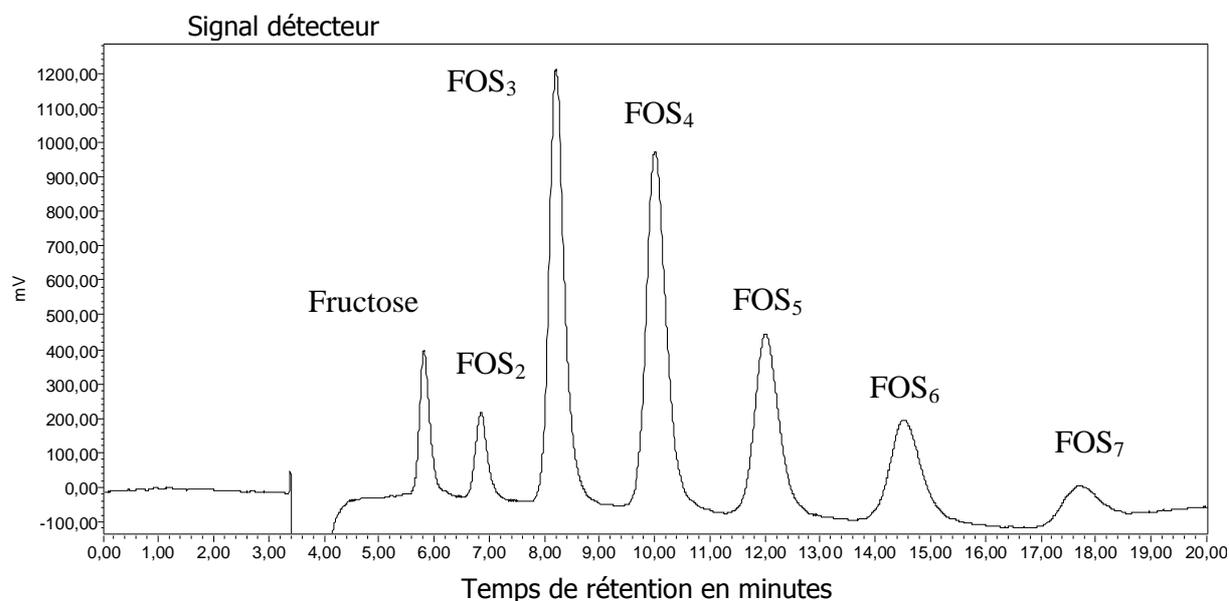


Figure 46 : Analyse par HPLC, en phase normale sur gel de silice greffée aminopropyle, de la préparation commerciale de FOS RP 95, détection réfractométrique.

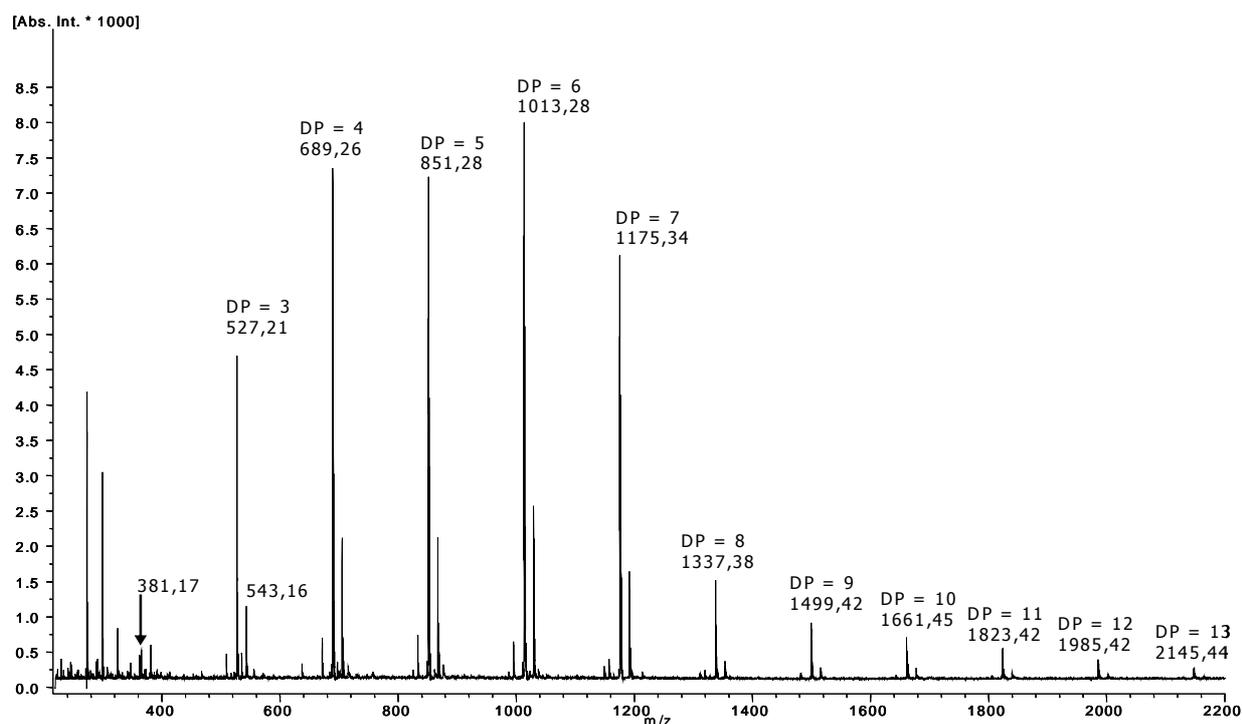


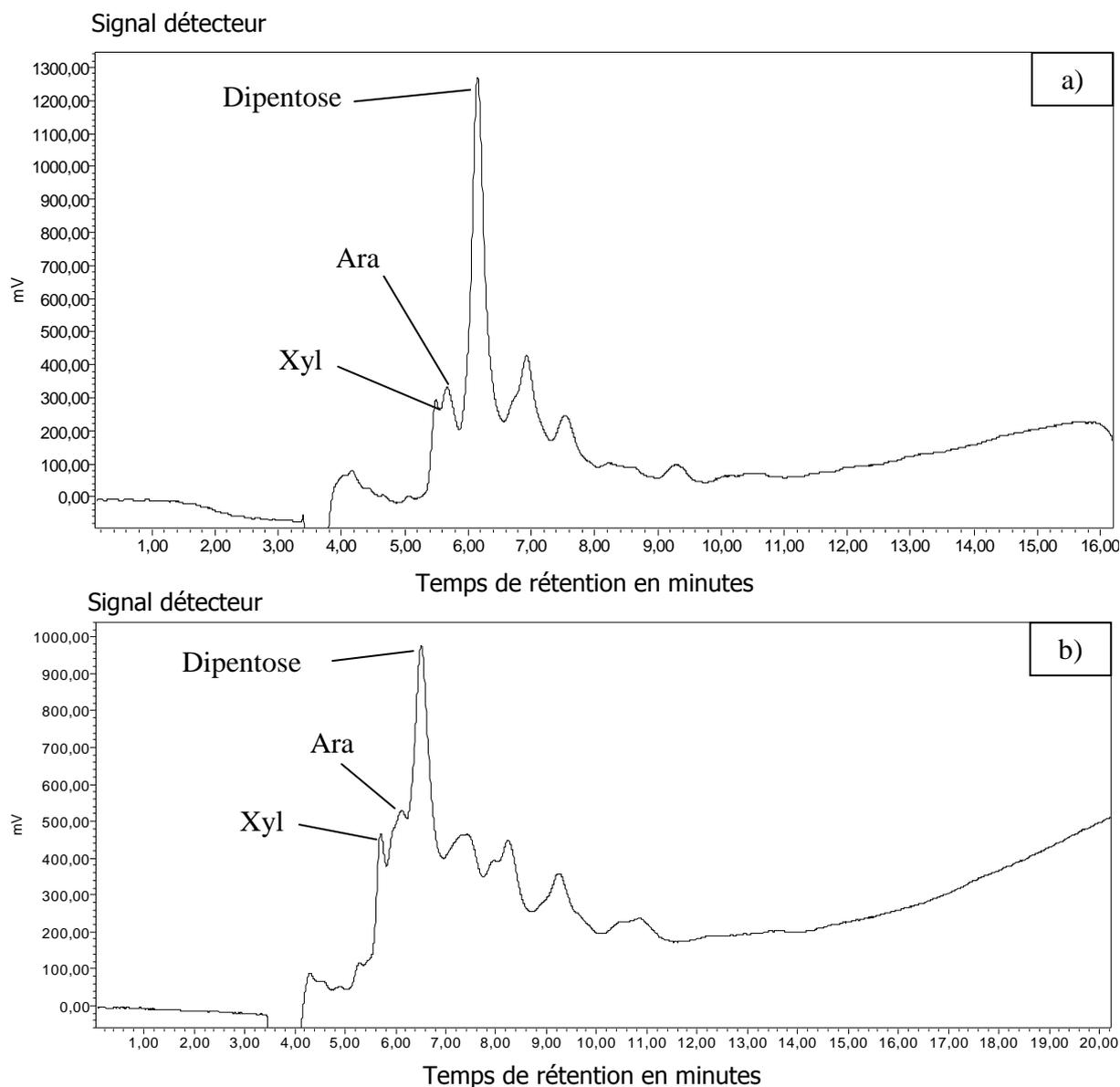
Figure 47 : Analyse par SM en mode MALDI-TOF de la distribution des masses moléculaires des fructooligosaccharides du produit de référence RP95.

Le spectre de masse relatif à l'expertise de la préparation commerciale RP95 est illustré **figure 47**. Il apparaît deux séries homologues d'ions pseudomoléculaires de type $M+Na^+$ et $M+K^+$, de DP 3 (m/z : 527, 543) à DP 13 (m/z : 2147, 2163). Le fructooligosaccharide de DP 2 est difficilement identifiable, car situé dans une zone où les ions de matrice sont majoritaires. Toutefois, le signal à m/z 381 pourrait être attribué à un disaccharide, sous sa forme $M+K^+$. Si l'on admet que le rendement d'ionisation est sensiblement le même pour cette série homologue de FOS, il apparaît clairement que les formes DP 3 à 7 sont majoritaires. Ce résultat est en bon accord avec le profil chromatographique (figure 46). Toutefois la technique HPLC ne permet pas de visualiser des espèces de $DP \geq 8$, compte tenu de leur rétention excessive par la phase stationnaire dans les conditions opératoires mises en œuvre.

I 3 1 2 Application de la HPLC en phase normale à l'analyse des AXOS 1

Les conditions expérimentales sont identiques à celles utilisées précédemment. Les chromatogrammes relatifs aux analyses des AXOS 1 issus de blé et de seigle sont présentés **figure**

48a et 48b. Parmi les espèces moléculaires identifiables sur la base d'un étalonnage de la colonne, on retrouve du xylose, de l'arabinose ainsi qu'un disaccharides majoritaire dont le temps de rétention correspond au xylobiose. Les proportions relatives de ces trois oses, pour le blé et le seigle sont présenté dans le **tableau 36**.



**Figure 48 : Analyse des AXOS 1 par HPLC en phase normale sur gel de silice greffée aminopropyle, avec détection réfractométrique :
a) AXOS 1 de seigle, b) AXOS 1 de blé.**

La résolution des solutés constitutifs des AXOS 1 est faible comparativement à celle obtenue au cours de la séparation de la série homologue de fructooligosaccharides. Ce constat n'est pas surprenant, il traduit la grande complexité du mélange d'oligosaccharides engendrés après le double

processus hydrolytique. L'analyse des osigrammes établis pour les fractions AXOS 1 de blé et de seigle rend compte de la multiplicité des combinaisons structurales possibles pour les oligosaccharides produits. Les séquences peuvent inclure exclusivement des pentoses, des pentoses plus des hexoses, des pentoses et des acides uroniques ou encore des pentoses, des hexoses et des acides uroniques, et cela avec des DP variables.

La quantification de chacun des oses identifiés par HPLC en phase normale est présentée dans le tableau suivant :

Tableau 36 : Proportions relatives des oses, estimées par HPLC en phase normale et exprimées en moles pour 100moles d'oses identifiés

Oses identifiés	AXOS 1 de blé	AXOS 1 de seigle
Arabinose	45,5	31,1
Xylose	10,1	7,2
Xylobiose	44,4	61,7

Remarque : Les pourcentages molaires d'arabinose libre et de xylose libre ont été confirmés par GPG/SM, sans méthanolyse préalable des échantillons.

Cependant, la HPLC en phase normale, atteint ses limites pour résoudre un tel mélange, dont les espèces moléculaires constitutives, bien que différentes au niveau structural, peuvent posséder des polarités globales très voisines. La résolution insuffisante des oligosaccharides du mélange n'est pas le seul inconvénient puisque cette technique n'est pas adaptée à l'analyse des structures glucidiques de DP supérieur ou égal à 8 et dont la présence n'est pas à exclure dans les AXOS 1. Des essais en mode gradient de phase mobile (résultats non présentés) n'ont pas permis de surmonter les difficultés rencontrées. Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons choisi de combiner l'utilisation de la HPSEC et de la spectrométrie de masse pour réaliser l'expertise de la composition des AXOS 1 sur le critère de taille.

I 3 2 Fractionnement des AXOS 1 par HPSEC

Le protocole expérimental est décrit page 207 du chapitre Matériels et méthodes. La colonne est préalablement étalonnée par des marqueurs, selon les conditions décrites au paragraphe II 2 du chapitre II (pages 69). Les chromatogrammes résultants des analyses des AXOS 1 sont présentés **figures 49 a, b et c**. Quelle que soit l'origine du substrat utilisé pour produire des

arabinoxyloligosaccharides, on observe une assez grande similitude des profils chromatographiques.

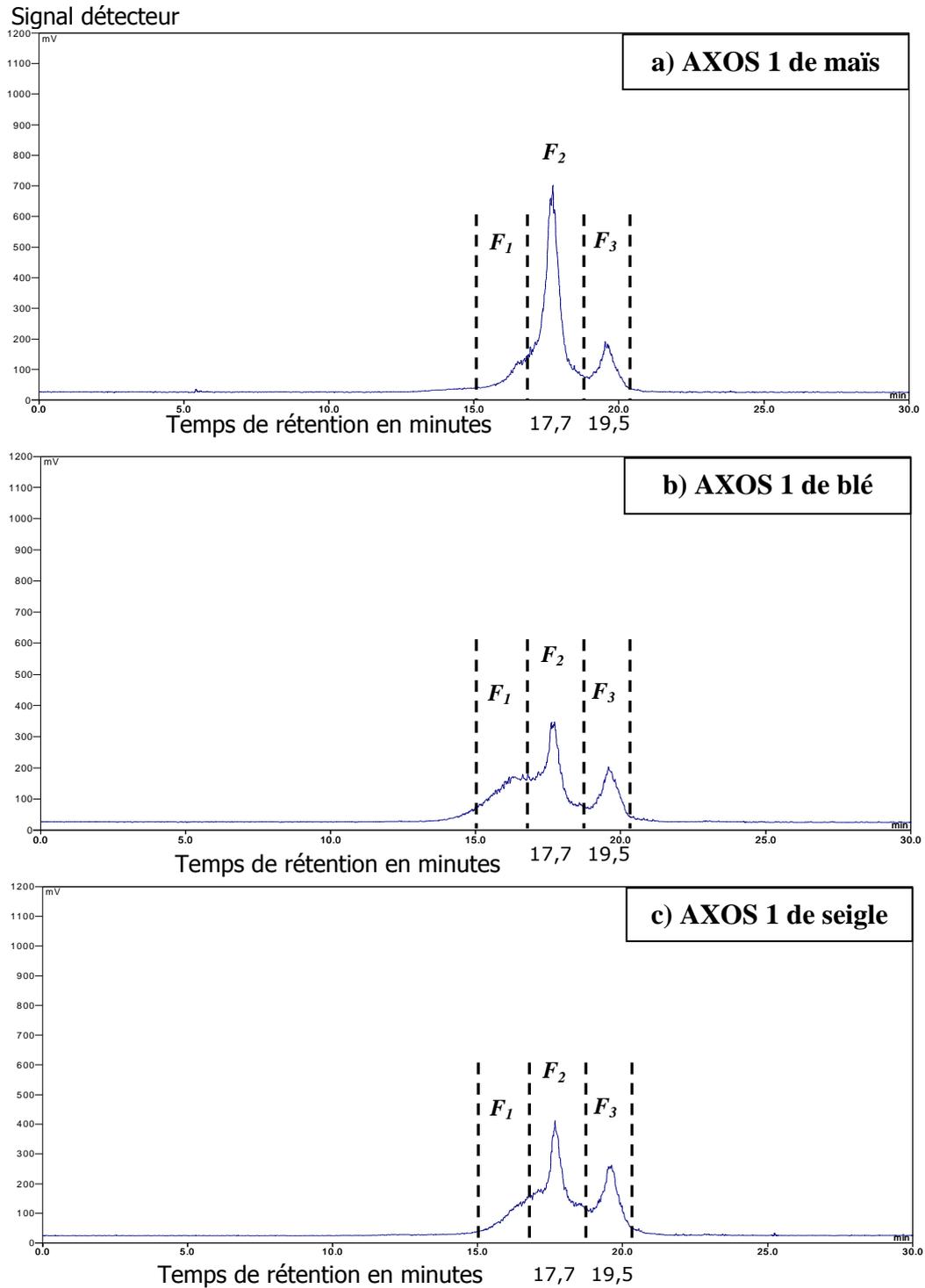


Figure 49 : Analyse des AXOS 1 par HPSEC sur colonne Aquagel OH-30 et détection DDL : a) AXOS 1 de maïs, b) AXOS 1 de blé et c) AXOS 1 de seigle.

On observe, sur les chromatogrammes, deux pics principaux, à T_R 17,7 et 19,5 minutes. Le premier pic, à T_R 17,7 minutes, majoritaire et représentant entre 70 % et 80 % de la masse d'échantillon selon la source, présente un faible épaulement dans sa partie ascendante. Celui-ci correspond à l'élution d'oligosaccharides de DP élevés. En se référant à l'étalonnage de la colonne Aquagel OH-30, on peut observer que la majeure partie des solutés présents sous ce pic sont élués dans une fourchette de T_R comparable à celle de maltooligosaccharides étalons de DP compris entre 4 et 10 (*annexe I*). Il n'est cependant pas possible d'en conclure que les DP des AXOS 1, sous ce pic, possèdent la même distribution de DP. En effet, le comportement chromatographique des solutés en exclusion moléculaire sur gel est fortement dépendant du volume des molécules en solution et donc de leur structure. A masse moléculaire identique, des oligosaccharides linéaires ou ramifiés peuvent présenter des temps de rétention différents. A ce niveau d'expertise du mélange d'AXOS 1, nous pouvons seulement conclure sur l'existence d'une distribution assez homogène des DP des oligosaccharides résultant de l'hydrolyse des arabinoxylanes purifiés. Le deuxième pic, à T_R 19,5min, correspond principalement à l'élution de monosaccharides libérés au cours du processus d'obtention des AXOS, sans toutefois exclure la présence d'oligosaccharides de très faibles DP.

Trois fractions sont collectées, dans les limites de temps de rétention, comme indiqué sur la **figure 49**. Pour chacun des hydrolysats analysés, ces fractions sont identifiées :

$F1 = \text{AXOS } 1_{.1}$: principalement constitués d'oligosaccharides de DP élevé,

$F2 = \text{AXOS } 1_{.2}$: constitué des oligosaccharides de DP moyen,

$F3 = \text{AXOS } 1_{.3}$: constitués de monosaccharides et d'oligosaccharides de faible DP.

Un échantillon représentatif de chacune des fractions ainsi définies est à nouveau analysé par HPSEC, dans les conditions expérimentales citées précédemment. Les profils chromatographiques des fractions AXOS 1_{.1} AXOS 1_{.2} AXOS 1_{.3} sont illustrés **figure 50**. La résolution R_s entre chacune des 3 familles d'oligosaccharides est incomplète, elle évolue entre 0,54 pour le couple AXOS 1_{.1} et AXOS 1_{.2} et 0,92 pour AXOS 1_{.2} et AXOS 1_{.3}. Toutefois, ce préfractionnement réduit la complexité des mélanges d'arabinoxyloligosaccharides, ce qui va rendre leur expertise, par famille de taille, plus aisée.

Les oligosaccharides élués dans les fractions AXOS 1_{.1}, AXOS 1_{.2} et AXOS 1_{.3} sont caractérisés par l'analyse de leur composition relative en oses après méthanolyse ainsi que par l'établissement de leur distribution en DP établie par SM en mode MALDI – TOF.

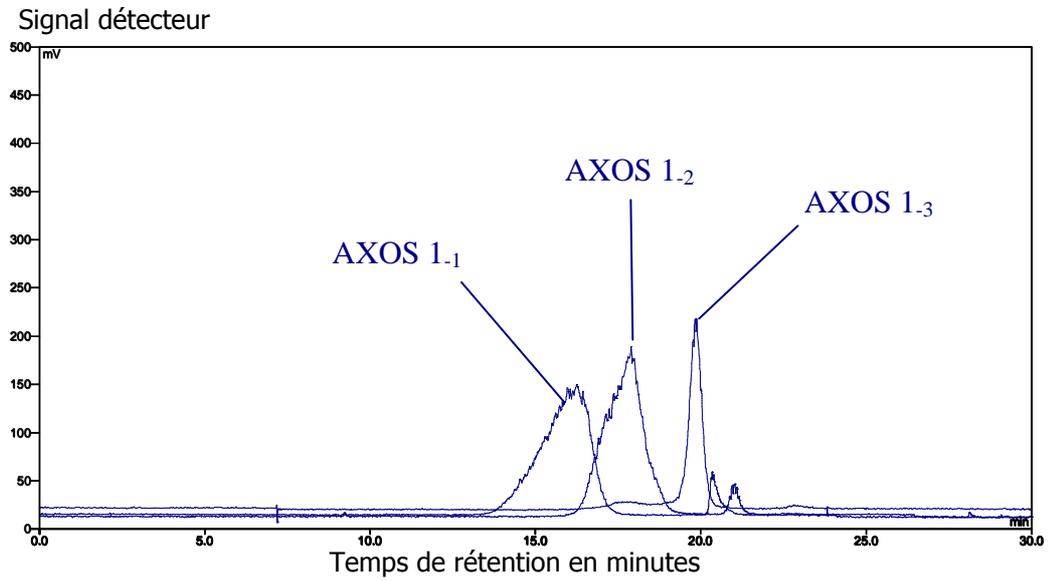


Figure 50 : Analyse par HPSEC, sur colonne Aquagel OH-30, des fractions F₁, F₂ et F₃ issues des AXOS de blé, avec détection DDL.

➤ Composition osidique des fractions obtenues

Les résultats sont présentés figures 51 et 52.

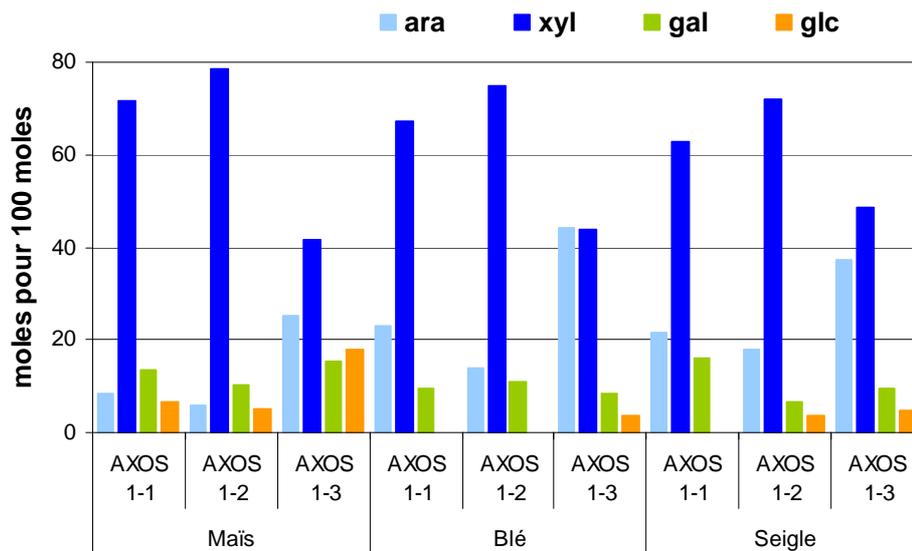


Figure 51 : Composition osidique relative, exprimée en moles pour 100 moles, pour chaque fraction et pour chaque source de son de céréale.

Pour chaque céréale, les fractions AXOS 1₁ et AXOS 1₂ présentent une certaine similitude de composition osidique. Cette observation laisse supposer que bien qu'étant de masse molaire différentes, les espèces constitutives de ces fractions ont des taux de greffage des chaînes xylanes par l'arabinose et le galactose comparables. Toutefois, il est à noter que la résolution chromatographique partielle de ces deux fractions peut contribuer, pour une part, à ce taux de similitude élevé.

La différence de composition osidique constatée entre les arabinoxyanes purifiés de blé et de seigle d'une part et de maïs d'autre part, visualisée **figure 52**, est retrouvée au niveau des différentes fractions AXOS issues de ces céréales. A titre d'exemple, la teneur en arabinose, première série de trois histogrammes pour chaque fraction, est moins importante dans la fraction arabinoxyane AX_{com} de maïs (en bleu) comparativement à ce qu'elle est dans la même fraction correspondant à AX_{purif} de blé (en vert) ou de seigle (en orange). Cette observation peut être faite pour les fractions suivantes issues du fractionnement des AXOS. On constate que la teneur en arabinose dans les échantillons de maïs est toujours inférieure à la valeur mesurée pour le blé ou le seigle.

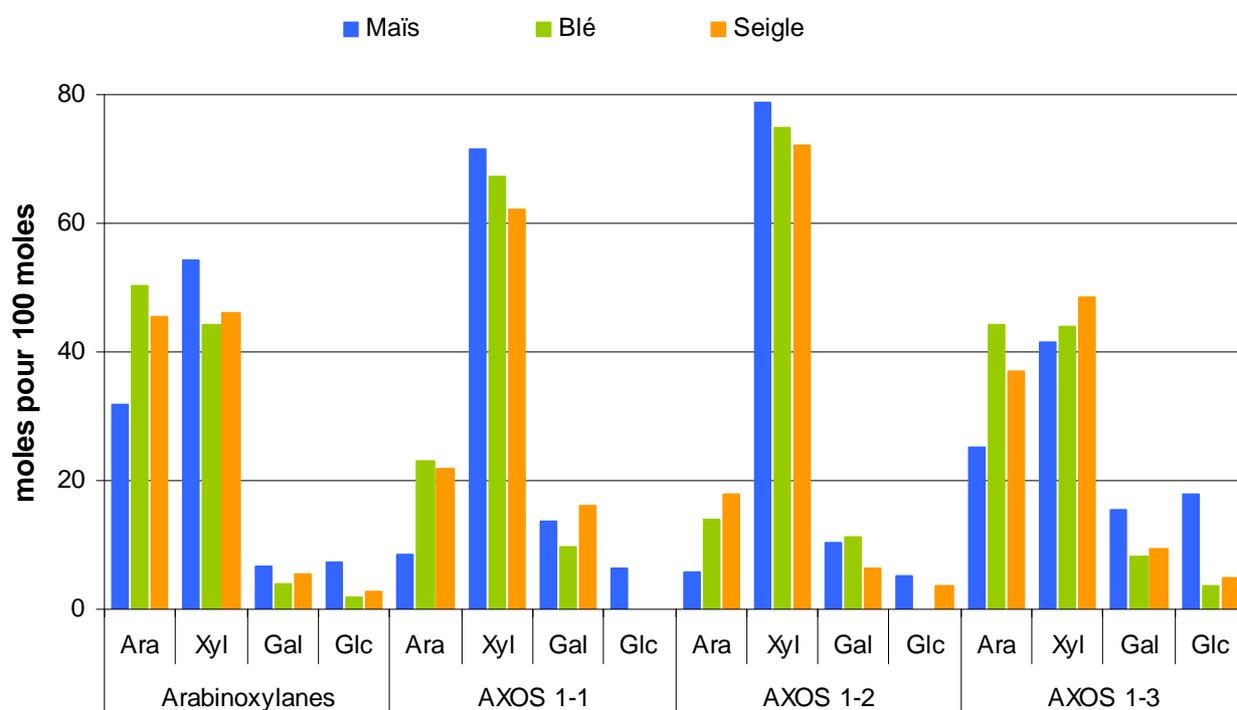


Figure 52 : Comparaison des proportions osidiques relatives, exprimées en moles pour 100 moles, pour chaque type d'oses et chaque fraction en fonction de la nature de la céréale d'origine.

- Analyse de la distribution moléculaire des fractions AXOS par spectrométrie de masse

Compte tenu de la complexité des fractions obtenues nous avons choisi le mode MALDI qui n'engendre pratiquement pas de fragmentations. Les spectres de masse représentatifs des 3 fractions sont présentés **figures 53, 55 et 59**.

Pour les AXOS 1-1 :

L'analyse du spectre complet, **figure 53**, révèle une distribution ionique relativement symétrique de m/z 1317 à m/z 3165, avec un optimum à m/z 2109.

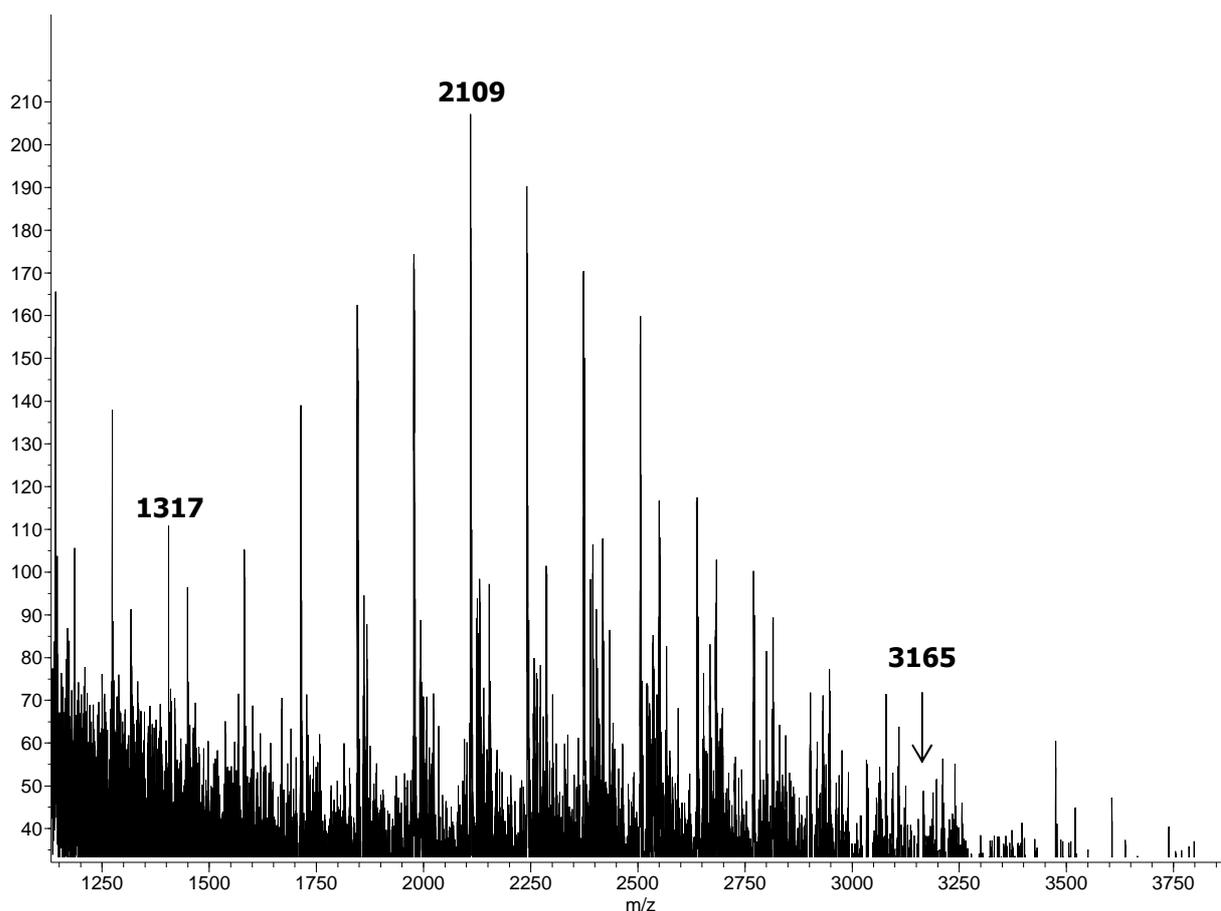


Figure 53 : Analyse par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF, de la fraction AXOS 1-1 issue de maïs.

Un agrandissement du domaine de masse compris entre 1900 et 2600, **figure 54**, domaine où l'intensité des signaux est la plus importante, permet d'identifier trois séries d'ions différentes :

- n oligopentoses substitués par le galactose et par l'acide 4-O-methyl glucuronique, sous la forme $M + Na^+$,
- n oligopentoses substitué par le galactose et par l'acide 4-O-methyl glucuronique, sous la forme $M + K^+$
- n-1 oligopentoses substitués par le galactose, l'acide glucuronique et son dérivé 4-O-methyl, sous la forme $M+Na^+$.

Ces ions correspondent aux signaux à m/z 1977, 1993, 2021, pour n=12 et jusqu'au ions à m/z 2505, 2521, 2549, pour n= 16.

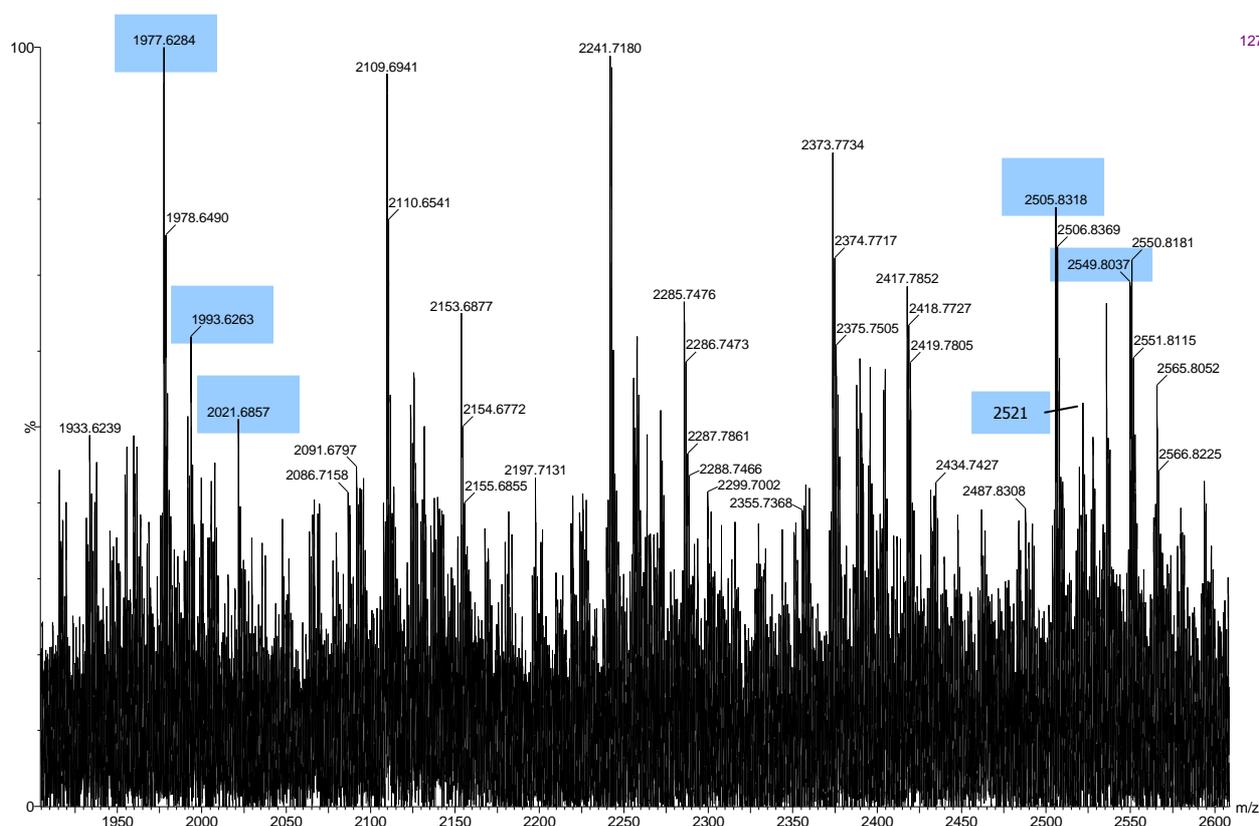


Figure 54 : Agrandissement du domaine de masse 1900-2500 du spectre SM/MALDI-TOF d'AXOS 1₋₁ issu de maïs.

On peut donc conclure que l'analyse complète du spectre met en évidence une distribution de ces ions de n = 7 à (m/z 1317) à n = 21 (m/z 3165). Cette distribution ionique fait apparaître un optimum pour n = 13 (m/z 2109). La fraction AXOS 1₋₁ de maïs est donc composée, entre autre,

d'oligopentoses doublement substitués galactose et acide 4-O-méthyl glucuronique et d'oligopentoses triplement substitués galactose, acide glucuronique et son dérivé 4-O-méthyl. L'existence d'autres familles moléculaires d'AXOS n'est pas à exclure mais leur identification est rendue difficile par la présence du bruit de fond du spectre. On peut avancer toutefois que l'ion à m/z 1933 peut être attribué à un oligomère constitué de 13 pentoses et 1 acide glucuronique et que l'ion à m/z 2197 correspond au même type d'oligomère contenant 15 pentoses.

Pour les AXOS 1-2

D'un point de vue qualitatif, **figure 55**, l'amplitude des distributions des masses moléculaires des AXOS, exprimée en nombre de résidus osidiques constitutifs, n , est présentée dans le **tableau 37** ci dessous :

Tableau 37 : Amplitude de variation du nombre n de résidus osidiques présents dans les oligosaccharides de la fraction AXOS 1-2.

Origine de la fraction AXOS 1-2	n_{\min}	n_{\max}
Maïs	5	16
Blé	5	22
Seigle	5	23

Quelle que soit l'origine du substrat et compte tenu des compositions osidiques présentées figures 51 et 52, on observe 5 familles d'oligomères :

- des oligopentoses constitués de chaînes de xylose, qui d'après la composition osidique doivent être faiblement substitués par de l'arabinose,
- des oligopentoses substitués galactose,
- des oligopentoses substitués acide glucuronique,
- des oligopentoses substitués par l'acide 4-O-méthyl glucuronique.
- des oligopentoses substitués galactose et acide glucuronique

L'observation de telles substitutions des arabinoxylanes de céréales par le galactose, l'acide glucuronique ou son dérivé 4-O-méthyl est rapportée dans la littérature.

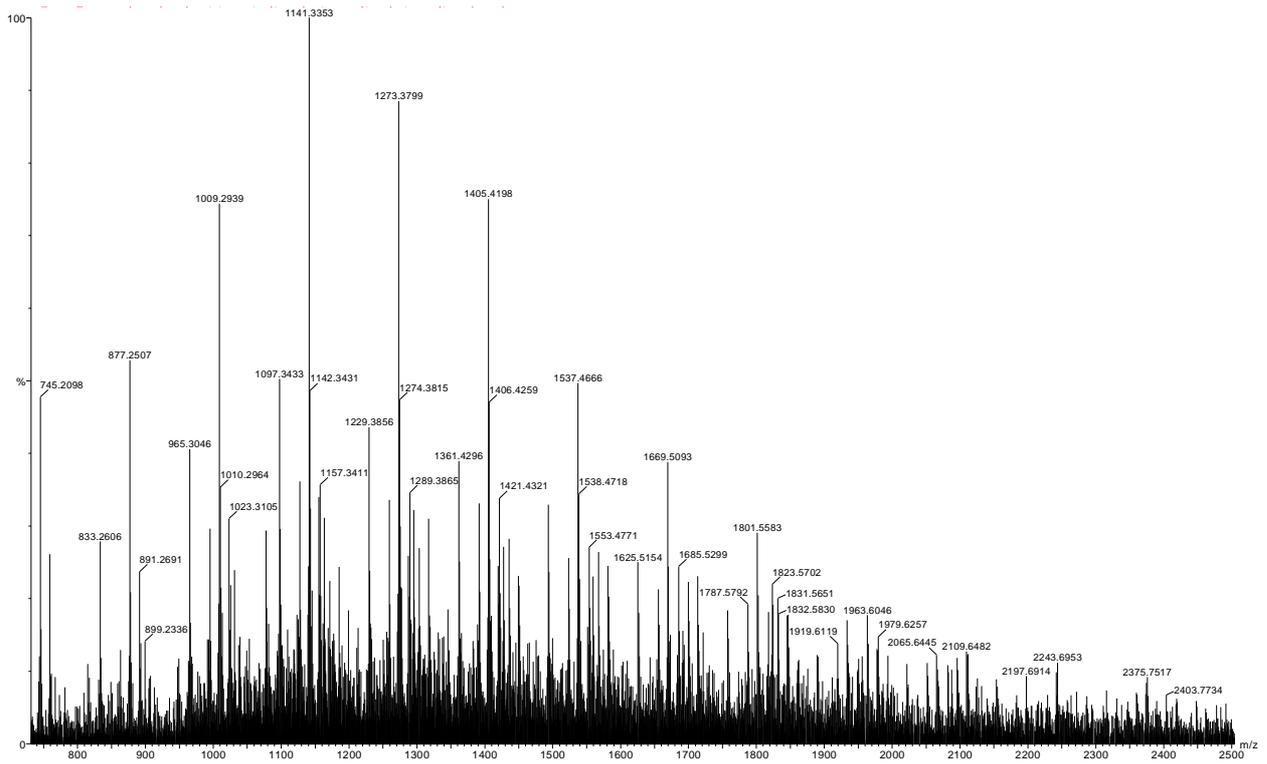


Figure 55 : Analyse par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF de la fraction AXOS 1.-2 issue de maïs.

Une analyse précise des masses des ions moléculaires de la famille des oligosaccharides à 5 résidus, **figure 56**, met en évidence l'existence de 6 espèces oligomériques :

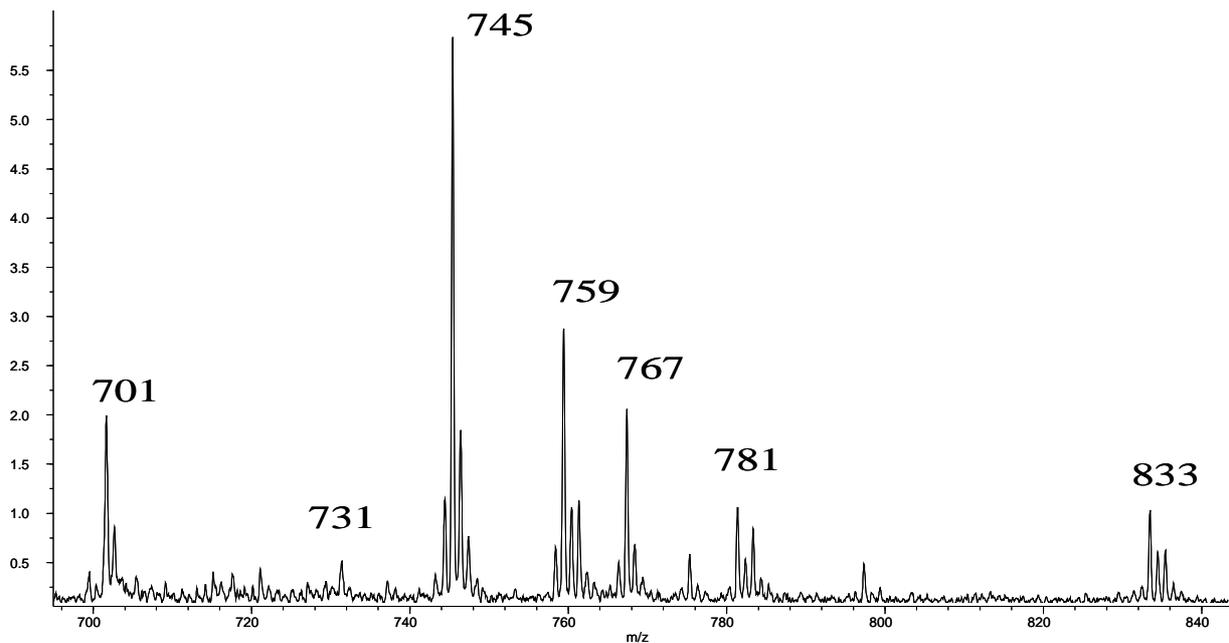


Figure 56 : Agrandissement du spectre de AXOS 1.-2 de maïs.

- Un oligopentose $M + Na^+ = 701$
- Un tétrapentose substitué hexose $M + Na^+ = 731$
- Un tétrapentose substitué acide uronique $M + Na^+ = 745$

Confirmé par $(M + 2Na - H)^+ = 767$; ion déjà mis en évidence par SCHOLS (2000) et REIS (2002).

- Un tétrapentose substitué par un acide 4-O-méthyl glucuronique $M + Na^+ = 759$

Confirmé par un ion $(M + 2Na - H)^+ = 781$

- Un tripentose substitué par 2 hexoses $M + Na^+ = 761$

Confirmé par un ion $(M + 2Na - H)^+ = 783$

- Un tripentose substitué par 1 hexose et 1 acide glucuronique $M + Na^+ = 775$

Confirmé par un ion $(M + 2Na - H)^+ = 797$.

Cette diversité structurale est la résultante de la complexité de la ramification du substrat ainsi que de la spécificité des hydrolases utilisées. Les 5 familles d'oligosaccharides identifiées par leurs ions caractéristiques, pour un nombre de résidus osidiques constitutifs donné, présentent des distributions relatives qui dépendent de la nature du substrat d'origine, **figure 57** :

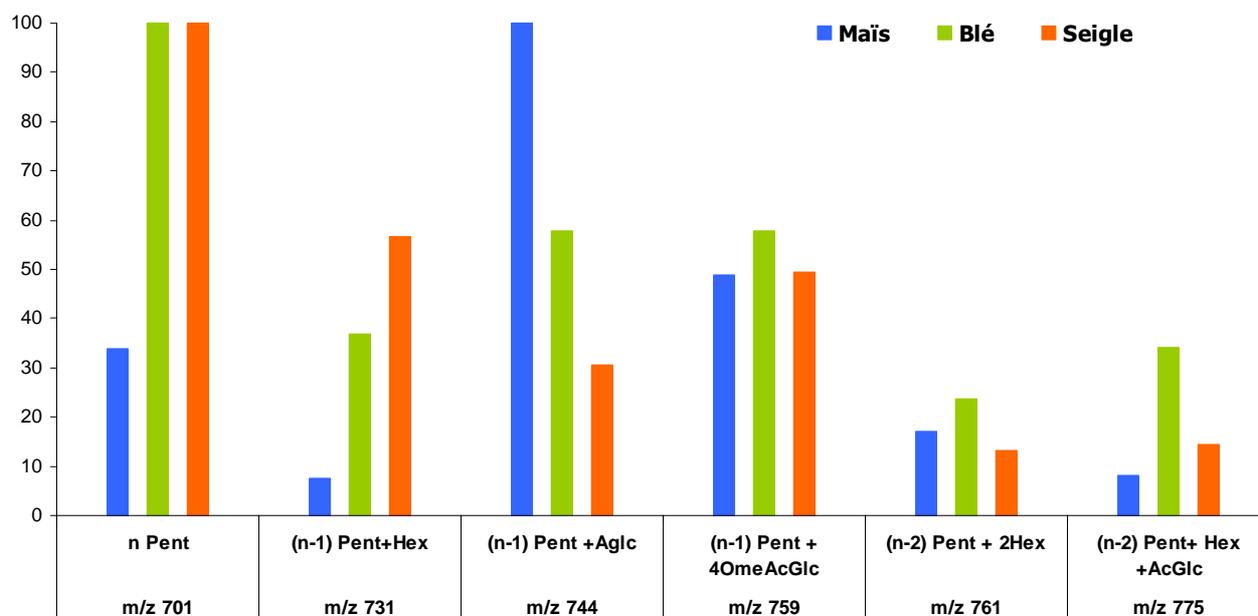


Figure 57 : Représentativité des ions caractéristiques de chaque famille d'oligomères en fonction de la nature des substrats d'origine.

Pour le blé et le seigle, l'ion de la forme oligopentose est toujours majoritaire, ce qui n'est pas observé pour le maïs, où celui de la forme des oligopentoses substitués acide uronique est prépondérant. De plus, quelle que soit l'origine des arabinoxyanes substrats, l'ion représentant les oligopentoses substitués galactose est toujours minoritaire. Toutefois, compte tenu des variations de rendement d'ionisation, les proportions relatives des ions moléculaires ne sont pas forcément représentatives des familles moléculaires qui leur sont associées.

La confirmation de la composition de ces différentes familles est établie sur la base des spectres de masse induits par collision des ions moléculaires de celles-ci. Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre de masse MALDI-QTOF en mode MS-MS. Un spectre caractéristique de filiation d'un heptapentose monosubstitué acide glucuronique, à m/z 1141, est présenté **figure 58**. Il apparaît des ions de fragmentations compétitives à $m/z = 965$ et $m/z = 1009$ correspondant respectivement à la perte d'un résidu acide glucuronique ou d'un résidu pentose, la première voie de fragmentation étant privilégiée. Les deux ions primaires, 965 et 1009, subissent à leur tour une cascade de fragmentations par perte de pentoses correspondant aux ions caractéristiques du spectre figure 58 :

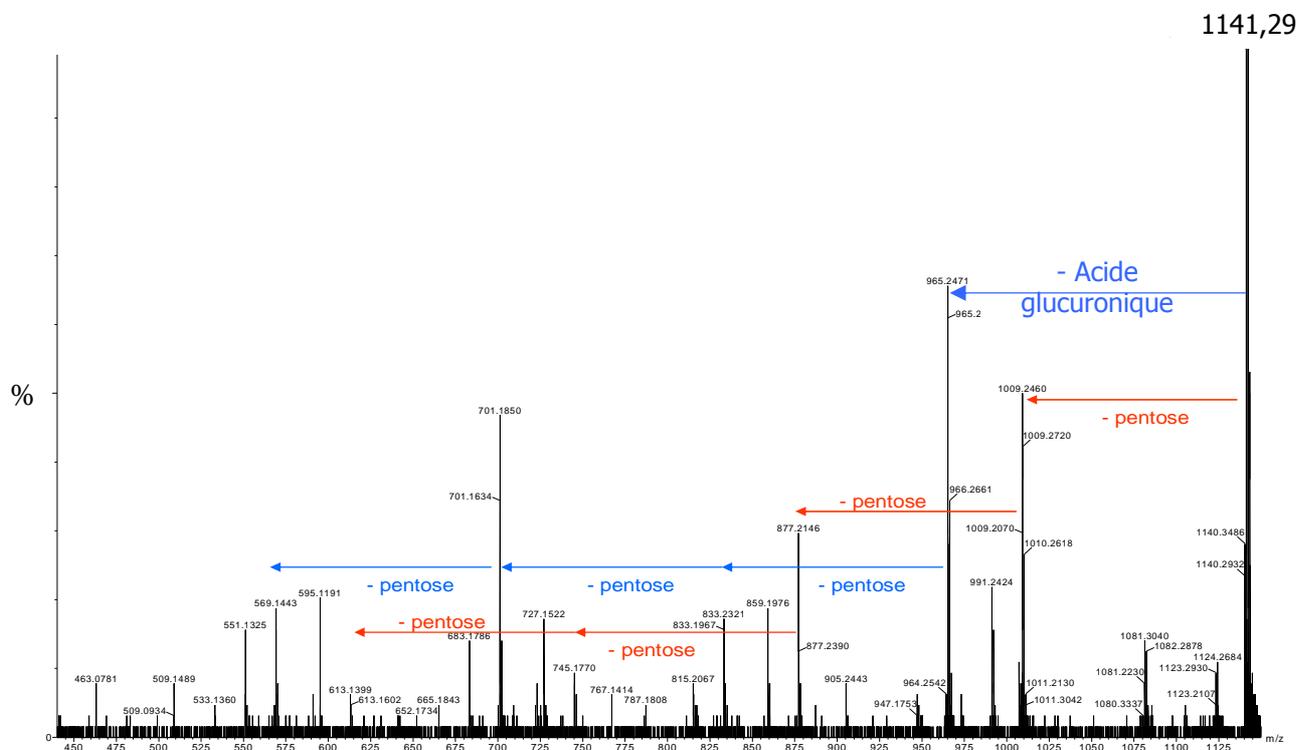
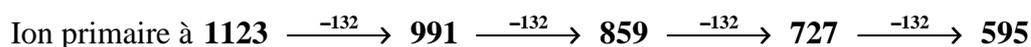
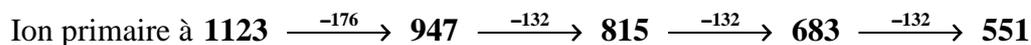


Figure 58 : Spectre de masse en mode MS-MS sur l'ion à m/z 1141 de la fraction de AXOS 1-2 issue de maïs.

Il apparaît également une voie de fragmentation secondaire par perte d'eau à partir de l'ion moléculaire à m/z 1141 donnant un ion à m/z 1123. A la suite de cette perte d'eau, on retrouve les deux voies de fragmentations compétitives précédemment citées, conduisant soit à la perte d'un résidu acide glucuronique (m/z 176) puis de pentoses, soit de résidu pentoses (m/z 132). Les ions engendrés par chacune des deux voies sont respectivement :



Ces mêmes analyses en mode MS-MS, ont été réalisées pour chacune des 5 familles d'oligosaccharides identifiées. Les résultats sont présentés en *annexe 7*. C'est ainsi que pour l'octapentose à m/z 1097, il n'est observé qu'une cascade de fragmentations résultant à chaque fois d'une perte de résidu pentose (*annexe 7*). Pour l'heptapentose substitué galactose, à m/z 1127, on constate 2 fragmentations primaires compétitives (voie 1 : perte galactose ou voie 2 : perte pentose) suivies de perte de pentoses (*annexe 7*).

Toutefois, malgré l'existence de ces nombreuses voies de fragmentation confirmant les compositions des familles moléculaires identifiées grâce aux spectres de masse obtenus en mode MALDI – TOF, il n'est pas possible de localiser les positions des substituants arabinose, galactose, acide glucuronique ou son dérivé, sur les chaînes d'oligoxyloses.

Pour les AXOS 1-3

D'un point de vue qualitatif, l'amplitude des distributions des masses moléculaires des AXOS 1-3, exprimée en nombre de résidus osidiques constitutifs, n, est comprise entre 2 et 4. L'analyse du spectre, en mode MALDI, **figure 59**, permet de caractériser deux familles moléculaires, dont l'une correspond à des oligopentoses et l'autre à des oligopentoses substitués hexose. Cette observation est valable quelle que soit l'origine des AXOS.

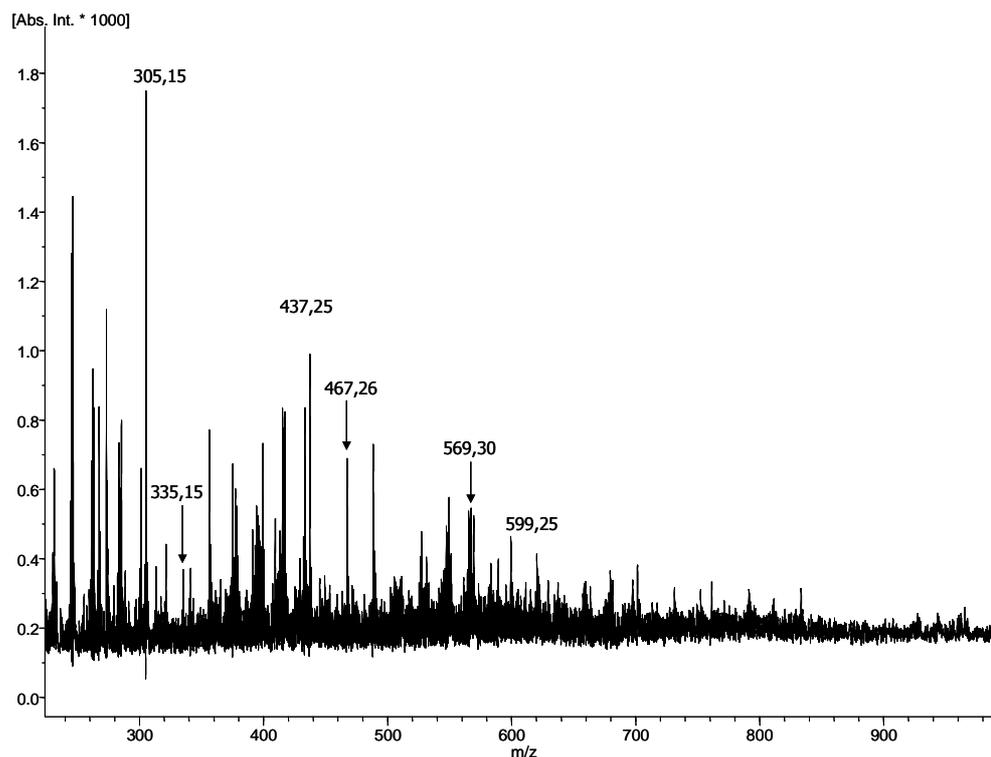


Figure 59 : Analyse par spectroscopie de masse en mode MALDI-TOF de la fraction AXOS 1-3 issue de blé.

Les espèces moléculaires identifiables dans chacune de deux familles sont indiquées dans le **tableau 38** suivant :

Tableau 38 : Espèces moléculaires présentes dans les AXOS 1-3.

Nombre de résidus osidiques	Familie oligopentose	Familie oligopentose substituée galactose	
		M+Na ⁺	M+Na ⁺ dont n' hexose
n	M+Na ⁺	M+Na ⁺	dont n' hexose
2	305	335	n' = 1
3	437	467	n' = 1
4	569	599	n' = 1

Les proportions relatives des ions pseudomoléculaires caractéristiques de chaque famille définie, varie en fonction de n. Lorsque n = 2, l'ion correspondant au dipentose est très majoritaire, pour n > 2 cette différence de représentativité est fortement atténuée. Ces différences ne sont

toutefois pas transposables aux espèces moléculaires associées, du fait de la méconnaissance des rendements d'ionisation.

II Analyse de la fraction AXOS 2

Du fait de la similitude entre les profils HPSEC des perméats de l'étape de diafiltration, AXOS 2, et ceux des fractions AXOS 1,3, riches en oligosaccharides de DP compris entre 2 et 4, on peut soupçonner la présence d'espèces moléculaires de masses voisines dans les deux fractions. En conséquence les perméats, AXOS 2, ont été expertisés afin d'évaluer leur intérêt pour les tests de mesure d'activité prébiotique à venir.

II 1 Analyse de la composition osidique par CPG/SM

Les résultats sont présentés dans la **figure 60** ci-après.

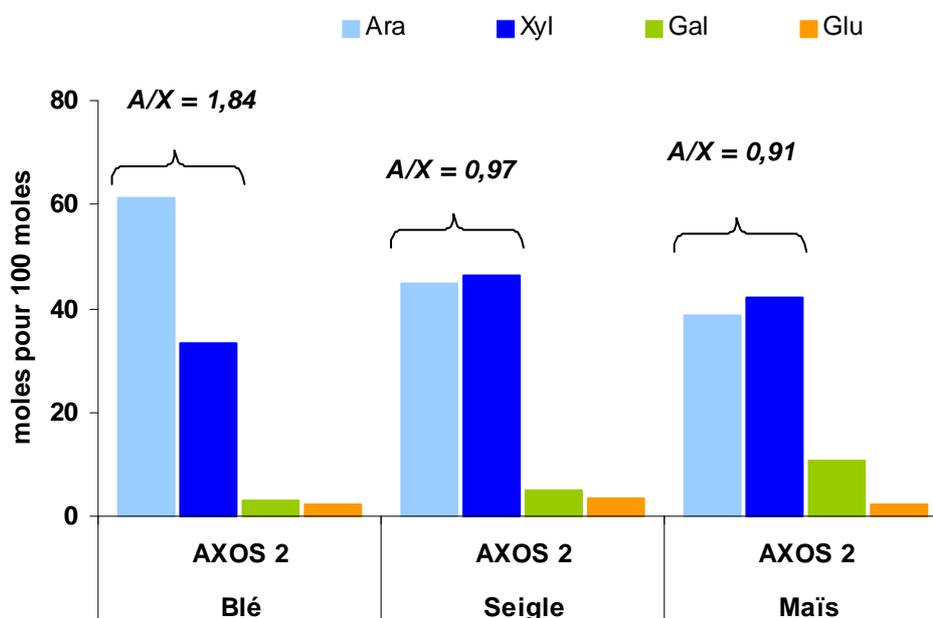


Figure 60 : Composition osidique des différentes fractions AXOS 2, exprimée en moles pour 100 moles d'oses.

La composition osidique des fractions AXOS 2 est caractérisée par un accroissement des rapports A/X d'un facteur 10 à 4, comparativement à ceux mesurés pour les AXOS 1, **figure 61** ci dessous. L'augmentation de ce rapport est liée à la présence d'arabinose à des concentrations élevées dans les perméats d'ultrafiltration. Cette observation confirme l'hypothèse émise au paragraphe I 1, concernant l'hydrolyse préférentielle des liaisons β 1-2 arabinose – xylose au cours de l'étape de traitement des AX_{purif} par le TFA.

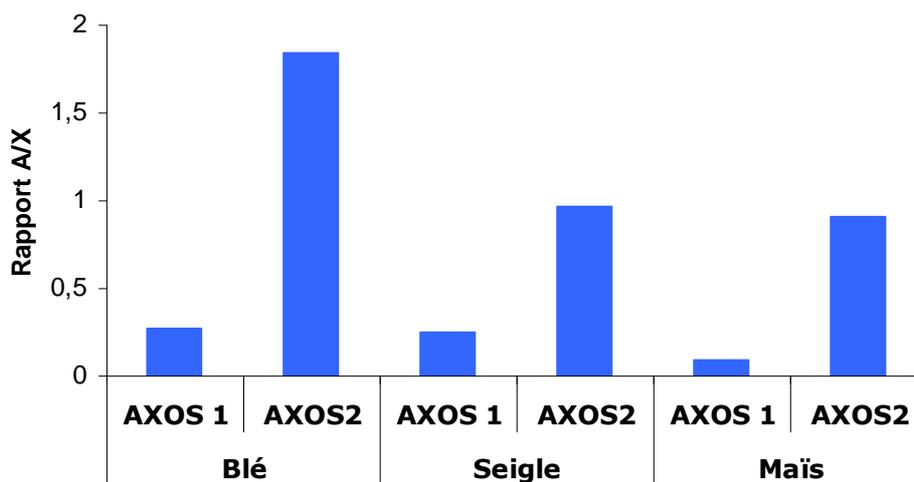


Figure 61 : Comparaison des rapport A/X dans les différentes fractions issues du processus d'hydrolyse des AX_{purif} de blé, de seigle ou d'AX_{com} de maïs.

Le rapport A/X des fractions AXOS 2 issues de l'hydrolyse chimique des arabinoxylyanes de blé est environ deux fois supérieur à ceux des perméats seigle et maïs. Cette observation peut être corrélée à l'existence de ramification de nature trimérique contenant 2 arabinoses et 1 xylose, mise en évidence par YAMADA (1994), dans le son de blé. Il n'est pas fait mention dans la littérature de la présence de telles ramifications dans les sons de seigle et de maïs.

II 2 Analyse de la distribution de tailles des AXOS 2

II 2 1 HPLC en phase normale

Les profils chromatographiques sont présentés **figure 62**, ainsi qu'en *annexe 9*. L'étalonnage permet d'identifier et de quantifier les présences majoritaires d'arabinose, xylose et xylobiose. Les

proportions relatives des trois oses majoritaires sont indiquées dans le **tableau 39** ci dessous pour chacune des céréales :

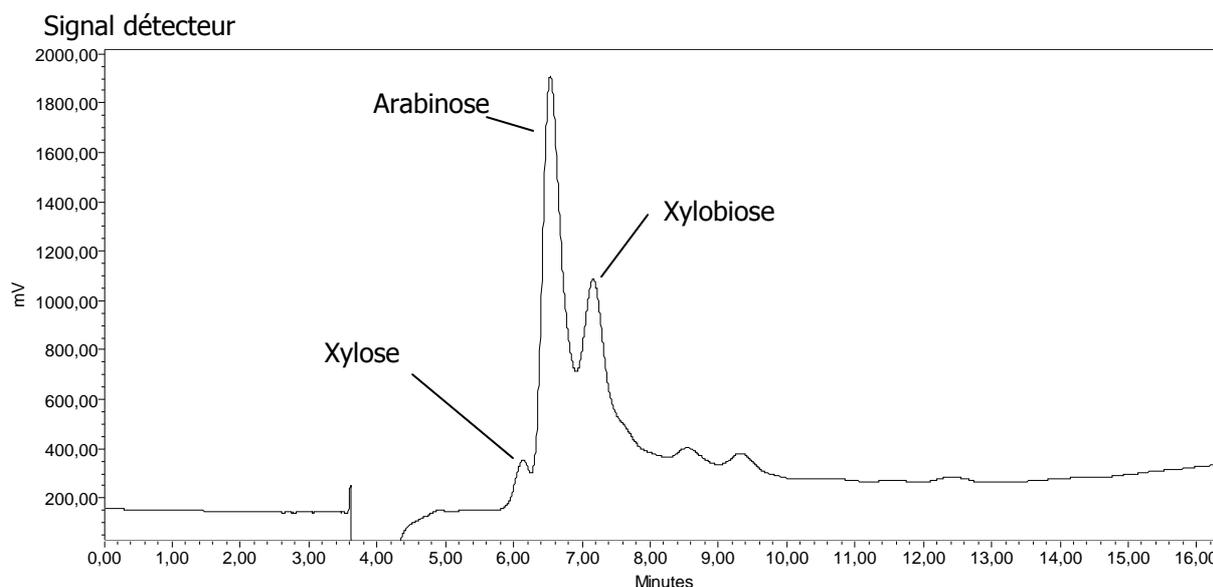


Figure 62 : Analyse de AXOS 2 de seigle par HPLC en phase normale sur gel de silice greffée amonipropyle et détection réfractométrique.

Tableau 39 : Proportions relatives des différents oses identifiés par HPLC en phase normale, exprimées en moles pour 100 moles d'oses identifiés.

Composition	AXOS 2 de blé	AXOS 2 de seigle	AXOS 2 de maïs
Arabinose	67,4	65,9	49,3
Xylose	2,9	3,3	12,9
Xylobiose	29,6	30,8	37,8

Les pourcentages molaires d'arabinose libre et de xylose libre ont été confirmés par GPG/SM, sans méthanolyse préalable des échantillons (résultats non présentés).

II 2 2 Spectrométrie de masse en mode electrospray ESI

Afin de s'affranchir de l'interférence des ions de matrice dans la zones des faibles masses moléculaires, propre au mode MALDI, les fractions AXOS 2 ont été analysées en mode ESI suivant les conditions décrites page 209 du chapitre Matériels et méthodes. Les spectres sont illustrés **figure 63** et en *annexe 8*. Il révèle la présence d'une famille homologue d'oligopentoses, constituée de 1 à

5 résidus identifiés par deux séries d'ions d'une part pour $M+NH_4^+$ à m/z 168, 300, 432, 564, 696 et d'autre part à m/z 150, 282, 414, 546 et 678 correspondant à une perte de H_2O des ions de la série précédente. L'analyse MS-MS par collision induite sur l'ion à m/z 282 fait apparaître une filiation par perte successive de 4 molécules d'eau (ion fils à m/z 264, 246, 228 et 210) confirmant la nature osidique de cet ion (*annexe 8*).

De façon très minoritaire, des ions caractéristiques d'une famille oligopentoses (de 1 à 3 résidus) substitués par un galactose à m/z 330, 462 et 594 correspondant à la forme $M+NH_4^+$ confirmés par des ions pseudomoléculaires, après perte d' H_2O à m/z 312, 444 et 576, sont détectés. Ces résultats sont comparables à ceux observés lors de l'analyse de la fraction AXOS 1₃ en mode MALDI.

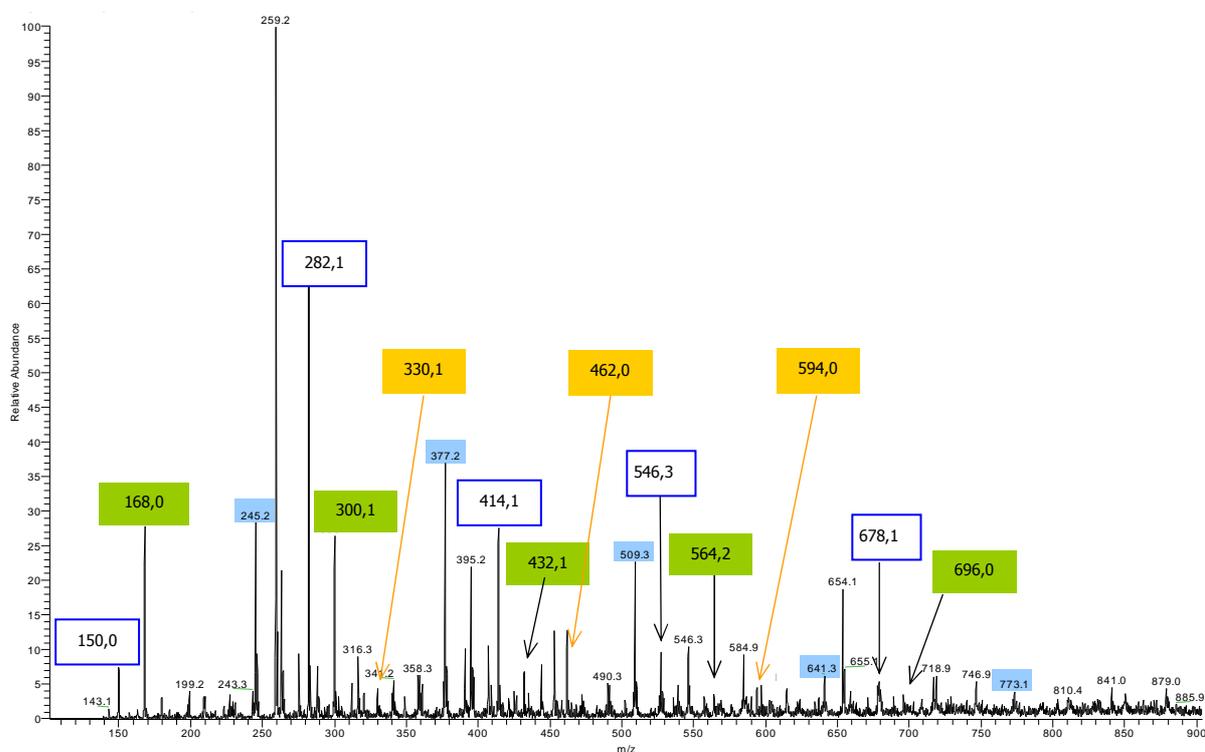


Figure 63 : Analyse d'AXOS 2 issu de maïs, par SM en mode ESI.

L'ion à m/z 377 semble appartenir à une série homologue de 5 résidus osidiques (m/z 245, 377, 509, 641, et 773) pouvant contenir 4 pentoses mais il n'est toutefois pas possible d'en confirmer la composition exacte. L'ion majeur du spectre à m/z 259, correspondant au pic de base du spectre subit une perte de 60 UMA correspondant très certainement à la double fragmentation interne d'un cycle osidique (DOMON 1988).

En guise de conclusion à ce chapitre, l'hydrolyse optimisée des arabinoxylanes de céréales conduit à l'obtention de deux fractions d'intérêt identifiées AXOS 1 et AXOS 2. Les principales caractéristiques en terme de taille et de nature des oligosaccharides constitutifs sont résumées dans le **tableau 40** ci-dessous :

Tableau 40 : Principales caractéristiques des fractions oligosaccharidiques retenues pour les tests d'activité biologique.

Caractéristiques	AXOS 1	AXOS 2
Distribution de tailles, exprimée en nombre de résidus osidiques n	$5 \leq n \leq 20$	$1 \leq n \leq 4$
<i>Oligomères majeurs</i>	$5 \leq n \leq 10$	
Nature des familles identifiées pour un nombre de résidus n donné	$(\text{Pent}^*)_n$ $(\text{Pent}^*)_{n-1}, (\text{Gal})_1$ $(\text{Pent}^*)_{n-1}, (\text{GlcA})_1$ $(\text{Pent}^*)_{n-1}, (4\text{-O-Me GlcA})_1$ $(\text{Pent}^*)_{n-2}, (\text{Gal})_2$ $(\text{Pent}^*)_{n-2}, (\text{Gal})_1,$ $(\text{GlcA})_1$	$(\text{Pent}^*)_n$ $(\text{Pent}^*)_{n-1}, (\text{Gal})_1$

*Pent : Xylose ou Arabinose

Il est reconnu que l'activité prébiotique d'un oligosaccharide est en partie déterminée par sa taille (DP 2 à 9, cf. Chapitre I). Nous constatons que les fractions AXOS 1 et AXOS 2 contiennent des espèces moléculaires de tailles comparables à celles existantes dans des mélanges de prébiotiques reconnus tels que les FOS de RP95. De ce fait AXOS 1 et AXOS 2 présentent un intérêt biologique potentiel dont l'expertise va faire l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE V

CARACTERISATION DE L'INTERET BIOLOGIQUE DES AXES DE SONS DE CEREALES

Parmi les différentes familles d'oligosaccharides reconnues aujourd'hui comme prébiotiques, présentées au chapitre I, les xylooligosaccharides (XOS) ont fait l'objet de plusieurs études, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les auteurs ont utilisé soit des préparations commerciales, telles que Xylooligosaccharides 70 de Suntory (Japon) soit des préparations obtenues au laboratoire par divers procédés et à partir de différents substrats végétaux. Le mélange Suntory a été testé par CRITTENDEN (2002) sur une grande variété de souches bactériennes, il s'est révélé efficace pour la croissance de certains *bifidobacterium* et *lactobacillus*. Ces résultats valident ceux obtenus antérieurement par OKAZAKI (1990) et JASKARI (1998) sur des XOS issus d'avoine. Par ailleurs, des essais réalisés sur fèces humains font apparaître une augmentation préférentielle du nombre de bifidobactéries lorsque des XOS sont utilisés comme seule source de carbone (RYCROFT 2001). *In vivo*, chez le rat, l'effet bifidogène des XOS a également été prouvé par CAMPBELL (1997). Les XOS stimulent encore mieux la croissance que les FOS.

Récemment, ZHANG (2005) a montré que la biomasse obtenue après 48h d'une culture de *Bifidobacterium adolescentis* augmente d'un facteur deux puis trois lorsque, respectivement, le xylobiose et le xylotriose remplacent le xylose comme seule source de carbone. Le même laboratoire (XU, 2001) avait déjà démontré que le xylobiose et le xylotriose étaient préférentiellement métabolisés par la même souche bactérienne lorsqu'ils étaient apportés dans un mélange plus complexe de XOS avec des DP supérieurs. Ces auteurs ont démontré la sécrétion d'enzymes extracellulaires qui dégraderaient les formes supérieures en oligomères de plus faible DP et permettraient ainsi aux XOS du mélange d'être fermentés.

Enfin KABEL (2002a) a étudié l'effet de différents AXOS, produits à partir d'eucalyptus, sur la vitesse de fermentation et la production d'acide gras à chaîne courte AGCC, lors de tests *in vitro* sur des inocula de fèces humains. Il a été constaté que les XOS non substitués et les AXOS étaient fermentés plus facilement que les AXOS acétylés ou porteurs de substituants hexose, acide glucuronique ou son dérivé 4-O-méthyle.

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats il nous est apparu opportun d'évaluer le caractère prébiotique de la fraction AXOS 1, dans un premier temps, sur deux souches probiotiques

reconnues et ayant déjà fait l'objet d'études : *Bifidobacterium longum* (CRITTENDEN 2002) et *Lactobacillus plantarum*.

La fraction AXOS 2, contenant non seulement des oses simples mais aussi des formes oligomériques de faible masse, tel que le xylobiose et peu substitués a également été testée et deux souches probiotiques supplémentaires, *Clostridium butyricum* et *Bacillus cereus*, ont été mises en œuvre pour caractériser leur activité.

I Choix des souches probiotiques cibles

Quatre souches probiotiques ont été sélectionnées pour étudier les propriétés prébiotiques potentielles des AXOS produits à partir des différents sons de céréales. La nature et l'origine des bactéries utilisées sont indiquées dans le **tableau 41** ci-dessous :

Tableau 41 : Identification des souches probiotiques sélectionnées

Identification de la souche probiotique	Produit probiotique d'origine et fournisseur
<i>Bacillus cereus</i>	Probiotique humain commercialisé au Vietnam
<i>Clostridium butyricum</i>	Probiotique humain commercialisé sous la référence Biobaby, Ildong Pharm Co LTD, Corée
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	Probiotique humain commercialisé par Probi AB, Suède
<i>Bifidobacterium longum</i>	Souche isolée d'intestin humain, CIP 64.62, Institut Pasteur, France

Nous avons choisi de tester des microorganismes aéroanaérobis pour les uns et anaérobis strict pour les autres, appartenant à des genres qui sont des commensaux du tractus intestinal :

- *Bifidobacterium longum*, bactérie anaérobie stricte qui peut représenter jusqu'à 90% de la flore microbienne au niveau du côlon (BALLONGUE, 1993). Parmi les différentes espèces de bifidobactéries, *Bifidobacterium longum*, est celle qui a déjà été identifiée par CRITTENDEN (2002) comme étant apte à fermenter des XOS.
- Le choix de *Clostridium butyricum*, bactérie également anaérobie stricte, est lié à la capacité de la bactérie de produire d'importantes quantités d'acide butyrique au cours de sa

croissance. Cet acide gras à chaîne courte, AGCC, peut induire plusieurs effets bénéfiques au niveau du côlon, comme en atteste les observations de FOOKS (1999) notamment.

- Les souches probiotiques *Lactobacillus plantarum* et *Bacillus cereus*, microorganismes respectivement aéroanaérobie et aérobie tolérant, ont été mis à disposition par le Laboratoire de Microbiologie et Biochimie Appliquée, LMBA, de l'ENITA de Bordeaux. Ces deux souches font l'objet d'une étude concernant l'identification d'entités moléculaires présentes à leur surface et impliquées dans l'interaction avec l'hôte. Ce travail est conduit dans le cadre d'une collaboration LMBA/IECB/LCSN. La relation bactérie/hôte est abordée au travers de tests d'adhésion *in vitro* sur différentes cibles telles que les protéines de la matrice extracellulaire, la mucine gastrique ou bien des lignées de cellules épithéliales intestinales. L'étude de l'effet d'oligosaccharides prébiotiques potentiels sur ces deux souches, peut présenter un intérêt en relation directe avec leur capacité d'adhésion *in vitro*. En effet, des travaux récents, réalisés sur des souches probiotiques *Lactobacillus reuteri* (JONSSON 2001) ont montré que les conditions de culture et notamment l'addition de glycoprotéines ou de substances glucidiques, pouvait affecter de façon bénéfique la capacité d'adhésion de la bactérie.

II Contrôle des effets des oligosaccharides sur les souches probiotiques

L'effet de l'addition d'oligosaccharides dans le milieu de culture d'une souche probiotique est quantifié en suivant d'une part la croissance du microorganisme et sa capacité à produire des AGCC d'autre part. Pour l'une des 4 souches testées, *Bacillus cereus*, nous avons également suivi la sporulation.

L'évolution de la population bactérienne, au cours de la croissance, est estimée par mesure d'absorbance à 570 ou 600nm dans les conditions définies page 215 du chapitre Matériels et Méthodes, pour chaque souche testée. La corrélation entre l'absorbance à 570 ou 600nm et le nombre de bactérie présentes dans le milieu de culture, exprimé en UFC.mL⁻¹, est établie à l'aide d'une courbe étalon $DO = f(\text{UFC.mL}^{-1})$ pour chaque souche.

Le dosage des AGCC au cours de la croissance bactérienne, peut être réalisé par CPG, après une extraction à l'éther diéthylique des acides gras présents dans le milieu de culture, suivi d'une dérivation au N-(tert-butyldiméthylsilyl)-N-méthyltrifluoroacétamide ou MTBSTFA, contenant 1% de TBDMCS selon la méthode de SCHOOLEY (1985) ou bien par HPLC sur colonne Aminex HPX87-H (Biorad) selon MORALES (1998). Les deux méthodes ont été mises en œuvre dans le cadre de notre étude. La technique CPG a été rapidement abandonnée au profit de la méthode HPLC du fait des faibles rendements d'extraction par l'éther des AGCC des milieux de culture. Les conditions opératoires pour le dosage des acides gras à chaîne courte par HPLC sont indiquées pages 211-213 du chapitre Matériels et Méthodes. La colonne Aminex HPX 87-H est étalonnée à l'aide d'acides, acétique, propionique, butyrique, valérique et 3-méthyl valérique, ce dernier servant d'étalon interne et enfin avec l'acide lactique. Les droites d'étalonnages relatives à chaque AGCC sont présentées figure 77, page 213 du chapitre Matériels et méthodes. Cette technique chromatographique permet de nous affranchir de l'étape limitante d'extraction des acides gras par solvant. L'échantillon de surnageant de culture subit seulement une dilution au dixième dans H₂SO₄ 5mM, puis une clarification par centrifugation avant d'être injecté sur la colonne chromatographique.

Le contrôle de la sporulation n'a été réalisé que pour la souche *Bacillus cereus*. Les spores sont dénombrées après coloration de Gram et observation microscopique. Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries sporulées pour 100 bactéries dénombrées (formes sporulées + formes végétatives).

III Etude des effets des AXOS sur les souches probiotiques sélectionnées

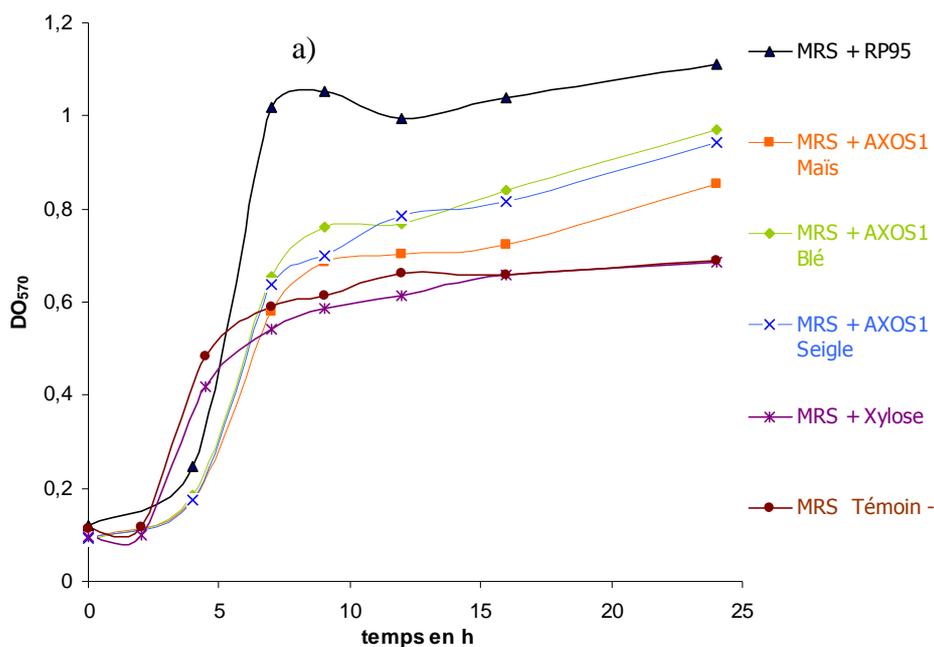
Les conditions de culture propres à chaque souche bactérienne sont indiquées page 215 chapitre Matériels et Méthodes. Afin de comparer l'intérêt des arabinoxyloligosaccharides à celui d'un mélange prébiotique de référence, des essais de croissance sont réalisés pour chaque souche en présence du cocktail de fructooligosaccharides RP 95. Pour s'affranchir de l'interférence possible, lors des tests de croissance, des monosaccharides xylose et arabinose présents dans les fractions AXOS 1 et AXOS 2, des essais témoins sont réalisés sur des milieux de culture où la source

carbonée est apportée sous forme de xylose ou d'arabinose. Enfin, pour valider les conditions de culture propre à chaque souche, leur croissance est testée d'une part sur un milieu où le glucose constitue la source carbonée (témoin positif) et d'autre part sur milieu sans apport complémentaire de source carbonée glucidique (témoin négatif).

III 1 Essais sur *Lactobacillus plantarum* 299v

Les résultats des tests de croissance sont présentés **figures 64a, 64b et 65**.

On observe une parfaite corrélation entre l'absorbance mesurée à 570nm et la concentration bactérienne exprimée en UFC.mL⁻¹ (figure 57a et 57b). Les AXOS 1 issus de blé, de seigle et de maïs dans une moindre mesure, engendrent une amélioration de la croissance de *Lactobacillus plantarum* comparativement aux témoins milieu de culture sans addition d'ose ou avec addition de xylose (57a, 57b). Bien que l'effet observé soit inférieur à celui produit par le mélange de FOS de référence RP95, l'amélioration de la croissance de *Lactobacillus plantarum*, constatée en présence des fractions AXOS 1 doit être considérée comme significative et traduisant un effet prébiotique des arabinoxyloligosaccharides, si l'on se réfère aux travaux de CRITTENDEN (2002). Les auteurs attribuent un caractère prébiotique à la préparation oligosaccharidique testée dès lors que celle-ci engendre un accroissement de 0,1 DO, après 18h de culture, comparativement aux valeurs mesurées sur témoin négatif (milieu de culture sans addition d'ose).



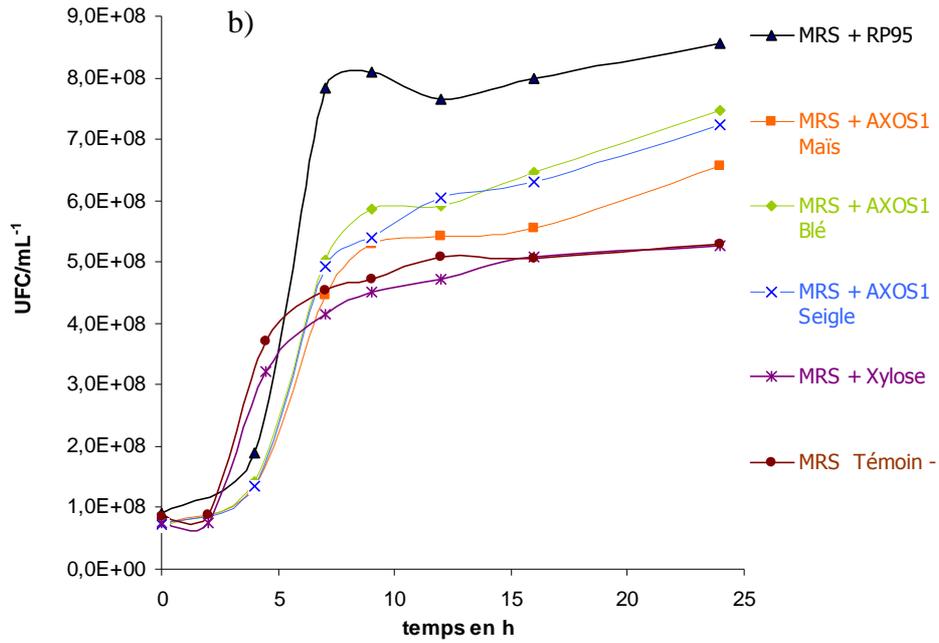


Figure 64 : Courbes de croissances de *Lactobacillus plantarum* 299v sur milieu de culture MRS complémenté par différentes sources carbonées :
a) suivi estimé par mesure de DO à 570nm,
b) suivi estimé par dénombrement des bactéries.

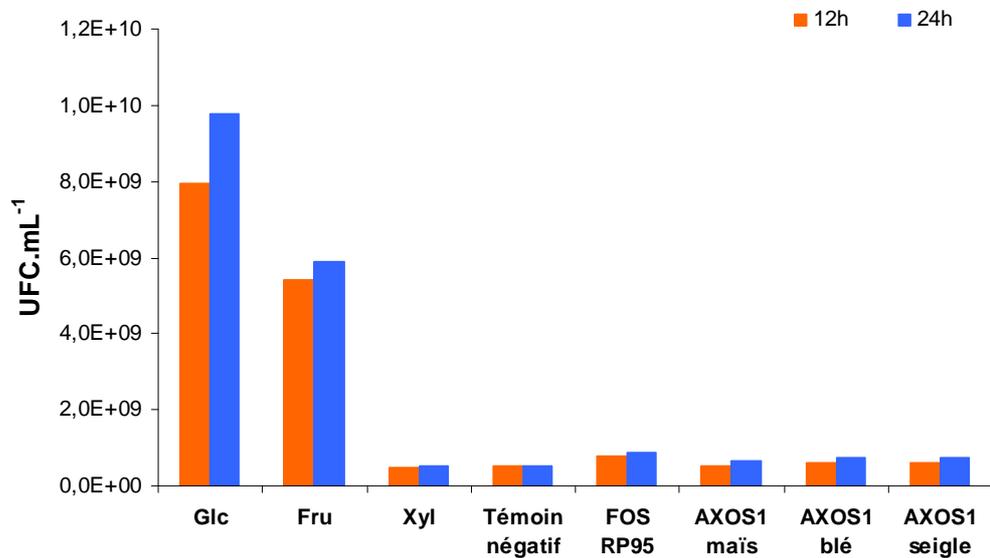


Figure 65 : Croissance de *Lactobacillus plantarum*, après 12 et 24h de culture en milieu MRS complémenté par différentes sources carbonées, exprimées en UFC.mL⁻¹ de milieu de culture.

Bien que la croissance de la souche soit supérieure d'un facteur 10 en présence de glucose ou de fructose, figure 65, en aucun cas nous ne devons comparer l'effet des AXOS ou des FOS à ceux des deux monosaccharides cités. En effet, le glucose ou le fructose ne peuvent être considérés comme des prébiotiques du fait de leur absorption précoce au niveau intestinal et par conséquent de leur indisponibilité pour stimuler la croissance de la flore endogène au niveau du côlon principalement.

L'acide lactique et les acides gras ont été dosés au cours de chaque essai de croissance après 24h de culture. Les résultats sont illustrés **figure 66**.

L'absence de production d'acide lactique et l'apparition d'acide acétique dans les milieux de culture contenant les AXOS 1 ou les FOS, révèlent les perturbations métaboliques consécutives au changement de source carbonée.

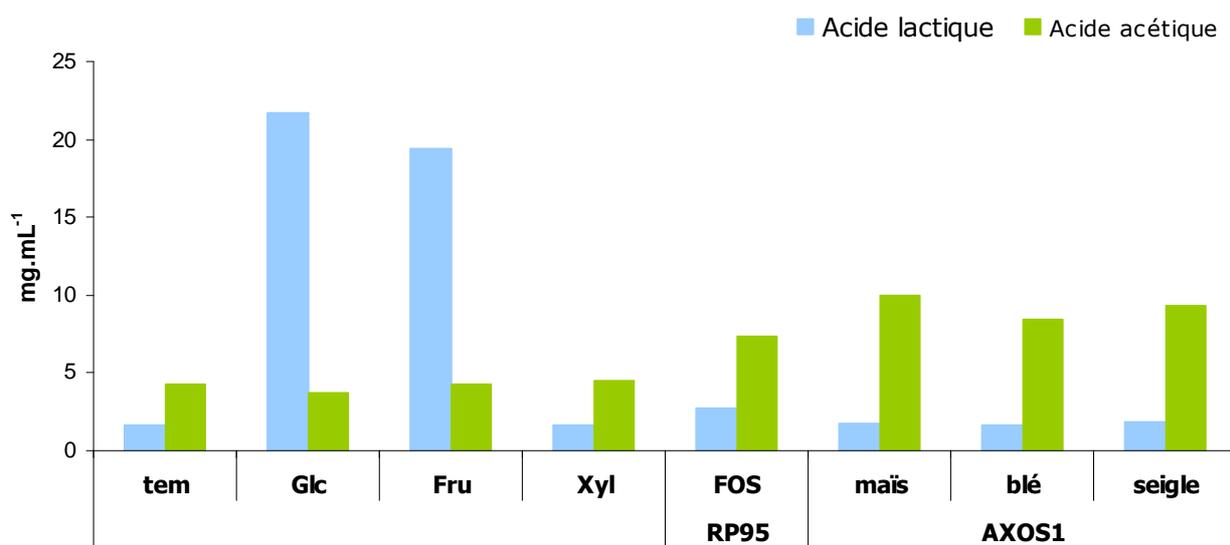


Figure 66 : Dosage de l'acide lactique et des acides gras à chaîne courte, après 24h de culture de *Lactobacillus plantarum* sur milieu MRS complétement par différentes sources carbonée.

III 2 Essais sur *Bifidobacterium longum*

Parmi les oligosaccharides testés, les AXOS 2, après 22h de culture, induisent un effet positif sur la croissance de *Bifidobacterium longum* comparable à celui observé pour les FOS de référence RP95, **figure 67** :

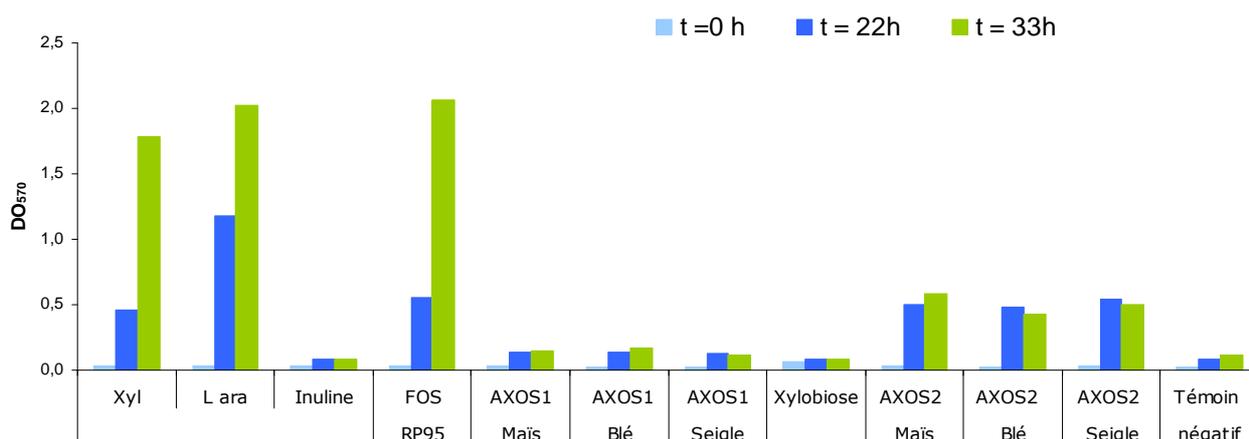


Figure 67 : Croissance de *Bifidobacterium longum*, après 22 et 33h de culture sur milieu M20 complémenté par différentes sources carbonées.

Après 33h de culture la bactérie continue de croître, seulement sur les milieux complémentés en xylose, arabinose ou FOS RP95.

Les fractions AXOS 2 stimulent de manière significative, si l'on se réfère aux observations de CRITTENDEN (2002), la croissance de *Bifidobacterium longum*. En effet, les augmentations d'absorbance après 22 et 33h de culture sont supérieures d'environ 0,35 unité à celles mesurées pour le témoin négatif. Cet accroissement de DO n'est pas observé pour les fractions AXOS 1. La présence des substituants galactose ou acide glucuronique sur les chaînes d'oligopentoses constituant cette fraction sont probablement à l'origine de l'absence ou de la très faible dégradation des AXOS 1 par l'équipement enzymatique de ces bactéries.

Toutefois l'effet des AXOS 2 peut être en partie attribué à l'arabinose libre présent dans ces fractions, où il constitue 35 à 40% des oses totaux. La comparaison des absorbances à 570nm atteintes après 22h de culture dans les essais arabinose et AXOS 2 (figure 67), où le monosaccharide est aux concentrations respectives de $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $1,8$ à $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ confirme cette hypothèse. Ce constat montre combien il est important d'établir une caractérisation approfondie des mélanges oligosaccharidiques avant d'en évaluer les potentialités prébiotiques, ceci afin d'éviter des interprétations hasardeuses ou erronées. La stabilité de la DO à 570nm et de la population bactérienne dans les essais de culture sur AXOS 2, non observée lors de la croissance sur arabinose, xylose ou FOS, peut traduire une atteinte de la phase stationnaire plus précoce. Des mesures complémentaires de la concentration bactérienne au-delà de 33h seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Il est à noter que le xylobiose, autre glucide majoritaire des AXOS 2 n'engendre aucune amélioration de la croissance de la bactérie comparativement au témoin négatif.

CRITTENDEN avait constaté que deux des trois souches de *Bifidobacterium longum* testées utilisaient le mélange prébiotique Suntory 70 composé de xylooligosaccharides de DP compris entre 2 et 5, donc contenant du xylobiose. Mais le mélange commercial contient aussi environ 30% de xylose qui, d'après nos résultats est utilisé par *Bifidobacterium longum*. Notre observation montre que l'effet prébiotique d'un oligosaccharide, ici le xylobiose est très dépendant de l'espèce pour un genre donné. En effet ce disaccharide stimule la croissance de *Bifidobacterium adolescentis* (ZHANG 2005) et ne produit aucun effet sur celle de *Bifidobacterium longum*.

La comparaison des concentrations bactériennes dans les essais inuline (polymère de fructose) et FOS RP95 illustre bien l'importance du critère DP dans l'effet prébiotique des oligosaccharides. Ici, la forme polymérique n'induit aucune stimulation de la croissance. Ceci est en accord avec certains résultats de la littérature (ROSSI 2005).

La production de AGCC, après 24h ou 33h de culture a été mesurée pour chaque essai de croissance. Aucune variation significative des concentrations des acides gras à chaîne courte dosés n'est observée et ceci quelle que soit la nature de la source carbonée mise en œuvre.

III 3 Essais sur *Clostridium butyricum*

La bactérie probiotique anaérobie stricte a été cultivée en présence des différentes sources d'AXOS, de monosaccharides et de FOS. La croissance est évaluée après 24h, 32h, 48h et 56h de culture, exclusivement par des mesures d'absorbance à 570nm et ceci pour des raisons pratiques. En effet, le dénombrement des bactéries par comptage sur boîte de Pétri est rendu très délicat du fait de la très grande sensibilité de cette espèce aux traces d'oxygène. Les résultats sont présentés **figure 68** :

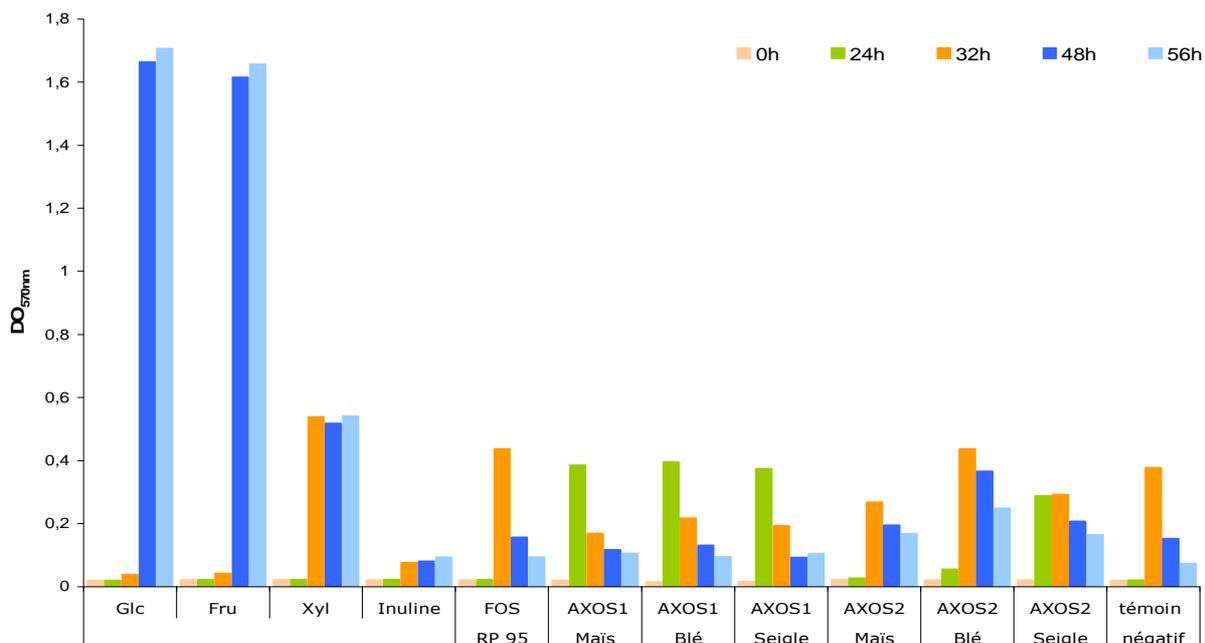


Figure 68 : Croissance de *Clostridium butyricum* après 24, 32, 48 et 56h de culture en milieu TS supplémenté par différentes sources carbonées, exprimée en DO mesurée à 570nm.

L'évolution de l'absorbance en fonction de la durée de culture est différente lorsque la source carbonée est un monosaccharide (Glc, Fru, Xyl) ou un mélange d'oligosaccharides (AXOS 1, AXOS 2 et RP95). Avec le glucose et le fructose, la croissance n'est effective qu'à partir de 48h et la population bactérienne, traduite par la DO à 570nm, reste constante jusqu'à 56h. Dans le cas des AXOS, FOS, et du témoin négatif sans addition d'ose, le démarrage de la culture semble plus précoce, entre 24 et 32h, puis on observe une chute de la DO entre 48 et 56h. Parallèlement aux mesures d'absorbance, des observations microscopiques ont été réalisées à différents stades de la culture et pour différents substrats osidiques. Les photographies sont présentées **figure 69**. Lorsque *Clostridium butyricum* est cultivé sur un milieu où la source carbonée est un mélange d'oligosaccharides, sa morphologie est modifiée au cours des 30 premières heures de culture. La bactérie prend tout d'abord un aspect très filiforme, puis au delà de 48h, la bactérie retrouve sa morphologie classique en bâtonnet. Cela n'est pas observé si la culture est réalisée sur glucose ou xylose.

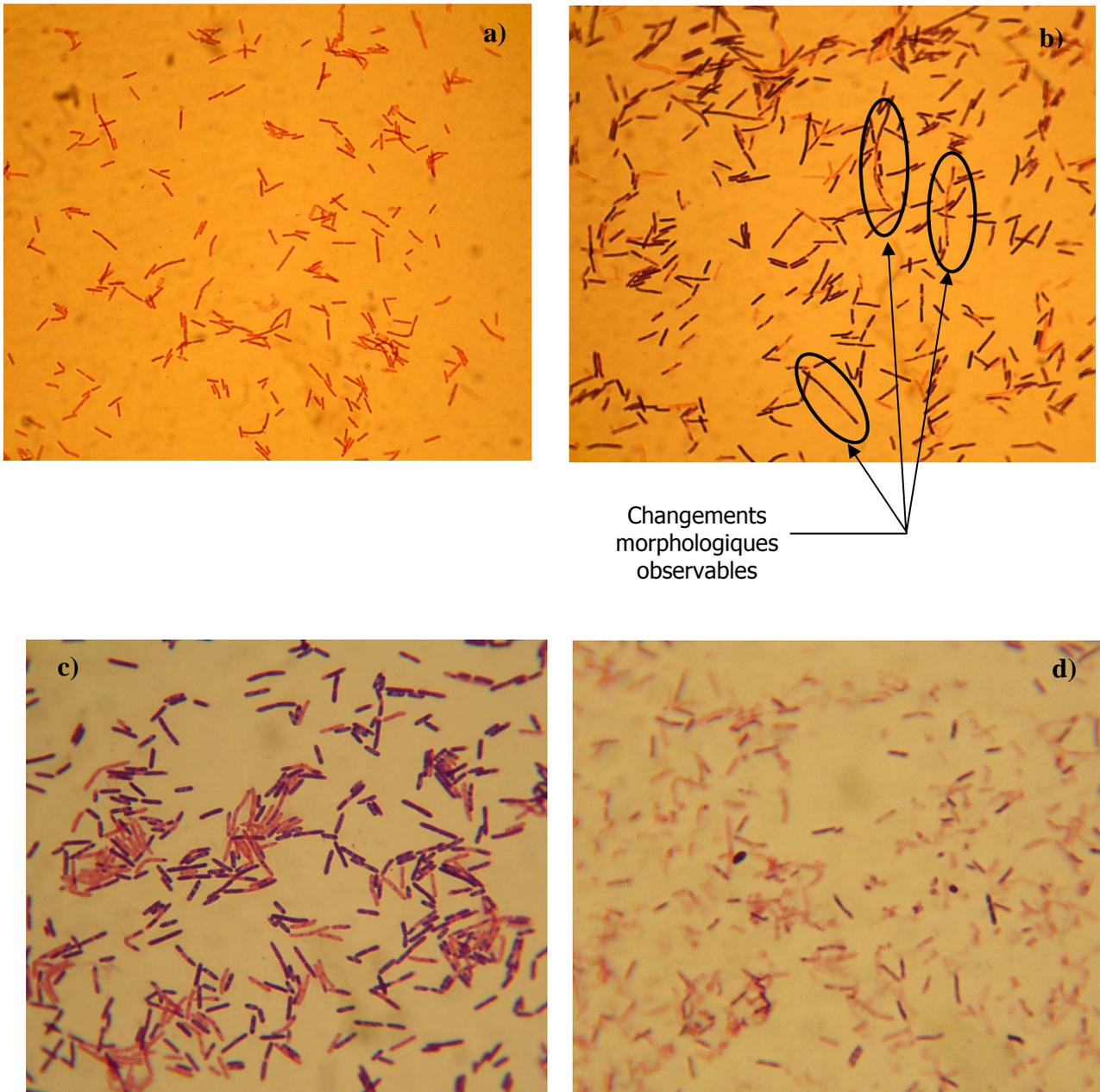


Figure 69 : Photographies de *Clostridium butyricum* dans différentes conditions de culture, après coloration de Gram.

- a) Préculture de *Clostridium butyricum* sur milieu TS standard,**
- b) Culture de 24h de *Clostridium butyricum* sur TS avec AXOS 1 de blé,**
- c) Culture de 24h *Clostridium butyricum* sur TS complété par Glc,**
- d) Culture de 48h *Clostridium butyricum* sur TS avec AXOS 1 de blé**

Compte tenu du fait que la croissance de *Clostridium butyricum* est suivie exclusivement par mesure d'absorbance à 570nm, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle les modifications morphologiques de la bactérie sont, en partie, à l'origine des variations de DO observées au cours des 30 premières heures de culture. En effet, l'absorption et la diffusion de la lumière par la suspension bactérienne étudiée, dépendent étroitement de la forme des particules en suspension et de leur éventuelle capacité à former des agrégats. Toutefois, même si l'interprétation des résultats de croissance est rendue difficile, on observe qu'après 48 et 56h l'absorbance des cultures en présence des AXOS 2 est significativement supérieure de 0,1 à 0,15 unité à celles du témoin négatif, des FOS RP 95 et des AXOS 1. La faible concentration en xylose dans les fractions AXOS 2 estimée à 0.15mg.mL^{-1} , soit 3% pds/pds des oses totaux, ne peut être responsable de l'effet positif sur la croissance induit par les arabinoxylooligosaccharides de faible DP.

La fraction AXOS 2, issue de blé, stimule également la production d'acide butyrique, **figure 70** :

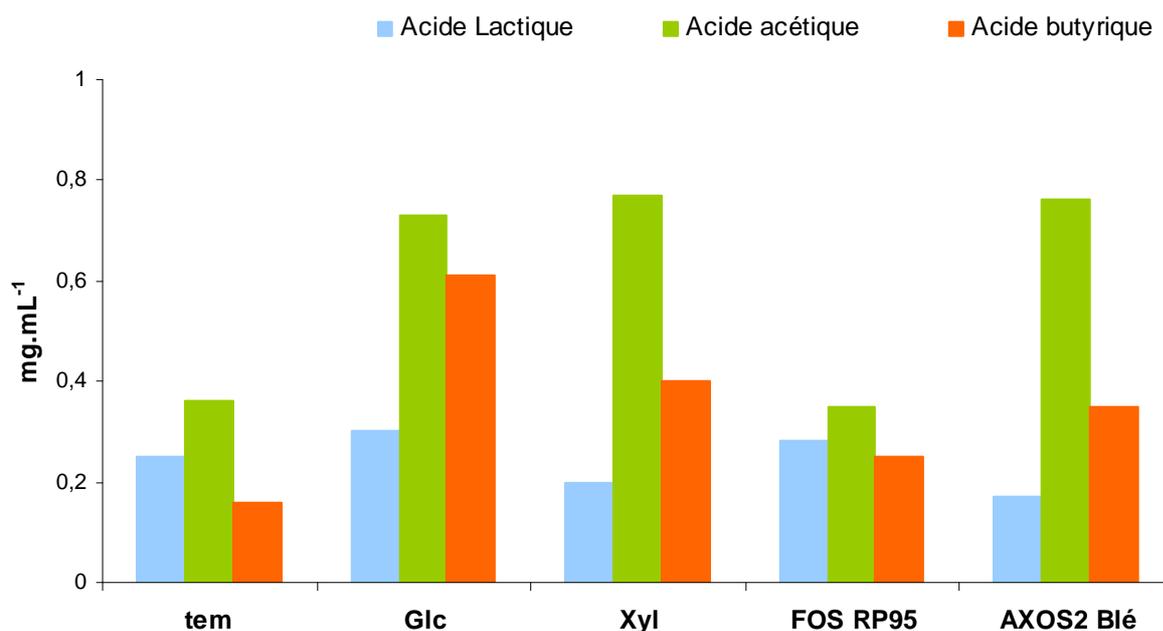


Figure 70 : Dosage de l'acide lactique, et des acides gras à chaîne courte après 48h de culture de *Clostridium butyricum* sur milieu TS complétement par différentes sources carbonées.

La concentration de cet acide gras, dans le milieu après 48h est multipliée par un facteur 2,2 et 1,4 respectivement par rapport au témoin négatif et au FOS RP95. L'effet des fractions AXOS 2 de

maïs et de seigle n'a pas été mesuré. L'accroissement de la concentration en acide acétique, induit par les AXOS 2 de blé, est comparable à celui observés avec le glucose et le xylose.

La production de butyrate en présence d'AXOS 2 n'est pas attribuable au xylose libre dans cette fraction oligosaccharidique, où il représente seulement 3% des oses totaux. Par contre l'arabinose, un des constituants majoritaires des AXOS 2 (35 à 40% des oses totaux), qui est métabolisé par *Clostridium butyricum* (annexe 10) peut être à l'origine de l'accroissement de la concentration en butyrate. Des essais complémentaires de croissance de la bactérie sur arabinose et également sur xylobiose, autre constituant majoritaire des AXOS 2, seront nécessaires pour attribuer la production de butyrate à une source carbonée particulière.

III 4 Essais sur *Bacillus cereus*

Au cours de cette dernière série d'essais, nous avons exclu les fractions AXOS 1 qui se sont révélées sans effet sur la croissance des deux précédentes souches probiotiques. Les cultures ont été mises en œuvre sur deux milieux de base : Mueller-Hinton (MH) avec amidon et sans amidon. La composition de ces deux milieux est indiquées page 216 chapitre Matériels et Méthodes. Ceux ci peuvent être complétés en sources carbonées de type monosaccharides, FOS ou AXOS 2 aux concentrations indiquées dans le **tableau 42** ci-dessous :

Tableau 42 : Nature et concentrations des sources carbonées additionnées au milieu MH pour la culture de *Bacillus cereus*.

Essai	Milieu de culture testé	Nature et concentration de la source carbonée additionnée en g.L-1
1 et 8		Sans addition d'ose
2 et 9		Arabinose* : 1g.L-1
3 et 10		Xylose* : 0,2g.L-1
4 et 11	MH avec amidon et sans amidon	FOS RP95 : 3g.L-1
5 et 12		AXOS 2 blé : 3g.L-1
6 et 13		AXOS 2 seigle : 3g.L-1
7 et 14		AXOS 2 maïs : 3g.L-1

* :Les concentrations de ces deux monosaccharides dans le milieu de culture sont définies sur la base de notre connaissance des proportions de ces mêmes oses dans les fractions AXOS 2.

Les essais numérotés de 1 à 7 correspondent aux tests de culture en présence d'amidon, ceux notés de 8 à 14 sont réalisés avec un milieu MH sans amidon.

L'évolution de la population bactérienne est suivie par mesure de DO à 600nm ainsi que par un dénombrement des colonies. Les cinétiques de croissance de *Bacillus cereus*, dans ces différentes conditions expérimentales sont présentées figures 71a, 71b, pour le suivi en DO à 600nm, 72a et 72b pour le suivi en UFC.mL⁻¹.

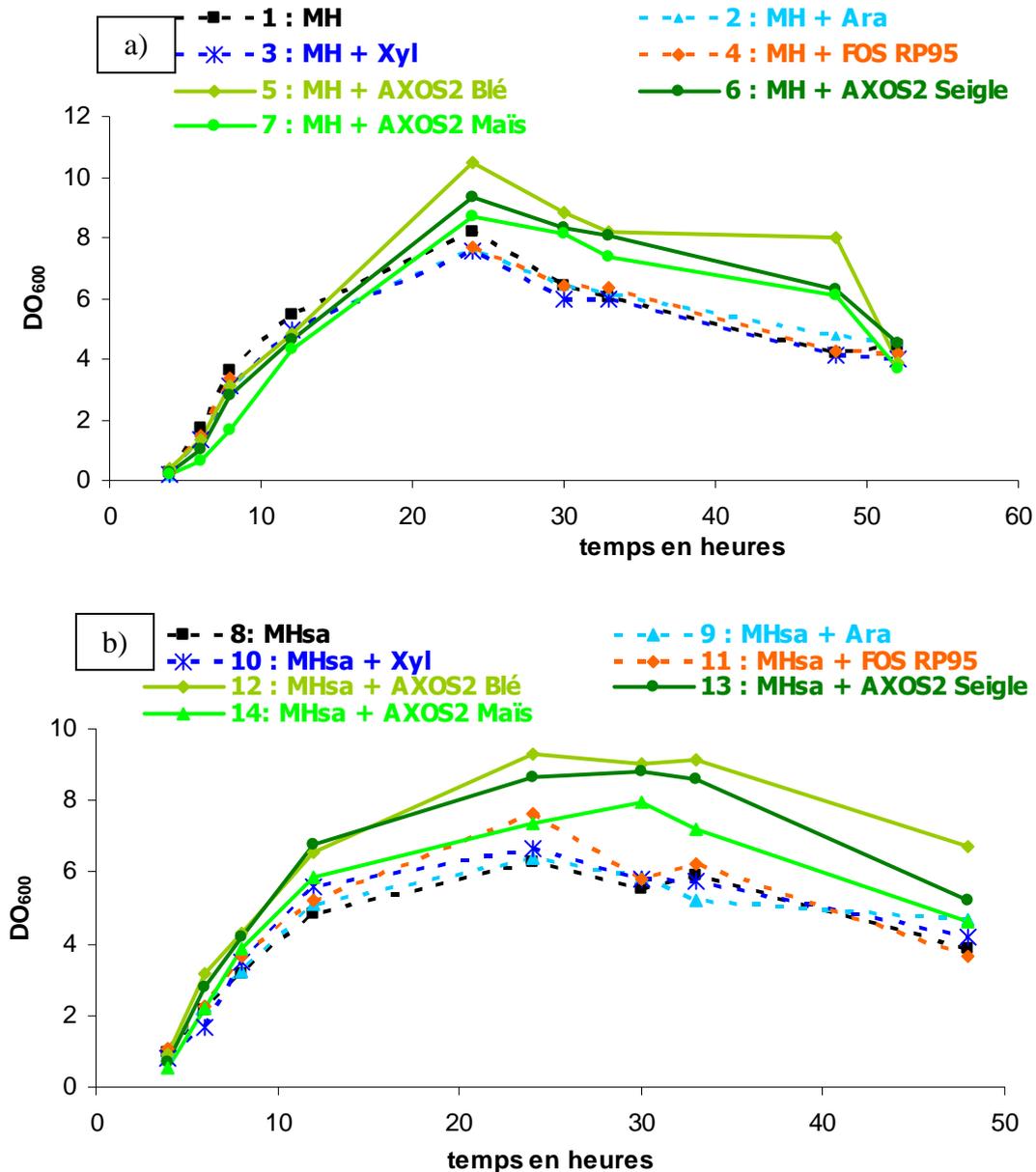


Figure 71 : Courbe de croissance de *Bacillus cereus*, complétement par différentes sources carbonées, suivi par DO à 600nm :

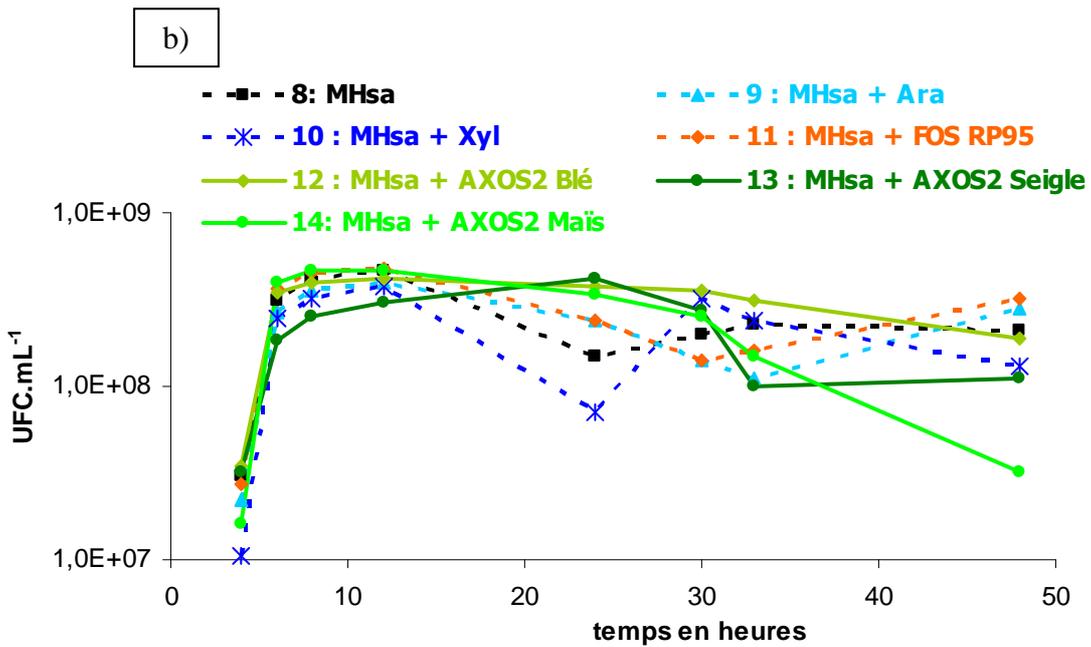
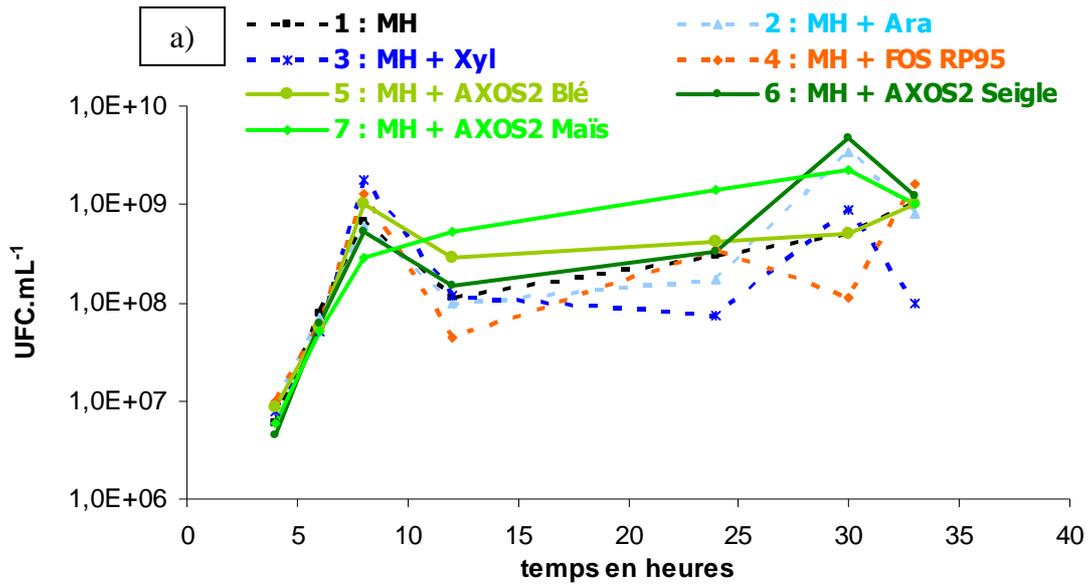
a) sur milieu MH avec amidon, b) sur milieu MH sans amidon.

Le suivi de croissance par la seule mesure néphélométrique à 600nm met en évidence un effet positif des AXOS 2 comparativement aux autres milieux testés (figure 71a et b).

Cela n'est pas confirmé lorsque les bactéries sont dénombrées par comptage sur boîte de Pétri, figure **72a et b**. Ainsi que nous l'avons signalé précédemment pour *Clostridium butyricum*, les variations d'absorbance mesurées peuvent être induites par un changement de morphologie du bacille.

Cette hypothèse est confirmée par le dénombrement des spores au cours de la culture, figure **73a, 73b**. La sporulation de *Bacillus cereus*, à l'origine d'un changement morphologique notable des cellules, est 2 fois plus importante avec les AXOS 2, après 24h de culture. Dans tous les cas, le pourcentage de bactéries sporulées est supérieur lorsque celles-ci sont cultivées avec les arabinoxylooligosaccharides de sons de céréales. Le phénomène n'est pas induit par le xylose ou l'arabinose libres présents dans les AXOS 2, comme en témoigne les figures 67.

L'attribution de l'activation de la sporulation de *Bacillus cereus* à un ou plusieurs constituants des AXOS 2 nécessitera un complément d'expertise. Il serait notamment intéressant de tester le comportement de la bactérie en présence de xylobiose, autre ose majoritaire dans la préparation d'AXOS 2. Cependant l'augmentation très significative de la sporulation du probiotiques *Bacillus cereus*, induite par les AXOS 2 de sons de céréales, est une observation d'intérêt majeur. En effet, dans le cadre d'une application industrielle, les probiotiques du genre *Bacillus* sont commercialisés principalement sous leur forme sporulée (SENESI, 2004), ce qui leur confère une meilleure résistance lors de leur transit dans la partie haute du tractus gastro-intestinal. On comprend ainsi aisément l'intérêt de définir des conditions de culture favorables à la sporulation (CARTMAN, 2004, HONG 2005).



**Figure 72 : Courbe de croissance de *Bacillus cereus*, complétement par différentes sources carbonées, suivi par dénombrement des colonies :
a) sur milieu MH avec amidon ; b) sur milieu MH sans amidon**

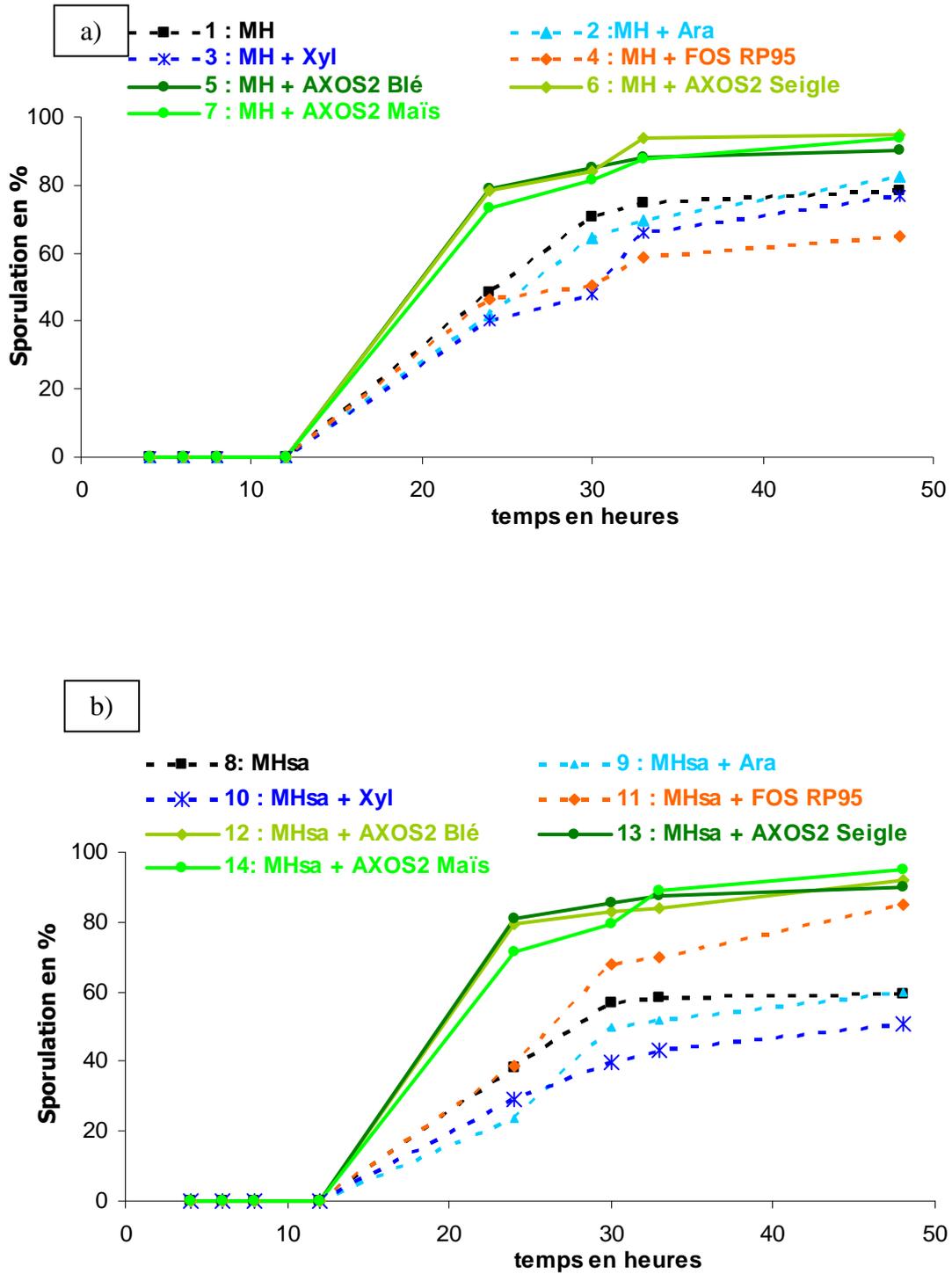


Figure 73 : Contrôle de la sporulation au cours de la croissance de *Bacillus cereus*, complétement par différentes sources carbonées :

a) sur milieu MH avec amidon, b) sur milieu MH sans amidon

Ces résultats nous ont confortés dans notre volonté d'expertiser l'incidence des conditions de culture de la bactérie probiotique sur sa capacité d'adhésion *in vitro*. L'intérêt du mélange d'oligosaccharides devient encore plus important si celui-ci permet de concilier accroissement de la résistance de la bactérie probiotique aux conditions micro-environnementales et renforcement de sa capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale, lieu où il doit manifester son activité.

Les tests d'adhésion ont été réalisés sur des cultures de 24h et la cible choisie est la mucine gastrique. Les conditions expérimentales du test sont décrites page 219 du chapitre Matériels et Méthodes. Les résultats sont illustrés **figure 74** :

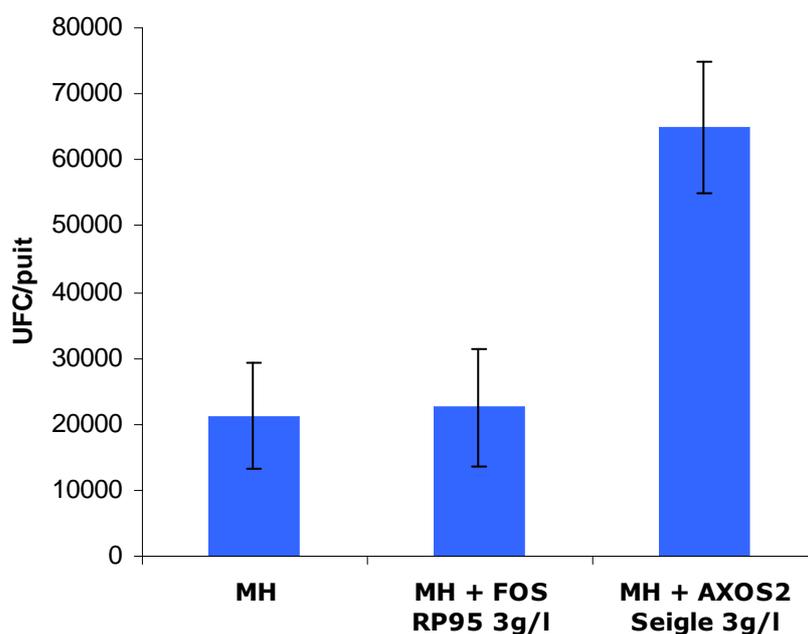


Figure 74 : Effet des conditions de culture standard (avec amidon) de *Bacillus cereus* sur la capacité d'adhésion de la bactérie sur la mucine gastrique.

Les valeurs représentées sont la moyenne de trois essais pour chaque source carbonée testée. Lorsque *Bacillus cereus* est cultivé en présence d'AXOS 2 de son de seigle, sa capacité d'adhésion à la mucine gastrique est multipliée par un facteur 3 comparativement à ce que l'on observe avec les FOS de référence. Ce résultat, même s'il n'est le fruit que d'un nombre restreint d'essais, est très encourageant pour la suite du travail. Si celui-ci est confirmé, notamment sur d'autres cibles telles que des protéines de la matrice extracellulaire ou bien des lignées de cellules épithéliales intestinales, nous apporterons des preuves complémentaires de l'incidence de conditions de culture sur la capacité d'adhésion d'un probiotique (SMIRNOV 2005, JONSSON 2001). Afin de conforter cette hypothèse, nous avons réalisé une analyse, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, des

protéines présentes à la surface de *Bacillus cereus*, lorsque la bactérie est cultivée soit sur milieu MH plus amidon avec ou sans addition d'AXOS 2 de seigle. Les extraits de protéines de surface sont réalisés à partir de culots bactériens obtenus par centrifugation de culture de 24h. La méthode d'extraction est adaptée de SHIMOJI (2003). Le culot bactérien préalablement lavé par du tampon PBS est suspendu dans 10mL de NaOH 10mM et incubé sous agitation orbitale pendant 18h à 4°C. La suspension est centrifugée à 5000 rpm, puis le surnageant ajusté à pH 7 est dialysé 3 fois 24h à 4°C contre 200 volumes d'eau. L'eau de dialyse est changée toutes les 24h. Le dialysat est lyophilisé et le résidu sec est analysé sur gel de polyacrylamide à 12% en présence de SDS et en conditions dénaturantes. Le protocole expérimental est indiqué page 214 chapitre Matériels et Méthodes. L'électrophorégramme est présenté **figure 75** :

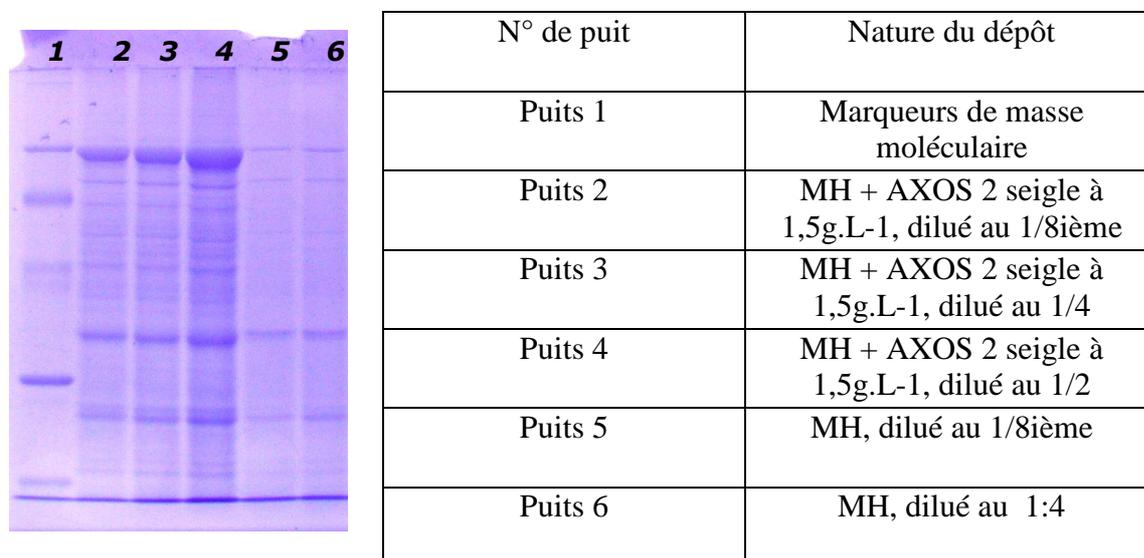


Figure 75 : Analyse des protéines de surface de *Bacillus cereus* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12%.

Lorsque *Bacillus cereus* est cultivé sur milieu MH additionné d'AXOS 2 de seigle, l'extrait de protéines de surface contient une bande très majoritaire, puits 2 à 4 figure 75, qui est observée seulement à l'état de trace sur le témoin milieu de culture sans ajout d'AXOS, puits 5 et 6. L'addition d'AXOS 2 de seigle semble stimuler la biosynthèse d'une protéine de surface dont la masse moléculaire est estimée à 94kDa. Cette protéine a été identifiée grâce à l'établissement de sa carte tryptique, après protéolyse « in gel » et analyse des peptides tryptiques par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF. Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées au laboratoire MOBIO, UMR CNRS 5144 IECB, dans le cadre d'une collaboration entre le LMBA et le LCSN. Il s'agit d'une protéine de la couche de surface, plus communément dénommée S-layer.

Les protéines qui appartiennent à cette famille présentent la particularité de pouvoir adopter une structure para-cristalline en s'associant entre elles par des interactions principalement de type hydrophobes. La présence de S-layer à la surface de souche de *Bacillus cereus* non probiotique ainsi que leur rôle dans l'adhésion à des protéines de la matrice extra-cellulaire a été décrit par Kotiranta (1998). Plusieurs auteurs ont démontré l'implication de protéines de la couche S dans l'adhésion *in vitro* de diverses bactéries probiotiques, notamment du genre *Lactobacillus* (TOBA 1995, SILLANPÄÄ 2000 et HYNÖNEN 2002).

Cette première observation de l'incidence des conditions de culture sur l'expression d'une protéine de la couche S ouvre des perspectives intéressantes. Nous devons vérifier si celle-ci est à la fois présente à la surface des formes végétatives et sporulées puis ultérieurement si elle possède une aptitude à s'adsorber *in vitro* spécifiquement sur différentes cibles telles que les protéines de la matrice extra-cellulaire. Si tel était le cas, il deviendrait opportun de comprendre comment les AXOS 2 stimulent ou induisent la biosynthèse de cette protéine.

CHAPITRE VI

MATERIELS ET METHODES

I Réactifs et matériels utilisés :

I 1 Solvants et réactifs

La nature, l'origine et la pureté des solvants et des réactifs utilisés au cours de ce travail sont indiquées dans le **tableau 43** suivant :

Tableau 43 : Liste des principaux réactifs et solvants utilisés.

Noms	N° CAS	Pureté en %	MM en g.mol ⁻¹	Fournisseur
Acétate d'ammonium	631-61-8	98	77,8	Sigma
Acétate de sodium	127-09-3	99	136,08	Prolabo
Acétonitrile	75-05-8	99,9	41,05	Scharlau
Acide 3-méthyl valérique	105-46-1	99,8	116,16	Fluka
Acide acétique	64-19-7	99	60,05	Labosi
Acide butyrique	107-92-6	99,5	88,11	Sigma
Acide chlorhydrique	7647-01-0	37	36,46	Fisher
Acide galacturonique	91510-62-2	98	212,2	Sigma
Acide glucuronique	6556-12-3	98	194,10	Sigma
Acide lactique	79-33-4	99	90,08	Sigma
Acide <i>para</i> -hydroxybenzoïque hydrazide	5351-23-5	98	152,15	Acros
Acide pentanoïque (valérique)	109-52-4	99,5	102,13	Sigma
Acide propionique	79-09-4	99,5	74,08	Sigma
Acide sulfurique	7664-93-9	96	98,08	Carbo Elba
Acide trifluoroacétique	76-05-1	99	114,0	Sigma
Arabinose	87-72-9	99	150,0	Sigma
Chlorite de sodium	7758-19-2	80	90,44	Acros
Diéthyl éther	60-29-7	99	74,12	Scharlau

Ethanol anhydre	64-17-2	99.5	46.07	Elvetec
Noms	N° CAS	Pureté en %	MM en g.mol ⁻¹	Fournisseur
Ether de pétrole	64742-49-0			SDS
Fructose	57-48-7	99	180,16	Sigma
Galactose	59-23-4	99	180,16	Sigma
Glucose	50-99-7	99	180,16	Sigma
Hydroxyde de potassium	1310-58-3	99	51.11	Acros
Hydroxyde de sodium	1310-73-2	98	40.00	Acros
<i>Meta</i> -hydroxydiphenyl	92-69-3	90	170.21	Aldrich
Méthanol	67-56-1	99,9	32,04	Scharlau
Myoinositol	87-89-8	99	180.20	Sigma
Phénol	108-95-2	99	94.11	Sigma
Pyridine	110-86-1	99	79,1	Sigma
Xylobiose	6860-47-5	95	282,2	Megazyme
Xylose	59-86-6	99	150,1	Sigma

I 2 Substrats végétaux

- Les sons, issus de la mouture de grains blé et de seigle, récoltés en 2003. Ils ont été mis gracieusement à disposition par la minoterie Lagarde, à Objat (19130, France).
- Arabinoxylanes de maïs, Ulice Limagrin (63, France),
- Xylane de hêtre, X 4252 Sigma (France)
- Inuline et dérivés fructooligosaccharidiques :
 - Inuline de chicorée, Sigma (France)
 - Synergy : mélange d'inuline et d'oligosaccharides de degrés de polymérisation compris entre 2 et 7, Orafti (Belgique)
 - RP 95, mélange de fructooligosaccharides de degrés de polymérisation compris entre 2 et 7, Orafti (Belgique)

I 3 Biocatalyseurs

Enzymes utilisées :

- **XS** : xylanase fongique produite par *Trichoderma viride* (Sigma, France). Spécificités : endo-1,4- β -D-Xylanxylanohydrolase (EC 3.2.1.8) et endo-1,3- β -Xylanase (E.C. 3.2.1.32).
- **XL** : Xylulyv : préparation de xylanase industrielle (Lyven ; France). Spécificité : endo-1,4- β -D-Xylanxylanohydrolase (EC 3.2.1.8). L'origine et la pureté ne sont pas précisées par le fournisseur.
- **XM** : β -Xylanase M3 produite par *Trichoderma longibrachiatum* (Megazyme, Irlande). Spécificité : endo-1,4- β -D-Xylanxylanohydrolase (EC 3.2.1.8). Activité spécifique : 274UE

L'activité enzymatique de chaque préparation commerciale de xylanase est mesurée avant utilisation et exprimée en UE.mg⁻¹ de solide ou lyophilisat. La définition de l'unité est donnée page 210 de ce chapitre.

- **AM** : α -L-arabinofuranosidase produite par *Aspergillus niger* (Megazyme, Irlande). Spécificité : exo- α -L-arabinofuranosidase (E.C.3.2.1.55) libérant des unités L-arabinofuranoses en position α -1,2 et/ou α -1,3 du substrat. Activité spécifique : 1,2 UE.mg⁻¹ eq protéine, l'UE est définie par le fournisseur comme la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mole d'arabinose par minute dans les conditions du test : pH 4, 40°C, substrat arabinoxylane de farine de blé à 5mg.mL⁻¹.
- **Ban 240L** : endo amylase bactérienne produite par *Bacillus amylolicofaciens* (Novozyme, Danemark). Spécificité : endo α -D-1,4-glucan-glucano-hydrolase (E.C 3.2.1.1). Activité (données fournisseur): 240 UE.mg⁻¹,
- **Promozyne 400L** : pullulanase produite par *Bacillus acidopullulyticus* (Novozyme, Danemark). Spécificité : pullulan 6-glucano hydrolase (E.C. 3.2.1.41), Activité (données fournisseur) : 400 PUN.mL⁻¹.
- **Alcalase 2,4L** : protéase à sérine produite par *Bacillus* (Novozyme, Danemark). Cette enzyme possède une très large spécificité.

I 4 Matériels et équipements scientifiques

Production d'eau ultra pure

Toutes les préparations aqueuses sont réalisées avec de l'eau ultra pure (résistivité supérieure à 18 M Ω) produite par osmose inverse sur un système Milli RO 50 et purifiée sur Milli Q plus (Millipore, France).

Centrifugation

- Vitesse de rotation supérieure à 5 000 rpm :

Pour les volumes inférieurs à 1mL, une centrifugeuse Sigma 1-15 (Bioblock, Allemagne) a été utilisée.

Pour les volumes compris entre 1 et 40 mL, nous avons employé une centrifugeuse modèle T 124 (Kontron Instruments, Suisse).

- Vitesse de rotation inférieure à 5 000 rpm :

Les centrifugations dans ces conditions ont été réalisées à l'aide d'une centrifugeuse modèle CR-412 (Jouan, France).

Spectrophotométrie UltraViolet-Visible

Les mesures sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible à double faisceaux Uvikon XS (Kontron Instruments, Suisse).

Chromatographies en phase liquide

- HPLC : high performance liquid chromatography

Les analyses chromatographiques sont réalisées à l'aide d'un système HPLC (Kontron Instruments, Suisse) équipé d'une pompe à gradient ternaire modèle 325, d'un système de dégazage à l'hélium et d'un injecteur à boucle modèle 7125 (Rhéodyne, USA). Les colonnes mises en œuvre

ainsi que les modes de détections et les conditions d'analyses sont précisés ultérieurement dans les chapitres concernés. Les données sont acquises et retraitées à l'aide d'une station d'acquisition modèle Chroma2000 (Kontron Instruments, Suisse).

- FPLC : fast polymer liquid chromatography

Les séparations chromatographiques sont effectuées à l'aide d'un système Waters (France) constitué d'une pompe gradient quaternaire modèle 600E, d'un injecteur à boucle Rhéodyne 7125 et d'un détecteur UV-Visible modèle 486 Waters. L'acquisition et le traitement des données sont réalisés par une station Millénium³² Waters.

Chromatographie en phase gazeuse

Le système est constitué d'un chromatographe en phase gazeuse modèle GC 8060 couplé à un détecteur de type spectromètre de masse modèle MD 800 (Fison Instruments, Italie), fonctionnant en mode impact électronique (IE). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur. L'acquisition et le traitement des données sont assurés par le logiciel Masslab (Fison Instruments, Italie).

Broyage et tamisage des échantillons

Les sons bruts de blé et de seigle ont été broyés à l'aide d'un micro broyeur à marteau (Culatti AG, Suisse) puis criblés sur des tamis de diamètre de maille 1mm, 0,5mm et 0,2mm.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les séparations électrophorétiques sont réalisées à l'aide d'une cellule XCell Sure Lock Minicell (Invirigen, USA) et d'un générateur de courant modèle 1000/500 (BioRad, USA).

Ultrafiltration

Les traitements d'ultrafiltration sont effectués à l'aide de cellules munies d'agitateur magnétique, modèle 8050 Amicon (Millipore, France). Les membranes en cellulose régénérée

(Amicon, Millipore, France) mises en œuvre sont de type PLBC, $\varnothing = 44,5\text{mm}$, seuil de coupure 3kDa.

Agitation orbitale

Les réactions de type hydrolytique, nécessitant une incubation sous agitation et un contrôle de la température du milieu réactionnel, ont été réalisées à l'aide d'un agitateur orbital thermostaté modèle Unimax 1010 (Heidolph Instruments, Allemagne).

Concentration et séchage

Les concentrations d'échantillons dont les volumes sont inférieurs à 5mL sont réalisées à l'aide d'un évaporateur centrifuge modèle RC. 1010 (Jouan, France) équipé d'une pompe modèle RCT 90 (Jouan, France). Lorsque les volumes sont supérieurs à 5mL, les échantillons sont concentrés grâce à un évaporateur rotatif modèle Rotavapor (Büchi, Suisse).

Le séchage par lyophilisation est mis en œuvre à l'échelle du laboratoire (volume inférieur à 100mL) avec un lyophilisateur (Virtis, USA) et à l'échelle pilote, (volume de 0,1L à 5L) à l'aide d'un lyophilisateur modèle Unitop 1000L (Virtis, USA).

Spectrométrie de masse

La détermination des masses moléculaires des oligosaccharides est réalisée par spectrométrie de masse en mode MALDI (Matrice Assisted Laser Désorption Ionisation) avec un spectromètre modèle Reflex 3 (Bruker, Allemagne) équipé d'une source MALDI avec un laser à azote dont la longueur d'onde d'excitation est fixée à 337nm.

L'analyse des oligosaccharides, en mode ESI (ElectroSpray Ionisation), est réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse de type piège ionique modèle LCQ Advantage (Thermo Finnigan, USA).

II Extraction des arabinoxylanes

II 1 Préparation des sons de céréales

Avant toute extraction, les sons de céréales (blé ou seigle) ont été broyés puis tamisés (cf. § I 4). La fraction de granulométrie comprise entre 0,5 et 0,2 mm a été utilisée au cours de cette étude.

II 2 Délignification des sons de céréale

- Echelle analytique : 20g de son de céréale broyé (blé ou seigle), d'une granulométrie comprise entre 500 et 200 μ m, sont mis en suspension dans un erlenmeyer de 0,5L contenant 300mL d'eau ultra pure équilibrée à 70°C et acidifiée par ajout d'H₂SO₄ concentré (96%) jusqu'à obtention d'une concentration finale en acide de 0,3% vol/vol. Le milieu réactionnel est placé sous agitation magnétique à 200 rpm puis 8g de chlorite de sodium sont additionnés et le traitement est prolongé pendant 2h. L'hydrolyse des lignines est stoppée par abaissement de la température à environ 20°C. La fraction insoluble correspondant au son délignifié est récupérée par centrifugation à 4000 rpm pendant 20min. Le surnageant est éliminé et le culot est suspendu dans environ 100mL d'eau ultra pure puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. L'opération de lavage du culot est renouvelée 3 fois supplémentaires. Le résidu délignifié et lavé est congelé puis lyophilisé.
- Echelle préparative : le procédé de délignification est transféré à l'échelle préparative. Les volumes et les quantités sont multipliés par un facteur 10 comparativement aux valeurs indiquées lors du traitement à l'échelle analytique. Les conditions expérimentales sont identiques à celles citées précédemment, à l'exception de l'agitation qui est réalisée grâce à un mélangeur mécanique de type RW20 DZM (Ika Works, USA) à 200 rpm.

II 3 Extraction alcaline

La procédure mise en œuvre est adaptée de CHANLIAUD (1995a). 5g de son brut ou délignifié sont mis en suspension dans un erlenmeyer de 250mL contenant 125 mL de potasse à 1,05mol.L⁻¹. Le milieu réactionnel est équilibré au bain marie à 60°C, sous agitation douce à 150

rpm. Après 2h d'incubation dans ces conditions, la réaction est arrêtée après abaissement du pH jusqu'à la neutralité grâce à l'addition d'acide acétique glacial (environ 10mL). La suspension résiduelle est clarifiée par centrifugation à 4000 rpm pendant 30min. Le culot est collecté quantitativement, suspendu dans 100mL d'eau ultra pure puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. L'opération de lavage de la fraction insoluble est répétée trois fois supplémentaires avant que celle ci soit lyophilisée et identifiée R_{KOH} pour résidu KOH. Les surnageants de centrifugation (environ 400mL), comprenant également les eaux de rinçage, sont concentrés par évaporation sous vide jusqu'à réduction du volume à environ 100mL. Le résidu concentré est additionné de 4 volumes d'éthanol à 95% vol/vol, froid, puis le milieu réactionnel est placé en chambre froide à +4°C, pendant 12h. Le précipité formé, contenant les hémicelluloses, est collecté quantitativement, suspendu dans 100mL d'eau ultra pure, congelé puis lyophilisé. Cette fraction est identifiée AX_{brut} pour arabinoxylyanes bruts. La phase surnageante est clarifiée par filtration sur papier Whatman n°1 (11µm, Whatman, Angleterre) et le filtrat est séché par évaporation sous vide. Le résidu sec, identifié R_{EtOH} , pour résidu éthanol, est conservé en dessiccateur sur silica-gel à température ambiante.

Le transfert de la procédure d'extraction alcaline, à l'échelle préparative, est réalisé en multipliant par un facteur 20 les volumes et les quantités utilisés à l'échelle analytique.

II 4 Elimination de l'amidon et des protéines

La fraction extraite, AX_{brut} , est soumise à plusieurs traitements enzymatiques afin d'éliminer l'amidon résiduel et les protéines qui la contaminent. L'extrait AX_{brut} est désamidonné grâce à l'action conjuguée de 2 glycohydrolases. 30g de la fraction considérée sont solubilisés dans 750ml d'eau ultra pure, puis le milieu est équilibré à 55°C et ajusté à pH 5,5 par de l'acide acétique glacial. Une préparation enzymatique constituée d' α -amylase (BAN240L, Novozyme) et de pullulanase (Promozyme 400L, Novozyme), est additionnée afin d'atteindre une concentration finale de 1% (vol/vol) pour chacun des deux biocatalyseurs. Après 2h d'incubation à 55°C, le pH du milieu réactionnel est ajusté à 8 par addition d'hydrogénocarbonate d'ammonium à 1mol.L^{-1} et la température est abaissée puis régulée à 45°C. La déprotéinisation est réalisée en additionnant, au milieu réactionnel, une protéase à sérine à large spécificité (Alcalase 2,4L, Novozyme) à une concentration finale de 1% (vol/vol). Après 3h d'incubation, les enzymes (glycohydrolases et protéases) sont inactivées par chauffage pendant 10min à 100°C. Le milieu réactionnel est ensuite

concentré, 3 fois environ à l'évaporateur rotatif (volume final 250ml), puis dialysé sur membrane 6 à 8000Da (diamètre 25,5mm, Spectrum Laboratories, USA) contre 100 volumes d'eau ultra pure pendant 24h à 4°C sous agitation. L'opération est renouvelée 3 fois supplémentaires avec changement de l'eau de dialyse. Le dialysat (environ 800mL) est soumis à une extraction en phase solide sur cartouche échangeuse d'anions.

II 5 Extraction, en phase solide, de la fraction arabinoxylyanes neutres

Le pH du dialysat précédemment obtenu est ajusté à 7,8 par addition d' NH_4HCO_3 à 1mol.L^{-1} . La suspension est clarifiée par centrifugation durant 20min à 4000 rpm. Le surnageant (environ 800mL) est soumis à une extraction en phase solide sur cartouche Sep Pak QMA, échangeuse d'anions (Waters). Le traitement de la totalité du surnageant nécessite la mise en œuvre de 8 cartouches Sep Pak. Environ 100mL sont déposés par cartouche, préalablement équilibrée à pH 7,8 par 10mL de tampon NH_4HCO_3 20mM. L'éluat des 8 cartouches contenant les polysaccharides non adsorbés sur échangeur d'anions est rassemblé, congelé puis lyophilisé. Le résidu sec constitue la fraction AX_{purif} , pour arabinoxylyanes purifiés, il est stocké en dessiccateur à +4°C. La fraction polysaccharidique adsorbée sur chaque cartouche Sep Pak est éluée sélectivement par 5mL de NH_4HCO_3 20mM + NaCl 2M. Les éluats des 8 cartouches sont rassemblés, dialysés 24h à 4°C contre 100 volumes d'eau puis lyophilisés. Le résidu sec constitue la fraction AX_{QMA} pour arabinoxylyanes adsorbés sur QMA.

III Hydrolyses des arabinoxylanes

III 1 Hydrolyse enzymatique directe des arabinoxylanes purifiés

III 1 1 Hydrolyse par l'arabinase

10mL d'une solution d'AX_{purif} à 10mg.mL⁻¹, dans un tampon acétate, 0,05M et pH4, sont placés sous agitation orbitale à 200 rpm puis équilibrés à 40°C. L'arabinase AM (Megazyme) est ajoutée au substrat de telle sorte que sa concentration finale soit de 0,1 UE.mL⁻¹ (cf. IV 3 1, page 210 de ce chapitre, pour la définition de l'UE). Des prélèvements de 0,1mL sont effectués à intervalles de temps réguliers pour le suivi cinétique de la réaction catalysée par l'arabinase. Après un traitement thermique d'une durée de 5min à 100°C, chaque prélèvement est congelé à -20°C avant son analyse. Après une durée maximum de 48h d'hydrolyse, le milieu réactionnel résiduel est incubé 5min à 100°C, congelé puis lyophilisé.

III 1 2 Hydrolyse par les xylanases

10mL d'une solution d'AX_{purif} à 10mg.mL⁻¹, dans un tampon acétate, 0,05M et pH 5, sont placés sous agitation orbitale (200 rpm) et équilibrés à 40°C. Après atteinte de la température de consigne, la xylanase (XS ou XL ou XM, voir chapitre I 3) est ajoutée au substrat de telle sorte que la concentration finale soit de 0,20 UE.mL⁻¹. Le suivi cinétique de la réaction catalysée par chaque xylanase est réalisé en effectuant des prélèvements du milieu réactionnel à intervalles réguliers pendant 48h. Chaque prélèvement subit un traitement thermique de 5min à 100°C suivi d'une congélation avant d'être analysé. Le milieu réactionnel résiduel est finalement incubé 5min à 100°C, congelé puis lyophilisé.

III 2 Hydrolyse chimique directe des arabinoxylanes purifiés

100mg de la fraction AX_{purif} sont solubilisés dans 10mL d'une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique (TFA) à une concentration finale de 0,5mol.L⁻¹. Le milieu réactionnel, placé dans un flacon en verre borosilicaté à bouchage étanche, est incubé en étuve pendant 2h à 80°C. La

réaction d'hydrolyse chimique est stoppée par abaissement rapide de la température à +4°C en chambre froide.

III 3 Combinaison hydrolyse chimique puis enzymatique

La production d'oligosaccharides, à partir d'arabinoxylanes issus de divers sons de céréales, a été réalisée en combinant une hydrolyse chimique suivie d'un traitement enzymatique. L'optimisation du procédé a nécessité le recours à une approche par plan d'expériences, en utilisant une fraction arabinoxylane de maïs (Ulice) comme substrat modèle.

III 3 1 Optimisation de l'hydrolyse chimique : Processus n°1

Un réseau uniforme de Doehlert (Doehlert, 1970) à trois facteurs a été choisi dans le but de définir l'optimum de fonctionnement de l'hydrolyse chimique des arabinoxylanes purifiés. Les trois facteurs dont l'incidence est étudiée sur le premier processus sont : la concentration en acide, la durée et la température de l'hydrolyse. Leurs niveaux respectifs, fixés par le réseau de Doehlert sont indiqués dans le **tableau 44** ci-dessous. :

Tableau 44 : Niveaux des facteurs définis par le réseau uniforme de Doehlert.

N° d'essai	[TFA] (mol.L ⁻¹)	Durée (h)	Température
1	1	6,00	60
2	0,1	6,00	60
3	0,78	10,33	60
4	0,33	1,67	60
5	0,78	1,67	60
6	0,33	10,33	60
7	0,78	7,44	80
8	0,33	4,56	40
9	0,78	4,56	40
10	0,55	8,89	40
11	0,33	7,44	80
12	0,55	3,11	80
13	0,55	6,00	60

Chaque essai d'hydrolyse de la fraction AX_{purif} est réalisé en suspendant 10mg de substrat dans 1mL d'une solution aqueuse de TFA ajustée à la concentration finale souhaitée, indiquée tableau 44. Le milieu réactionnel est réparti par prise aliquote de 200µL en tube en verre de 1,5 mL (ICS, France) muni d'un bouchon étanche avec un opercule en téflon. Les tubes sont incubés en étuves dont les températures de consigne sont réglées aux valeurs indiquées tableau 44. Après atteinte de la durée d'incubation choisie, le tube est refroidi à +4°C pendant 2h puis stocké à -20°C avant analyse. La définition ainsi que le choix de chaque réponse retenue pour modéliser le processus d'hydrolyse chimique sont développés dans le chapitre III.

III 3 2 Optimisation de l'hydrolyse enzymatique : Processus n°2

Une démarche identique à celle citée précédemment au paragraphe II 3 1 a été mise en œuvre. L'incidence des facteurs nature de la ou des enzymes, concentration de la ou des enzymes ainsi que durée de l'hydrolyse, sur la production d'arabinoxyloligosaccharides est étudiée. Les modalités respectives de ces trois facteurs sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 45 : Matrice d'expériences pour l'étude de l'effet des facteurs sur la processus n°2.

Essai	Nature de l'enzyme	Concentration en UE .mL⁻¹	Durée (h)
1	XS	0,1	5
2	XS	1	10
3	XS+AM	0,1	1
4	XS+AM	1	5
5	XL	1	1
6	XL	0,1	3
7	XL+AM	0,1	1
8	XL+AM	1	10
9	XM	1	1
10	XM	0,1	5
11	XM+AM	1	5
12	XM+AM	0,1	10

Chaque essai d'hydrolyse de la fraction d'oligosaccharides issus du processus n°1 est réalisé comme suit : 200µL d'hydrolysats chimiques obtenus dans les conditions optimales déterminées grâce au plan d'expériences, placés en tube en verre de 1,5mL, sont séchés par évaporation sous vide. Le résidu sec est repris par 200µL d'une solution de tampon acétate d'ammonium 0,05M, pH 5 puis équilibré à 40°C. Les enzymes de nature(s) et de concentration(s) choisies, en solution dans 10µL de tampon acétate, sont additionnées au 200µL de substrat. Le milieu réactionnel est incubé à 40°C sous agitation orbitale à 200 rpm. Après atteinte de la durée d'incubation choisie, tableau 45, le tube est refroidi puis stocké à -20°C avant analyse. La définition ainsi que le choix de chaque réponse retenue pour modéliser le processus d'hydrolyse enzymatique sont développés dans le chapitre III consacré aux plans d'expériences.

III 4 Production d'arabinoxyloligosaccharides à l'échelle préparative

III 4 1 Hydrolyse chimique : Processus n°1

Les fractions AX_{purif} issues de maïs ou des sons de blé et de seigle sont hydrolysées dans les conditions optimales (concentration en acide, durée et température) définies à l'issue du plan d'expériences.

4,5g de lyophilisat d'AX_{purif} sont suspendus dans 300mL d'eau ultra pure, homogénéisés, puis équilibrés pendant 1h à la température optimale. Le TFA concentré (99%) est additionné pour atteindre la concentration optimale en acide puis le milieu réactionnel est placé à l'étuve. La température et la durée d'incubation correspondent aux valeurs optimales définies par le plan d'expériences. L'hydrolyse chimique est ensuite stoppée par diminution rapide de la température en plaçant le milieu réactionnel à +4°C. Le pH est alors ajusté à 5 par addition d'ammoniaque concentré, 8M, puis la solution est stockée à 4°C.

III 4 2 Elimination sélective des monosaccharides par ultrafiltration

La solution obtenue en III-4-1 est centrifugée pendant 15min à 12 000 rpm et le surnageant est clarifié sur filtre nylon Millipore (47mm, Øpore 0,45µm). 50mL de filtrat sont concentrés à l'aide d'une cellule d'ultrafiltration équipée d'une membrane en cellulose régénérée (Millipore) dont le seuil de coupure est de 3kDa. La pression transmembranaire est fixée à 2,5bar. Après atteinte d'un facteur de réduction volumique ($V_0/V_R = \text{Volume initial} / \text{volume rétentat}$) égal à 4, le rétentat est dilué par addition de 3 volumes de tampon acétate d'ammonium, 0,05M, pH 5, puis est à nouveau concentré dans les mêmes conditions. Le rétentat final est de nouveau dilué par le même tampon acétate, avant d'être soumis au processus 2 d'hydrolyse enzymatique. Pour traiter les 300mL de milieu réactionnel résultant de l'hydrolyse chimique (cf. paragraphe III 4 1) deux cellules d'ultrafiltration d'une capacité individuelle de 50mL sont utilisées en parallèle.

III 4 3 Hydrolyse enzymatique : processus n°2

La fraction enrichie en oligosaccharides, obtenue en III-4-2 par ultrafiltration, est soumise à l'hydrolyse enzymatique. Les conditions optimales du traitement ont été définies au cours du plan d'expériences cité en III-3-2. 300mL d'hydrolysats chimiques, concentrés, dialfiltrés ajustés à pH 5 sont introduits dans un erlenmeyer de 500mL, placés sous agitation orbitale à 200 rpm. La température de consigne est fixée à 40°C. La nature des enzymes additionnées ainsi que leur concentration correspondent aux valeurs optimales définies en II-3-2. Après atteinte de la durée optimale d'hydrolyse, les glycohydrolases sont inactivées par traitement thermique durant 10min à 100°C puis le milieu réactionnel est congelé et lyophilisé. Les résidus secs sont identifiés AXOS pour arabinoxylooligosaccharides de maïs, de blé et de seigle. Ils sont conservés sur silica-gel en dessiccateur à +4°C avant leur analyse et leur mise en œuvre dans les tests de mesure d'activité biologique.

IV Analyses

IV 1 Caractérisation physico-chimique du matériel végétal

IV 1 1 Teneur en lipide

Les teneurs en matières grasses des sons de blé et de seigle sont déterminées après extraction au Soxhlet. L'entraînement des matières grasses est réalisé par 1,5L d'éther de pétrole pour 20g de son. Le solvant d'extraction est ensuite évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu gras est pesé, le résultat est exprimé en g de matière grasse pour 100g de son.

IV 1 2 Taux d'extractibles hydrophiles

Il est déterminé par extraction au Soxhlet en utilisant de l'éthanol comme solvant des substances hydrophiles. Le résidu gras de l'extraction précédente à l'éther de pétrole (cf. § IV 1 1) est placé dans une cartouche de cellulose, puis traité par 1,5L d'éthanol pendant environ 20H. Le solvant est éliminé par évaporation sous vide, le résidu est pesé, le résultat est exprimé en g de matières hydrophiles pour 100g de son brut.

IV 1 3 Taux de matière sèche

3g de son brut de blé ou de seigle sont placés sur une balance équipée d'un dessiccateur à infrarouge (balance Precisia 310M, dessiccateur 300HA, Elvetec, France). Le son est chauffé jusqu'à 105°C avec une rampe de montée en température de 10°C.min⁻¹. Le taux de matière sèche est calculé lorsque les variations de masse sont inférieures à 1mg.min⁻¹. Le résultat est exprimé en g de matière sèche pour 100g de son brut.

IV 1 4 Teneur en protéines totales

Les protéines totales des différents sons, sont dosées par la méthode de Kjeldahl sur 500mg d'échantillon. L'étape de minéralisation est réalisée à 350°C à l'aide d'une rampe de minéralisation (2006 Digestor, Foss Tecator, Suède) pendant 30min après ajout de 15mL d'H₂SO₄ concentré (96%). La distillation de l'ammoniaque, après addition d'un excès de NaOH à 10mol.L⁻¹, est réalisée à l'aide d'un appareil Kjeltech (2100 Distillation Unit, Foss Tecator, Suède). Le distillat est collecté dans un erlenmeyer contenant 25mL d'H₃BO₃, à 40g.L⁻¹, additionné d'un indicateur coloré, puis un dosage en retour par de l'acide chlorhydrique, 0,1 ou 0,05M, est réalisé.

Le calcul de la teneur en protéines, exprimée en g pour 100g d'échantillon, est effectué en utilisant la relation suivante :

$$\text{teneur en prot (\%)} = \frac{A \times B}{m} \times M_N \times 100 \times f$$

Où A = volume d'HCl en L, nécessaire à la titration de H₂BO₃⁻;

B = concentration d'HCl (0,1 ou 0,05mol.L⁻¹);

m = masse d'échantillon minéralisé;

M_N = masse molaire de l'azote (14g.mol⁻¹)

f = facteur de conversion de l'azote protéique en équivalent masse de protéines. Pour les protéines de céréales (blé ou seigle) f=5,7.

IV 1 5 Taux de cendres

2g de la fraction à analyser sont placés dans un creuset puis portés à 550°C dans un four à moufle pendant 6h. La matière minérale résiduelle est pesée, le résultat est exprimé en g de cendres pour 100g de son.

IV 1 6 Teneur en amidon

L'amidon est dosé dans les échantillon de sons et d'extraits bruts d'AX, en utilisant la méthode normalisée NF 03-606 (1996). 500mg d'échantillon de granulométrie comprise entre 0,5 et

0,2mm sont suspendus dans 25mL d'éthanol à 40% vol/vol. Après agitation pendant 10min à 150 rpm, la suspension est centrifugée, le culot est à nouveau suspendu dans 25mL d'éthanol à 40% vol/vol, agité puis centrifugé à 8000 rpm pendant 10min. le culot lavé est dispersé dans 25mL de NaOH 0,5M, équilibrés à 60°C sous agitation à 150 rpm pendant 20min, puis refroidis dans la glace pilée. Le pH est ajusté à 4,6 – 4,8 par CH₃COOH glacial, la solution est placée à 60°C sous agitation avant addition d'1mL d'une solution d'amyloglucosidase (11500 UE.mL⁻¹, produite par *Aspergillus niger*, Sigma France). Après 30min d'hydrolyse enzymatique, le milieu réactionnel est ajusté à 250mL par addition d'eau, pour constituer la solution 1. Le glucose libéré est dosé sur 1mL d'une dilution au 1/20^{ème} de la solution 1, par addition de 2mL de réactif contenant la glucose oxydase et la peroxydase (Gago-20, Sigma France). Après 30min de repos à l'obscurité, la densité optique du milieu réactionnel est mesurée à 560nm contre un témoin blanc approprié. Les DO sont converties en concentration en glucose grâce à une courbe étalon établie dans les mêmes conditions expérimentales. La concentration en glucose est convertie en éq amidon en utilisant un facteur multiplicatif de 0,9.

IV 2 Caractérisation des fractions arabinoxylanes et arabinoxyloligosaccharides

IV 2 1 Dosages de sucres totaux

Les sucres totaux présents dans les différentes fractions des sons de céréales étudiées sont déterminés par la méthode colorimétrique de Dubois (1956). 200µL d'échantillon contenant environ 20µg d'équivalents xylose sont placés dans un tube à hémolyse. 0,2mL d'une solution aqueuse de phénol à 5% (pds/vol) sont additionnés. Le milieu réactionnel est mélangé à l'aide d'un vortex, 1mL d'H₂SO₄ à 96% est ajouté puis le mélange est à nouveau homogénéisé vigoureusement au vortex. Après 30min de repos à température ambiante, les absorbances sont lues à 480nm, contre un témoin approprié. Chaque essai est triplé, la valeur moyenne de l'absorbance est calculée puis convertie en équivalents concentration xylose à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie, avec du xylose, dans les mêmes conditions expérimentales. Le résultat est exprimé en g d'équivalent xylose pour 100g d'échantillon.

IV 2 2 Dosages colorimétriques des acides uroniques

La méthode colorimétrique employée est adaptée de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973). 200 μ L d'échantillon, contenant environ 40 μ g d'équivalents xylose, sont placés dans un tube à hémolyse dans lequel sont ajoutés 1,25mL de tétraborate de sodium à 0,0125M dans l'acide sulfurique concentré à 96%. Après agitation, le tube est incubé 5min dans un bain d'eau glacée avant d'être placé dans un bain marie bouillant pendant 5min. Après une période de refroidissement d'environ 10min, 20 μ L de méta-hydroxydiphenyl, noté m-HDP, à 0,15% pds/vol dans NaOH 0,5% pds/vol, sont additionnés. Le milieu réactionnel est homogénéisé au vortex puis l'absorbance est mesurée à 520nm contre un témoin approprié. La valeur moyenne de l'absorbance de trois essais pour chacun des échantillons est convertie en équivalent acide uronique, grâce à une courbe d'étalonnage obtenue dans les mêmes conditions expérimentales avec de l'acide glucuronique. Le résultat est exprimé en g d'équivalents acide glucuronique pour 100g d'échantillon.

IV 2 3 Analyse de la composition en monosaccharides par CPG/SM

La méthode utilisée est adaptée de Chaplin (1982).

IV 2 3 1 Préparation de l'échantillon

- Méthanolyse

Une quantité d'arabinoxylanes ou d'arabinoxyloligosaccharides correspondant à approximativement 100 μ g équivalents xylose est placée dans un tube à dérivation en verre, 32x11,6mm, fond conique (ICS, France). 10 μ L de myoinositol à 10mg.mL⁻¹, étalon interne, sont ajoutés à l'échantillon. Après séchage sous vide à l'évaporateur centrifuge (Virtis, USA), 200 μ L d'une solution de méthanol-HCl 0,9M sont additionnés, puis le tube contenant le milieu réactionnel, purgé sous courant d'azote avant d'être fermé hermétiquement, est placé à l'étuve à 80°C pendant 16h.

- Dérivation au TMSIm

Après méthanolyse, le milieu réactionnel refroidi à 4°C est séché sous courant d'azote. Le résidu sec est repris par un mélange de dérivation constitué de 15µL de pyridine et 15µL de triméthylsilylimidazole (TMSIm, Alltech, France). Les tubes sont brièvement purgés à l'azote et bouchés hermétiquement puis homogénéisés au vortex. Après 20min de réaction à température ambiante, 5µL de milieu réactionnel sont dilués dans un volume final de 500µL d'hexane. 1 µL de cette solution préalablement centrifugée, pendant 3min à 10 000 rpm, est injecté dans le système chromatographique.

IV 2 3 2 Analyse des dérivés TMS par CPG/SM

L'analyse est effectuée avec le système de chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse, décrit au chapitre I 4 2. L'injection est réalisée en mode splitless, la température de l'injecteur étant fixée à 250°C, le débit du gaz vecteur est réglé à 2mL.min⁻¹. L'élution des solutés est effectuée en mode gradient de température suivant le programme indiqué **figure 76** ci-dessous :

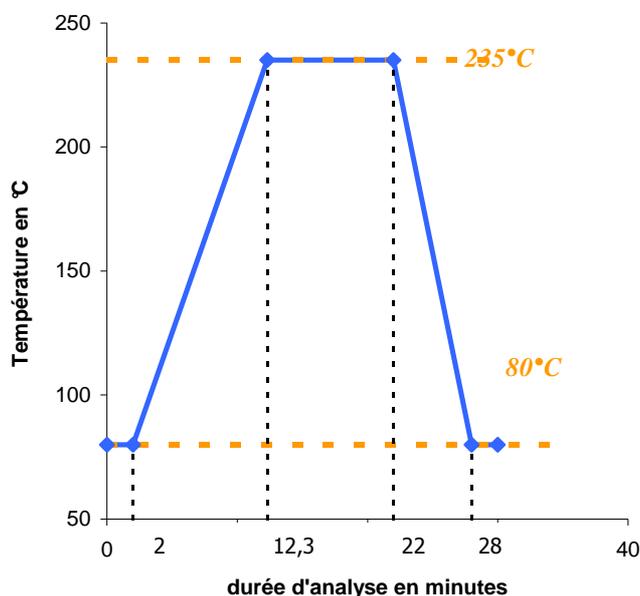


Figure 76 : Programme de température pour l'analyse des dérivés TMS par CPG/SM

- L'analyse qualitative :

Chaque ose inconnu est identifié sur la base de deux critères :

Comparaison de son temps de rétention relatif (Tr) par rapport à l'étalon interne avec ceux d'oses étalons soumis à la méthanolyse puis dérivés et analysés dans les mêmes conditions expérimentales, en utilisant la relation :

$$T_R = \frac{T_{R \text{ inc}} - t_0}{T_{R \text{ et int}} - t_0}$$

où $T_{R \text{ inc}}$ est le temps de rétention du composé inconnu,

$T_{R \text{ et int}}$ est celui de l'étalon interne,

t_0 représente le temps de rétention nulle.

Comparaison de son spectre de masse à ceux contenus dans les banques de spectres du logiciel Masslab (LIBTX et NIST, 65000 références).

Pour chaque ose, on observe plusieurs pics chromatographiques correspondant aux isomères de position et de conformation. Le temps de rétention pris en considération pour l'analyse qualitative correspond au pic majoritaire de chaque ose, les pics secondaires ne servent qu'à la confirmation de l'identification.

- L'analyse quantitative :

Chaque ose identifié est quantifié par la méthode de l'étalonnage interne en utilisant la relation suivante, et prenant en considération le pic majoritaire parmi l'ensemble des composés résultant de la dérivation :

$$C_{\text{inc}} = \frac{C_{\text{et}} \times A_{\text{inc}}}{A_{\text{et}}} \times \frac{A_{\text{et int}} \times C'_{\text{et int}}}{C_{\text{et int}} \times A'_{\text{et int}}} \times d$$

Avec : C_{et} = concentration de l'ose étalon dans le mélange témoin,

A_{et} = aire du pic majoritaire de l'ose étalon dans le mélange témoin,

A_{inc} = aire du pic majoritaire de l'ose inconnu, identifié dans l'échantillon inconnu,

$C_{\text{et int}}$ = concentration de l'étalon interne dans le mélange témoin,

$A_{\text{et int}}$ = aire de l'étalon interne dans le mélange témoin,

$C'_{\text{et int}}$ = concentration de l'étalon interne dans l'échantillon inconnu,

$A'_{\text{et int}}$ = aire de l'étalon interne dans l'échantillon inconnu,

d = facteur de dilution, dans l'hexane, de l'échantillon après dérivation.

Les résultats sont exprimés en moles d'oses pour 100 moles d'oses totaux identifiés.

IV 2 4 Estimation des masses moléculaires des fractions arabinoxyanes et arabinoxyooligosaccharides

- Pour les polymères :

La distribution des masses moléculaires des différentes fractions polymériques extraites de maïs, de blé ou de seigle, a été estimée par chromatographie liquide d'exclusion moléculaire sur gel. 10mg de la fraction lyophilisée sont solubilisés dans 1mL de tampon acétate d'ammonium 0,05M, pH 5 et la solution est centrifugée à 10 000 rpm pendant 5min. 20 μ L de surnageant sont injectés dans le système chromatographique analytique HPLC décrit au chapitre I-4. La colonne mise en œuvre est de type Aquagel OH-60 (300x7,5mm, \emptyset particules 8 μ m, domaine de fractionnement linéaire de 2.10⁶ Da à 2.10⁵ Da, Polymer Laboratories, France). Le débit d'élution par un tampon acétate d'ammonium, 0,05M, pH5, est fixé à 0,8mL.min⁻¹. La détection est effectuée soit à l'aide d'un réfractomètre différentiel, RI detector 475 (Kontron Instruments, Suisse), soit grâce à un détecteur à diffusion de lumière modèle DDL31 (Eurosep, France). Dans ce dernier cas, le gaz de nébulisation est de l'air comprimé délivré par un manomètre de précision équipé de filtres à poussière (5 μ m) et déshumidificateur (0.01 μ m). L'étalonnage de la colonne est réalisé à l'aide de dextrans linéaires de 4,9.10⁶ Da > MM > 1,5.10⁵ Da (Fluka).

- Pour les oligosaccharides

La même technique chromatographique a été utilisée pour l'estimation des masses moléculaires des oligosaccharides issus des différents types d'hydrolyse. Le système est constitué de deux colonnes PL-Aquagel OH 30 (300x7,5mm ; \emptyset particules 8 μ m ; Polymers Laboratories, France) montées en série et protégées par une pré-colonne (PL-Aquagel OH Guard ; 50x7,5mm ; \emptyset particules 8 μ m, Polymers Laboratories). Le domaine de fractionnement linéaire est compris entre 100Da et 30kDa. La phase mobile est un tampon acétate d'ammonium, 0,05M, pH 5. L'élution est réalisée en mode isocratique à 1mL.min⁻¹. La détection est effectuée à l'aide d'un réfractomètre différentiel modèle RI detector 475 (Kontron Instruments, Suisse) ou d'un détecteur à diffusion de lumière modèle DDL 31 (Eurosep, France). L'étalonnage a été réalisé à l'aide d'AX_{com} issus de

maïs (Ulice, France), d'inuline (Sigma, France), de FOS RP95 (Orafti, Belgique), de xylose et d'arabinose.

IV 2 5 Analyse des arabinoxylanes et des arabinoxylooligosaccharides par chromatographie d'échange d'ions

L'analyse est réalisée à l'aide du système chromatographique WATERS 600 E décrit au § I 4. 500µL d'une solution d'arabinoxylane ou d'arabinoxylooligosaccharides à 20mg.mL⁻¹ dans un tampon NH₄HCO₃ 0,05M pH 8, sont injectés sur une colonne AP-1 (20x1cm, Waters) contenant une phase stationnaire échangeuse d'anions de type Accel Plus QMA (WATERS). L'élution est réalisée à un débit de 2mL.min⁻¹ en mode gradient de force ionique selon le programme indiqué ci-dessous, **tableau 46**. La présence de solutés glucidiques dans l'éluat est visualisée par un détecteur modèle 486 (WATERS) réglé à 220nm et par un réfractomètre différentiel modèle RI detector 475 (Kontron Instruments, Suisse), monté en série à la sortie du détecteur UV. L'éluat est collecté par fraction de 2mL par un collecteur modèle 2110 (BioRad, USA).

Tableau 46 : Gradient de force ionique utilisé pour l'analyse des différentes fractions arabinoxylooligosaccharides, par CEI.

Durée d'analyse en minutes	NH ₄ HCO ₃ , 50mM, en % vol/vol	NH ₄ HCO ₃ , 50mM + NaCl 2M en % vol/vol
0	100	0
15	100	0
45	0	100
60	0	100
75	100	0

IV 2 6 Analyse des arabinoxylooligosaccharides par chromatographie liquide haute performance en phase normale

Les fractions oligosaccharidiques dont celles issues de la HPSEC, sur colonne Aquagel OH-30, sont analysées par chromatographie liquide haute performance en phase normale. Le système

met en oeuvre une colonne Ultrasep-NH₂ (250x4,6mm ; 4µm ; Bischoff ; Allemagne) thermostatée à 35°C par un four à colonne (CrocoCil, C.I.L., France). La visualisation des solutés en sortie de colonne est effectuée à l'aide d'un détecteur à diffusion de lumière de type DDL 31 (Eurosep, France). L'élution est réalisée en mode isocratique par une phase mobile constituée d'un mélange eau/acétonitrile dans les proportions 65/35 vol/vol.

IV 2 7 Détermination des masses moléculaires des arabinoxylooligosaccharides par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF

L'analyse de la distribution des masses moléculaires des oligosaccharides obtenus a été réalisée à l'Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB) de Bordeaux, en collaboration avec le Pr. J.M. Schmitter. Le soluté est repris dans un mélange éthanol-eau (1/1 vol/vol). 2µL de cette solution sont complétés par 2µL d'acide paraméthylbenzoïque, constituant la matrice. Le mélange homogénéisé est déposé sur la cellule d'analyse, puis séché à température ambiante avant d'être introduit dans la source du spectromètre.

IV 3 Hydrolyses enzymatiques

IV 3 1 Mesure de l'activité xylanase

Parmi l'ensemble des biocatalyseurs utilisés pour cette étude, seules les activités des xylanases ont fait l'objet d'un contrôle au laboratoire. Les autres enzymes, amylases, protéases ou arabinase, ont été utilisées en se référant aux activités indiquées par les fournisseurs.

Les trois xylanases (XS-Sigma, XM-Megazyme et XL-Lyven) sont préparées à une concentration précise comprise entre 2 et 3 mg.mL⁻¹ (pds/vol). Pour mesurer l'activité de ces solutions, 0,1mL pour XS et XM ou 1mL pour XL, sont additionnés à 100ml d'un tampon acétate de sodium, 0,05M, pH4,5 contenant le substrat (Xylane de hêtre, Sigma, X4252) à la concentration de 1mg.mL⁻¹. La température du milieu réactionnel est fixée à 40°C. Après l'ajout de l'enzyme, des prélèvements sont effectués toutes les minutes pendant 5min, puis un dernier au bout de 10min. Chaque prélèvement est traité pendant 5min à 100°C puis stocké à -20°C avant analyse. Les sucres

réducteurs présents dans chaque prélèvement sont dosés par la méthode colorimétrique de Lever (1972).

L'unité d'activité xylanase (UE) est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mol de sucre réducteur, exprimée en équivalents xylose, à partir d'un substrat modèle (Xylane de hêtre : X4252 ; Sigma) par minute, dans les conditions du test.

IV 3 2 Suivi cinétique de l'hydrolyse

IV 3 2 1 Dosages des sucres réducteurs

Le suivi cinétique de la libération, par voie enzymatique, d'oligosaccharides à partir des fractions arabinoxylanes, s'effectue grâce au dosage des sucres réducteurs selon la méthode colorimétrique de Lever (1972). 250 μ L d'échantillon, provenant d'une dilution adéquate de prélèvement effectué au cours de l'hydrolyse, contenant entre 20 et 100 μ g équivalents xylose, sont additionnés de 750 μ L d'une solution fraîchement préparée contenant 80% vol/vol de NaOH 0,5M et 20% d'acide hydrazide para-hydroxybenzoïque (PAHBAH) à 5% pds/vol dans HCl 0,5M. Le mélange est agité au vortex puis placé 5min à 100°C. La lecture de l'absorbance à 410nm, se fait après refroidissement, pendant 10min à température ambiante. La moyenne de trois mesures d'absorbance pour chaque échantillon est convertie en équivalent xylose à l'aide d'une droite d'étalonnage établie dans les mêmes conditions.

IV 3 2 2 Dosage des oligosaccharides et monosaccharides

Les produits de l'hydrolyse enzymatique sont séparés sur le critère masse moléculaire par chromatographie liquide haute performance d'exclusion moléculaire sur gel (HPSEC), en mettant en œuvre le système HPLC décrit au § IV 2 4. Les teneurs en oligosaccharides et en monosaccharides dans l'échantillon analysé sont estimées sur la base d'un étalonnage du système réalisé avec des monomères (xylose, arabinose, fructose et glucose), un mélange d'oligofructoses

(RP 95, $2 < DP < 7$), d'oligomaltose ($4 < DP < 10$), d'inuline pour la fraction oligomérique de haute masse et de l'arabinoxylane commercial de maïs pour les polymères résiduels. Les résultats sont exprimés en mg.mL^{-1} , après application du coefficient de réponse du détecteur déterminé pour chacun des étalons cités.

IV 4 Analyses des acides gras à chaînes courtes

L'analyse qualitative et quantitative des acides gras à chaînes courtes, AGCC, est réalisée sur les surnageants de culture des microorganismes probiotiques en présence de différentes sources carbonées.

IV 4 1 Par chromatographie en phase gazeuse

IV 4 1 1 Préparation de l'échantillon

La méthode est adaptée de SCHOOLEY (1992). 1mL de milieux de culture est centrifugé, pendant 5min à 10 000 rpm. 500 μL de surnageant, exempt de corps bactérien, sont acidifiés par addition de 500 μl d'acide chlorhydrique concentré (36%) et de 50 μl d'acide 3-méthylvalérique, servant d'étalon interne, à 1mg.ml^{-1} dans l'eau ultra pure. L'extraction des AGCC, en phase liquide, est réalisée par addition de 1ml d'éther diéthylique à la solution précédente. Après agitation au vortex, le mélange est centrifugé durant 2min à 10 000 rpm et la phase organique est prélevée puis stockée à 4°C. L'opération d'extraction à l'éther est renouvelée une fois supplémentaire sur la phase aqueuse résiduelle. Les phases organiques recueillies au cours de deux extractions sont regroupées et 200 μL sont prélevés, mis en tube à dérivation en verre de 1,5mL puis dérivés par addition de 20 μL de N-tert-butyldiméthylsilyl-N-methyltrifluoroacétamide (MTBSTFA) contenant 1% de tert-butyldiméthylchlorosilane (TBDMCS). Après 20min d'incubation du mélange homogène à 80°C, le milieu réactionnel est centrifugé 2min à 10 000 rpm. 1 μL de surnageant est injecté sur la colonne du système CPG.

IV 4 1 2 Analyse des dérivés TBDMS

L'analyse est réalisée par CPG/SM avec le système décrit au chapitre I 3 2. La colonne, 30m×0,25mm×0,25µm, mise en œuvre est de type DB-17 MS (J&W Scientific, USA). Le débit de gaz vecteur (hélium) est réglé à 1,3mL.min⁻¹. L'injecteur, maintenu à 250°C, fonctionne en mode split, le rapport de division est fixé à 40. L'élution est réalisée en mode gradient de température selon le programme suivant :

Tableau 47 : Programme de température pour l'analyse des dérivés TBMS en CPG/SM.

Durée d'analyse (min)	Température (°C)	Pente du gradient (°C.min⁻¹)
0	60	
5	60	+ 3
11,6	80	
11.6	80	+ 7
27.3	190	
29	190	- 20
35,5	60	
37	60	

Au niveau qualitatif, chaque AGCC est identifié, d'une part par comparaison de son temps de rétention relatif, par rapport à l'étalon interne, avec ceux de AGCC étalons dérivés dans les mêmes conditions et d'autre part par comparaison des spectres de masse obtenus, avec ceux contenus dans la base de données du logiciel.

Au niveau quantitatif, la méthode de l'étalonnage interne (cf. paragraphe IV 2 3 2), est utilisée. Le résultat est exprimé en mg d'acide par ml de milieu de culture.

IV 4 2 Par chromatographie liquide haute performance

La méthode est adaptée de MORALES (1998). Le surnageant de culture des microorganismes obtenu dans des conditions définies est dilué par H₂SO₄ de telle sorte que la concentration finale en

acide soit de 5mM. Le facteur de dilution est adapté en fonction de l'échantillon traité. 10 μ L d'étalon interne, l'acide 3-méthylvalérique à 10mg.mL⁻¹ dans H₂SO₄ 5mM, sont alors additionnés. Après centrifugation, durant 2min à 10 000 rpm, 20 μ L de surnageant sont injectés sur une colonne Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm, BioRad, USA) protégée par une pré-colonne Micro-Guard (BioRad, USA). L'élution est réalisée en mode isocratique par H₂SO₄ 5mM à un débit de 0,6mL.min⁻¹ et à une température régulée à 35°C. L'éluat est analysé par deux détecteurs : un détecteur absorptiométrique modèle 486 (WATERS) réglé à 215nm et un réfractomètre différentiel modèle RI detector 486 (Kontron Instruments), placé en série à la sortie du précédent. L'acquisition des données est réalisée par une station Millennium³² (WATERS). L'analyse qualitative est obtenue par comparaison des temps de rétention relatif, par rapport à l'étalon interne, des solutés inconnus avec ceux de solutés étalon analysés dans des conditions expérimentales identiques. L'analyse quantitative est effectuée en se référant à des courbes étalon établies, pour chaque AGCC, dans les mêmes conditions. Le résultat est exprimé en mg de AGCC par mL de milieu de culture.

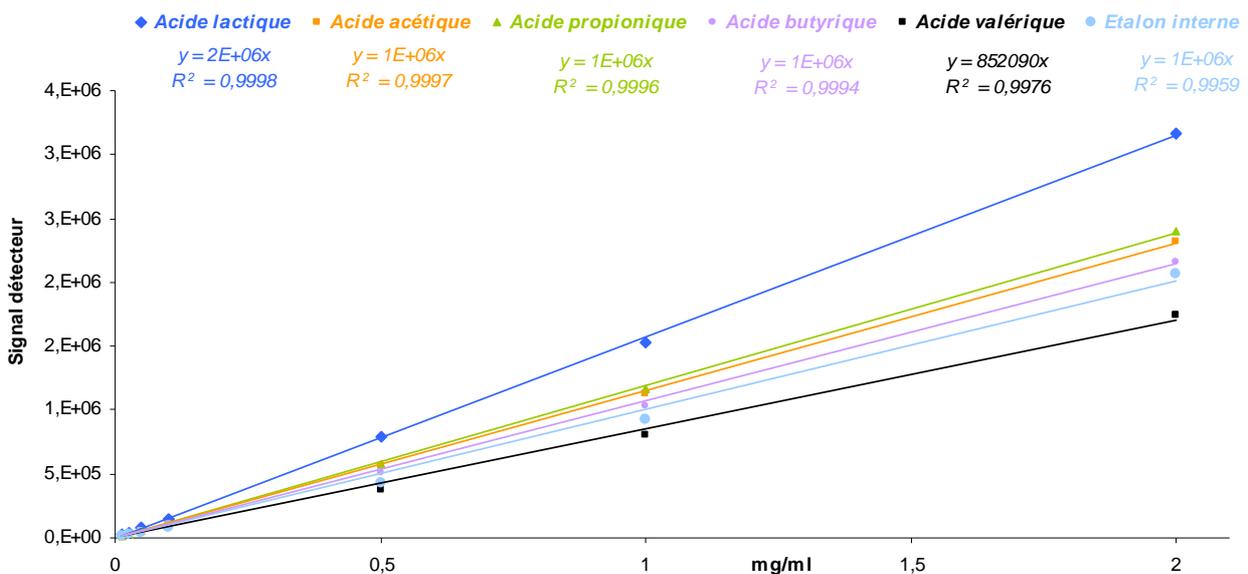


Figure 77 : Etalonnage de la colonne Aminex par les acide gras à chaîne courte et l'acide lactique.

IV 5 Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS : SDS-PAGE

IV 5 1 Préparation de l'échantillon

Environ 20µg équivalent protéines sont repris par 30µL de tampon échantillon à pH 6,8 (Tris-HCl 62,5mM + SDS 2% pds/vol + glycérol 20% pds/vol + bleu de bromophénol 0,025% pds/vol) puis traité à 100°C au bain marie pendant 3min.

IV 5 2 Séparation électrophorétique

Les protéines présentes dans l'échantillon traité à 100°C en présence de SDS sont séparées par électrophorèses sur gel de polyacrylamide à 12% à l'aide du système X-Cell, décrit au paragraphe I 4 de ce chapitre, dans un tampon Tris-glycine (Tris 25mM, glycine 192mM, SDS 0,1% pds/vol, pH 8,3) selon LAEMMLI (1970). L'épaisseur du gel de polyacrylamide est fixée à 1,5mm. La séparation est réalisée sous tension constante fixée à 125V. Après la migration électrophorétique, le gel est coloré par une solution de bleu de Coomassie à 0,1% pds/pds dans un mélange éthanol / eau / acide acétique glacial dans les proportions 40/50/10 vol/vol/vol. le processus de coloration est réalisé en deux étapes successives :

- Incubation du gel dans la solution de coloration pendant 2min au four à microondes réglé sur 300W,
- Incubation pendant 30min sous agitation à température ambiante.

La décoloration est obtenue par immersion du gel dans une solution d'éthanol / eau / acide acétique à 40/50/10 pendant 2h sous agitation lente suivie d'une deuxième décoloration dans éthanol / eau / acide acétique à 5/88/7 (vol/vol/vol) pendant une nuit à température ambiante

V Evaluation de l'activité biologique

V 1 Les souches bactériennes utilisées

Des souches de différentes origines ont été utilisées au cours cette étude.

- *Lactobacillus* : *Lactobacillus plantarum* 299v, Probiotique humain commercialisé par Probi AB, Suède.
- *Bifidobacterium* : *Bifidobacterium longum* (CIP 64.62, Institut Pasteur, France), isolé à partir de muqueuses intestinales humaines (adulte).
- *Clostridium butyricum* : Probiotique humain commercialisé sous la référence Biobaby, Ildong Pharm Co LTD, Corée.
- *Bacillus cereus* isolée à partir de Probiotique humain commercialisé au Vietnam.

Chacune de ces souches bactériennes est conservée sur microbille, à -80°C.

V 2 Les milieux de cultures standards

Les milieux de cultures sont utilisés sous forme de bouillon ou de milieux gélosés (agar à 17g.L⁻¹). Tous les constituants sont de qualité microbiologique et sont fournis par Fluka (Suisse).

V 2 1 Milieu MRS pour *Lactobacillus*

Pour *Lactobacillus plantarum*, le milieu utilisé est le MRS (de Man Rogosa Sharpe). Il est constitué de 10g.L⁻¹ de peptone, 8g.L⁻¹ d'extrait de viande, 4g.L⁻¹ d'extrait de levure, 20g.L⁻¹ de glucose, 2g.L⁻¹ de phosphate dipotassique, 5g.L⁻¹ d'acétate de sodium, 2g.L⁻¹ de citrate d'ammonium, 0,2g.L⁻¹ de sulfate de magnésium (heptahydrate), 0,04g.L⁻¹ de sulfate de manganèse (monohydrate) et de 1mL.L⁻¹ de tween 80, le pH final est de 7. Avant utilisation le milieu est autoclavé 15min à 121°C.

V 2 2 Milieu M20 pour *Bifidobacterium*

Pour *Bifidobacterium longum*, le milieu M20 (appellation Pasteur) est constitué de 30g.L⁻¹ de tryptone, de 20g.L⁻¹ d'extrait de levure, de 0,5g.L⁻¹ de L-cystéine chlorohydrate, de 5g.L⁻¹ de glucose et de 25ml.L⁻¹ d'une solution d'hémine (0,1g hémine, 4mL de triétanolamine, 96mL d'eau ultra pure), le pH étant de 7. Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15min.

V 2 3 Milieu TS pour *Clostridium*

La souche *Clostridium butyricum* est cultivée sur milieu classique Trypticase Soja (TS). Il est constitué de 17g.L⁻¹ de digestion pancréatique de caséine, 3g.L⁻¹ de farine de soja, 2,5g.L⁻¹ de glucose, 5g.L⁻¹ de NaCl et de 2,5g.L⁻¹ de phosphate dipotassique. Le pH final est de 7,3. Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15min.

V 2 4 Milieu MH pour *Bacillus*

La souche de *Bacillus cereus* est cultivée sur milieu Mueller Hinton (MH), constitué d'extrait de bœuf 2g.L⁻¹, d'hydrolysate de caséine 17,5g.L⁻¹, d'amidon* soluble à 1,5g.L⁻¹. Le pH est ajusté à 7,5 et le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15min. La culture est placée sous agitation orbitale à 125 rpm à 30°C.

* Le milieu MH peut aussi être préparé sans amidon.

V 3 Préparation des inoculums

Pour chaque série de test de croissance, une microbille, supportant la souche bactérienne choisie, est placée dans 3mL de milieu spécifique stérile, puis le tube est mis à l'étuve à 37°C, en aérobiose pour *Lactobacillus* dans le MRS, en anaérobiose pour *Bifidobacterium* dans le M20 ou, pour *Clostridium* dans le milieu TS et à 30°C en aérobiose pour *Bacillus cereus* dans le MH. L'anaérobiose est réalisée à l'aide de sachets générateurs (GasPak, avec catalyseur au palladium, Becton Dickinson, USA) placés dans une jarre prévue à cet effet. L'absence d'oxygène est

contrôlée par un témoin d'anaérobiose. Après 24h, le milieu de culture est agité, 1mL est prélevé puis remis en suspension dans 3mL de milieu spécifique stérile. Après 24h d'incubation, cette deuxième préculture est diluée par un volume adéquat de milieu spécifique stérile sans source carbonée puis utilisée comme inoculum dans les tests de croissance.

V 4 Test de croissance

V 4 1 Préparations des milieux de culture

Les tests sont effectués en milieu liquide. Pour chacune des souches étudiées, le milieu spécifique est reconstitué en substituant le glucose par la source carbonée dont on souhaite étudier l'effet sur la croissance du probiotique, la liste des sources carbonées testées est indiquée dans le **tableau 48** ci-après.

Le milieu de culture spécifique (MRS, M20, MH ou TS) est reconstitué sans glucose et à une concentration finale pour tous les ingrédients 1,2 fois supérieure à la valeur normale. Après autoclavage pendant 15min à 121°C, la quantité de source de carbone nécessaire à la croissance du microorganisme est dissoute dans 2mL d'eau ultra pure puis additionnée à 10mL de milieu spécifique stérile. La solution est homogénéisée puis filtrée stérilement sur membrane 0,22µm (Millipore). Le milieu de culture stérile est réparti en fraction de 1,8mL dans des tubes en verre stériles de 5mL.

V 4 2 Le test de croissance

A partir de la deuxième préculture (cf. §V 3), une dilution au 10^{ème} dans le milieu stérile sans source carbonée est réalisée, puis un prélèvement de 0,2mL de cette dilution est ajouté au 1,8mL de milieu de culture préparé précédemment (§V 4 1). Après homogénéisation, les milieux de cultureensemencés sont placés à l'étuve à 37°C ou 30°C pour *Bacillus cereus*, en anaérobiose pour *Bifidobacterium longum* et *Clostridium butyricum* et en aérobie pour les autres souches. Le suivi de croissance se fait par mesure de la densité optique à 570nm (moyenne réalisée sur trois tubes identiques) de la culture sur chaque source de carbone, à intervalles de temps réguliers. La valeur moyenne de la densité optique obtenue est traduite en nombre de bactéries (UFC.mL⁻¹ unité formant colonies) à l'aide d'une droite d'étalonnage préalablement établie pour chacune des souches testées.

Tableau 48 : Liste des sources carbonées pour l'étude de l'effet sur la croissance des différentes souches bactériennes.

Souches Bactériennes	Sources carbonées utilisées
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Glucose
	Fructose
	Xylose
	FOS RP95
	AXOS 1 de blé, de seigle et de maïs
<i>Bifidobacterium longum</i>	Glucose
	Fructose
	Xylose
	Arabinose
	Xylobiose
	Inuline
	FOS RP95
AXOS 1 de blé, de seigle et de maïs AXOS 2 de blé, de seigle et de maïs	
<i>Clostridium butyricum</i>	Glucose
	Fructose
	Xylose
	Arabinose
	Inuline
	FOS RP95
AXOS 1 et 2 de blé, de seigle et de maïs	
<i>Bacillus cereus</i>	Arabinose
	Xylose
	FOS RP95
	AXOS 2 de blé, de seigle et de maïs

V 5 Test d'adhésion sur mucine gastrique

V 5 1 Préparation des puits

Le protocole est adapté de la méthode de VISHWANATH (1984) mise au point sur *Pseudomonas aeruginosa*. Le test est réalisé sur microplaque de polystyrène 96 puits (Nunc, Danemark). Chaque puits servant pour le test est recouvert par 100µL d'une solution de mucine de type III d'estomac de porc (Sigma, France) à 10mg.mL⁻¹. La solution de mucine est préparée après une étape de purification du produit commercial, par une double précipitation à l'éthanol 60% vol/vol à froid puis une lyophilisation du précipité (d'après GLENISTER, 1988). La plaque est incubée 14h à 4°C. Les puits sont ensuite lavés 2 fois par 200µL de PBS (NaCl 8g.L⁻¹, KCl 0,2g.L⁻¹, KH₂PO₄ 0,2g.L⁻¹, Na₂HPO₄ 1,15g.L⁻¹) pour enlever l'excès de mucine et recouvert par 200µL d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma, France) à 2% pds/vol pendant 4h à 4°C. Cette étape a pour but d'enduire complètement le fond du puits de manière à éviter une adhésion des cellules sur le plastique. Les puits sont à nouveau lavés 2 fois par 200µL de PBS pour enlever l'excès de BSA. Trois puits sont utilisés par échantillon.

V 5 2 Préparation des cultures

1mL d'une culture de *Bacillus cereus* incubée 16h à 30°C en milieu MH est centrifugée à 6000 rpm pendant 5min à 4°C. Le culot est lavé deux fois dans 1mL de PBS puis centrifugé à nouveau. Le culot résultant est alors suspendu dans du PBS et dilué de manière à atteindre une DO 600nm de ≈ 0,10, 100µL de cette suspension sont introduits dans chaque puits et la plaque est incubée 1h à 37°C. La suspension contenant les bactéries libres est éliminée par pipetage. Chaque puits est ensuite lavé 12 fois par 200µL de tampon PBS afin d'enlever les cellules qui n'ont pas adhéré à la mucine. La désorption est réalisée à l'aide de 200µL d'une solution de triton X100 (Sigma, France) à 0,5% vol/vol. la plaque est incubée 20min à température ambiante sous agitation. Les bactéries contenues dans les 200µL sont dénombrées par numération sur boîte MH – agar. L'efficacité de l'adhésion est exprimée par le nombre d'UFC, contenues dans le puits et ayant adhérees à la mucine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de la dernière décennie, le concept d'alimentation fonctionnalisée a connu un essor considérable. L'association, dans une base alimentaire généralement lactée, de microorganismes vivants qualifiés de probiotiques et/ou de substances oligosaccharidiques dénommées prébiotiques, susceptibles de produire un effet bénéfique sur la santé de l'hôte dépassant le simple apport nutritionnel, suscite l'intérêt tant au niveau commercial que scientifique. Les grands groupes mondiaux leaders de l'agroalimentaire se sont appropriés ce concept et développent actuellement une importante stratégie marketing afin de sensibiliser le consommateur à l'intérêt de cette nouvelle forme d'alimentation. Toutefois aucun des arguments publicitaires mis en avant ne peut être viable à moyen terme si il n'est réellement étayé et conforté par des études scientifiques sérieuses. Celles-ci deviennent nombreuses depuis la fin des années 90. Elles concernent aussi bien la recherche de nouvelles souches microbiennes capables de survivre dans les conditions micro-environnementales du tractus gastro-intestinal, pour y manifester leurs effets bénéfiques, que la production de structures oligosaccharidiques originales pouvant moduler favorablement l'activité et/ou la croissance de la flore microbienne endogène, notamment au niveau du côlon de l'hôte.

C'est dans ce cadre général et plus particulièrement celui concernant la recherche d'oligosaccharides d'intérêt prébiotiques, que nous avons expertisé la faisabilité de leur production, à partir de sons de céréales, sous-produits de l'industrie minotière. Les sons de blé et de seigle contiennent environ 45% pds/pds de polysaccharides non amidonnés. Ils constituent une source qu'il est intéressant de valoriser en extrayant les substrats de base à partir desquels nous avons étudié la possibilité de produire, au travers d'un processus hydrolytique contrôlé, des oligosaccharides de faible degré de polymérisation. Parmi les polymères glucidiques autre que l'amidon, nous avons choisi d'extraire la fraction arabinoxylane (AX) qui en représente la majeure partie ($\approx 70\%$).

En utilisant un procédé classique de délignification des sons bruts suivi d'un traitement à chaud en milieu alcalin, nous avons isolé une fraction enrichie en arabinoxyanes. Celle-ci a été purifiée par extraction en phase solide, sur échangeur d'anions, afin d'éliminer sélectivement des contaminants polyphénoliques ainsi que des arabinoxyanes anioniques, non adaptés à l'application ultérieure envisagée, car difficilement métabolisables par les bactéries du tractus intestinal. La fraction polysaccharidique neutre ou très faiblement chargée, recueillie à l'issue d'un tel procédé,

représente 7 à 10% pds/pds du son brut respectivement pour le seigle et le blé, soit un tiers des arabinoxylyanes initialement présents dans les sous-produits de minoterie. La faiblesse du rendement d'extraction est justifiée par une solubilisation incomplète des polysaccharides au cours du traitement alcalin ainsi que par l'élimination de la fraction arabinoxylyane anionique à l'issue de l'étape d'échange d'ions. L'importance du rapport A/X, voisin de 1 pour les arabinoxylyanes purifiés, témoigne d'un taux de ramification élevé des chaînes de xylanes, caractéristique d'une appartenance aux couches d'hémicelluloses les plus externes du péricarpe des grains d'origines.

La mise en œuvre d'un processus hydrolytique unique a été testé afin de dépolymériser les AX purifiés en arabinoxylooligosaccharides (AXOS) de faibles DP. L'utilisation d'acide trifluoroacétique à des concentrations et des températures compatibles avec la stabilité des structures des pentoses constitutifs des polymères, ne permet pas de concilier un fort degré d'hydrolyse, nécessaire à l'obtention des AXOS, sans libération concomitante d'une part importante de monosaccharides, préjudiciable au rendement. Le taux de substitution élevé des chaînes de xylanes, entre autre par l'arabinose, est un facteur limitant l'accès des sites de clivage des liaisons $\beta(1-4)$ aux xylanases testées lors des essais d'hydrolyse enzymatique directe des AX. L'addition d'arabinofuranosidase n'augmente pas sensiblement l'efficacité des xylanases. Dans tous les cas, les rendements en AXOS d'intérêt n'excède pas 10% quel que soit le mode d'hydrolyse choisi.

En prenant le parti de combiner les deux processus hydrolytiques, chimique puis enzymatique, nous avons montré qu'il était possible de surmonter partiellement les difficultés rencontrées. Cependant, l'optimisation rationnelle d'un tel procédé impliquant un nombre considérable de paramètres interdépendants a nécessité la mise en place d'une approche par plan d'expériences. Le procédé de production d'AXOS peut être scindé en deux processus consécutifs. Le premier d'entre eux, l'hydrolyse chimique par le TFA, a fait l'objet d'une optimisation impliquant la construction d'un plan d'expériences utilisant un réseau uniforme de Doehlert à 3 facteurs ([TFA], durée et température) pour équirépartir les essais dans le domaine expérimental dont nous avons fixé les limites. L'exploration du domaine a nécessité seulement la mise en œuvre de 13 essais d'hydrolyse, dont nous avons quantifié les performances par HPSEC couplée à un détecteur à diffusion de lumière. Cette technique rapide est bien adaptée au suivi de la dégradation des polymères AX, de la production d'AXOS et de celle des monosaccharides, et permet la quantification de ces trois familles moléculaires constituant les réponses mesurées au cours des différents essais. L'exploitation des résultats et notamment la transformation des réponses mesurées

en fonctions de désirabilité, individuelles puis globale, nous a permis de construire un modèle mathématique de type polynôme du second degré, dont les coefficients ont été déterminés. Ce modèle, ayant un caractère descriptif et prédictif acceptable, a rendu possible l'exploration numérique du domaine expérimentale pour la recherche d'un optimum de fonctionnement du processus d'hydrolyse chimique. La validité puis la robustesse des conditions optimales proposées par le modèle ([TFA] = 0,16M à 80°C pendant 2h) ont été vérifiées expérimentalement. Ces conditions opératoires sont originales et malgré notre connaissance du procédé, nous ne serions pas allés intuitivement dans une telle direction, ce qui constitue l'un des apports majeurs de cette approche. L'hydrolyse de la fraction AX purifiée, dans les conditions expérimentales optimisées, conduit à l'obtention d'une fraction oligosaccharidiques représentant $\approx 50\%$ pds/pds du substrat initial. La libération de monosaccharides est toutefois inévitable et importante, puisqu'elle atteint 45% de la masse de substrat.

L'élimination sélective des monosaccharides par ultrafiltration sur membrane, dont le seuil de coupure est fixé à 3kDa, a été étudiée et optimisée. L'utilisation du système à membrane à perméabilité sélective, en mode diafiltration discontinue, incluant deux étapes successives de concentration/dilution, autorise l'élimination de 90% de l'arabinose et xylose libres, présents dans l'hydrolysate chimique. Compte tenu du seuil de coupure de la membrane, la fraction perméat contient également des AXOS de faible DP, représentant environ 10% des oligosaccharides engendrés au cours de la dépolymérisation des AX. Ce constat nous a conduit à considérer le perméat de l'étape de diafiltration comme une fraction, identifiée AXOS 2, présentant un intérêt prébiotique potentiel.

Les arabinoxylooligosaccharides issus du processus n°1 d'hydrolyse chimique par le TFA possèdent une distribution de degré de polymérisation comparable à celle de l'inuline et par conséquent trop élevée pour répondre au critère de taille ($2 < DP < 10$) auquel doit répondre un prébiotique. Afin de satisfaire cette exigence, nous avons construit un second plan d'expérience, au cours duquel les conditions optimales d'hydrolyse enzymatique des AXOS de DP élevé ont été déterminées. Compte tenu du caractère discontinu du domaine expérimental, lié à la présence du facteur nature de la ou des enzymes mises en œuvre, nous avons choisi un modèle additif pour explorer celui-ci. La construction de la matrice d'expériences incluant 12 essais, puis la réalisation de ceux-ci, ont permis l'estimation des coefficients du modèle et l'utilisation de celui-ci pour prévoir l'effet moyen de la variation de chaque facteur (nature et concentration des enzymes, durée

du traitement) sur le taux d'AXOS de faible DP et de monosaccharides dans l'hydrolysat enzymatique. Ces deux grandeurs constituent les réponses mesurées par HPSEC. Une telle démarche nous a conduit à la détermination des conditions optimales, impliquant l'utilisation couplée d'une xylanase et de l'arabinofuranosidase, pour la production d'une fraction oligosaccharidique de faible DP, identifiée AXOS 1 et ceci sans libération concomitante de monosaccharides. Le double processus hydrolytique appliqué aux AX purifiés de blé, de seigle ou de maïs, dans les conditions optimales définies par les deux plans d'expériences et avec une diafiltration intermédiaire, conduit à l'obtention de deux fractions oligosaccharidiques d'intérêt identifiées AXOS 1 et AXOS 2.

La caractérisation physico-chimique de ces fractions a été réalisée, en combinant l'utilisation des outils CPG, HPSEC, HPLC en phase normale et spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF et ESI pour l'établissement de leur distribution sur le double critère taille et composition osidique. Des oligosaccharides de DP compris entre 5 et 20 constituent la fraction AXOS 1, avec la présence majoritaire d'oligomères contenant 5 à 10 résidus osidiques. L'interprétation des spectres de masse obtenus en mode MALDI, après simplification du mélange par HPSEC a permis d'identifier au moins 6 familles moléculaires pour un même nombre de résidu. Parmi celles-ci, on trouve des oligopentoses, des oligopentoses substitués par un résidu galactose, acide glucuronique ou bien par le dérivé 4-O-méthyle de ce dernier. Enfin, la présence d'oligopentoses doublement substitués par deux galactoses ou encore par un galactose et un acide glucuronique est mise en évidence puis est confirmée par des analyses, en mode MS-MS, des spectres de masse induits par collision des principaux ions moléculaires représentatifs des différentes familles.

La présence d'acide glucuronique et de galactose dans les AXOS 1 est en accord avec les compositions osidiques des AX de sons de céréales étudiés et publiés dans la littérature. Toutefois le mode de préparation des AX, incluant une étape d'extraction en phase solide sur échangeur d'anions, n'a pas conduit à l'élimination complète des forme anioniques comme en témoigne la présence d'oligosaccharides substitués par l'acide glucuronique.

La composition de la fraction AXOS 2 est moins complexe. Celle-ci est principalement constituée de pentoses, notamment l'arabinose, d'oligopentoses et d'oligopentoses monosubstitués par un résidu galactose, présentant des DP compris entre 2 et 5.

Les deux mélanges d'arabinoxyloligosaccharides ainsi caractérisés ont été testés sur les critères de leur capacité à stimuler la croissance de différentes bactéries probiotiques reconnues

ainsi que leur capacité à induire la production d'acides gras à chaîne courte, sur ces mêmes souches. Quatre souches probiotiques cibles ont été mises en œuvre, elles appartiennent à des genres bactériens qui sont des commensaux du tractus intestinal. Lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu où la source carbonée glucidique est apportée sous la forme d'AXOS 1 ou AXOS 2, elles manifestent différentes capacités de croissance, qui sont comparées à celle obtenues en présence de FOS RP95, prébiotique de référence, dans les mêmes conditions expérimentales. Les AXOS 1 stimulent de manière significative la croissance de la souche *Lactobacillus plantarum* 299v, avec une efficacité toutefois inférieure à celle du mélange de FOS RP95. Cette même fraction AXOS 1 est sans effet sur les trois autres souches testées.

Les AXOS 2, exempts d'oligosaccharides substitués par l'acide glucuronique, possédant des DP inférieurs ou égaux à 4, présentent plus d'intérêt. Ils produisent un effet positif sur la croissance des souches *Bifidobacterium longum*, *Clostridium butyricum* et *Bacillus cereus*. La stimulation de croissance observée sur *Bifidobacterium longum*, après 22h de culture est comparable à celle induite par les FOS RP95. Cependant cet effet peut être en partie attribué à la présence d'arabinose libre dans la fraction AXOS 2. *Clostridium butyricum* croît faiblement lorsqu'il est cultivé sur un milieu où la source carbonée est apportée sous la forme d'oligosaccharides. Toutefois les AXOS 2, et plus particulièrement ceux issus de blé, produisent un effet positif significatif et supérieur à celui mesuré pour les FOS RP95 et ceci tant au niveau de la croissance que de la production d'acide butyrique. L'évolution de la population bactérienne au cours du temps, estimée seulement par le biais d'une mesure d'absorbance, reste cependant difficile à interpréter. L'augmentation d'absorbance observée au cours des 30 premières heures de culture est probablement principalement attribuable à un changement de morphologie des cellules bactériennes. Nous ne disposons d'aucun élément permettant d'expliquer ce phénomène.

C'est certainement vis à vis de la souche probiotique *Bacillus cereus* que les AXOS 2 présentent le plus d'intérêt. Si ceux-ci produisent un effet sur la croissance, comparable à celui induit par les FOS RP95, ils sont capables de stimuler la sporulation de la même bactérie avec une efficacité 2,5 fois supérieure à celle observée pour la référence prébiotique FOS. Ce constat est important dans le cadre d'une application industrielle, puisque les probiotiques du genre bacillus sont utilisés sous la forme sporulée. De plus, lorsque *Bacillus cereus* est cultivé sur un milieu enrichi en AXOS 2 de seigle, la bactérie manifeste une capacité d'adhésion à la mucine gastrique, mesurée lors de test *in vitro*, 3 fois supérieure à celle observée lors d'une culture sur milieu FOS. L'extraction sélective des protéines présentes à la surface de la bactérie cultivée sur AXOS 2 de

seigle, suivi de leur analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, met en évidence la surexpression d'une protéine de type S-layer, non observée lors de la culture de la même bactérie sur milieu sans addition d'AXOS 2. Même si ces dernières observations résultent d'un nombre limité d'expériences, elles n'en demeurent pas moins très intéressantes. En effet, la bactérie probiotique, pour manifester son rôle bénéfique au niveau du tractus intestinal, doit pouvoir y séjourner pendant une période suffisamment longue et ceci peut être facilité par sa capacité d'adhésion accrue sur les constituants de la muqueuse intestinale.

En guise de conclusion générale, l'un des apports principaux de cette étude, très pluridisciplinaire et pionnière menée au LCSN, réside dans la définition et la mise en place d'une démarche rationnelle avec l'ensemble des outils nécessaires pour aborder la production d'oligosaccharides d'intérêt prébiotique et ceci quelle que soit l'origine des substrats polysaccharidique qui pourraient être traités.

Les perspectives immédiates de ce travail concernent la compréhension des effets d'AXOS 2 sur la sporulation et l'expression des protéines de surface chez *Bacillus cereus*. Cela nécessitera une double approche incluant une expertise approfondie de la composition moléculaire du mélange d'oligosaccharides et un fractionnement à l'échelle préparative des principaux constituants. L'utilisation du couplage LC/MS en tandem apportera des compléments d'information précieux sur la nature des constituants d'AXOS 2. Cependant seule la RMN permettra d'élucider leurs structures et notamment les sites de substitution des chaînes de xyloxygènes. L'approche RMN ne sera envisageable qu'à partir du moment où nous serons en mesure de produire en quantité suffisante (quelques dizaines de mg) des fractions peu complexes à partir des AXOS 2. Le fractionnement ne sera pas seulement nécessaire pour l'étude structurale, il sera indispensable pour poursuivre l'expertise des effets induits sur la sporulation et la biosynthèse de S-layer chez *Bacillus cereus*. L'attribution des effets mesurés sur la bactérie impliquera de procéder à de nouveaux essais de croissance en utilisant des fractions simplifiées d'AXOS 2, parfaitement identifiées au niveau de leur contenu en espèces moléculaires oligosaccharidiques. Au cours de cette seconde phase expérimentale, nous devons également nous donner les moyens de suivre l'évolution, au cours de la fermentation, des concentrations de chacune des espèces moléculaires oligosaccharidiques additionnées au milieu de culture de la bactérie probiotique.

A moyen terme, le caractère adaptable de la méthodologie de production d'oligosaccharides de DP contrôlé, nous permettra d'envisager son application au traitement d'autres fractions

hémicellulosiques de sons de céréales. A titre d'exemple une extraction à chaud en milieu aqueux donnerait accès à des arabinoxylanes hydrosolubles. Ceux-ci, moins fortement substitués que les AX qui ont fait l'objet de notre travail, doivent posséder une meilleure aptitude à être métabolisés par les bactéries et de ce fait un caractère prébiotique accru. La même approche pourrait être adaptée aux hémicelluloses de la couche d'aleurone dont le rapport A/X est voisin de 0,3 donc parfaitement compatible avec une activité prébiotique potentielle. Cependant, l'extraction sélective d'une telle fraction à partir de céréales induirait des coûts qui pourraient ne plus être en accord avec l'objectif initial de valorisation des sous-produits.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- ADAMS G.A., **1955**. Constitution of a hemicellulose from wheat bran. *Can. J. Chem.* Vol.33, pp. 56-67.
- ALANDER M., SATOKARI R., KORPELA R., SAXELIN M., VILPOONEN-SALMELA T., MATTILA-SANDHOLM T. et Von WRIGHT A., **1999**. Persistence of colonization of human colonic mucosa by probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus GG*, after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 65, pp. 351- 354.
- ALLES M.S., HARTEMINK R., MEYBOOM S., HARRYVAN J.L., VAN LAERE K.M.J. et NAGENGAST F.M., **1999**. Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microflora and on putative risk markers for colon cancer. *Am J Clin Nut.*, Vol. 69, pp. 980-991.
- ALLES M.S., HAUTVAST J.G.A.J., NAGENGAST F.M., HARTEMINK R., VAN LAERE K.M.J. et JANSEN J.B.M., **1996**. Fate of fructo-oligosaccharides in the human intestine. *Br J Nutr*, Vol. 76, pp. 211–221.
- AMAN P., NILSSON M., et ANDERSSON R., **1995**. Chemical composition of rye grain. Dans : POUTANEN K. et AUTIO K. (eds.), *VTT Symposium 161, International rye symposium: Technology and products*, Helsinki, Finland, 7-8 December 1995. Espoo: VTT. pp.33-38.
- ANDERSON J.W., HANNA T.J., PENG X., et KRYSCIO R.J., **2000**. Whole grain food and heart disease risk. *J.Am. Coll. Nutr.* Vol.19, pp. 291S - 299S.
- ANNISON G., CHOCT M. et CHEETHAM N.W., **1992**. Analysis of wheat arabinoxylans from a large-scale isolation. *Carbohydrate*, Vol. 19, pp. 151 – 159.
- ANTOINE C., LULLIEN-PELLERIN V., ABECASSIS J., et ROUAU X., **2002**. Intérêt nutritionnel de la couche à aleurone du grain de blé. *Sciences des Aliments*, Vol.22, pp. 545 - 556.
- ARAKI Y., ANDOH A., FUJIYAMA Y., KANAUCHI O. et BAMBA T., **2000**. Effects of germinated barley foodstuff on microflora and short chain fatty acid production in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Biosci. Biochem.*, Vol. 64, pp.1794 - 1800.
- ASP N.G., BJÖRCK I., et NYMAN M., **1993**. Physiological effects of cereal dietary fibre. *Carbohydr. Polymers*, Vol. 21, pp. 183 - 187.
- ASPINALL G.O., **1959**. Structural chemistry of the hemicellulose. *Adv. Carbohydr. Chem.* Vol 14, pp. 429 - 468.

ATKINS E.D.T., **1992**. Three-dimensional structure, interactions and properties of xylans. Dans: *Progress in biotechnology Vol.7. Xylans and xylanases*. VISSER J., BELDMAN G., KUSTERS VAN-SOMEREN M.A. et VORAGEN A.G.J. (eds) 39-50. ELSEVIER Sciences Publishers, Amsterdam.

AURA A. M., KARPPINEN S., VIRTANEN H., FORSELL P., HEINONEN S.M., NURMI T., ADLERCREUTZ H. et POUTANEN K., **2005**. Processing of rye bran influences both the fermentation of dietary fibre and bioconversion of lignans by human faecal flora in vitro. *J. of the Sci. of food and Agriculture*. Vol. 85, pp. 2085 - 2093.

B

BACH KNUDSEN K.E. et HESSOV I., **1995**. Recovery of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in the small intestine of man. *Br J Nutr*, Vol. 74, pp. 101 –103.

BACH KNUDSEN K.E., **1997**. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Animal feed Sci. Technol.* Vol. 67, pp.319 - 338.

BACH KNUDSEN K.E., JENSEN B.B., et HANSEN I., **1993**. Digestion of polysaccharides and other major components in the small and large intestine of pig fed diets consisting of oat fractions rich in β - D - glucan. *Br. J. Nutr.*, Vol. 70, pp. 537 - 556.

BALLONGUE J., GRILL J.P. et BARATTEUOLOGE P., **1993**. Effects of Bifidobacterium fermented milks on human intestinal flora. *Lait*, Vol. 73, pp. 249 - 256.

BARC M.C., BOURLIOUX F., RIGOTTIER-GOIS L., CHARRIN-SARNEL C., JANOIR C., BOUREAU H., DORE J. et COLLINGNON A., **2004**. Effect of amoxicillin-clavulanic acid on human fecal flora in a gnotobiotic mouse model assessed with fluorescence hybridization using group-specific 16S rRNA probes in combination with flow cytometry. *Antimicrob. Agents Chemother*, Vol. 48, pp. 1365 – 1368.

BARL B., BILIADERIS C.G., MURRAY E.D. et Mac GREGOR A.W., **1991**. Combined chemical and enzymic treatments of corn husk lignocellulosics. *J. Sci. Food Agric*. Vol. 56, pp. 195 - 214.

BASIC A. et STONE B.A., **1981**. Chemistry and organisation of aleurone cell wall components from wheat and barley. *Aust J. Plant Physiol.* Vol. 8, pp. 475 - 495.

BATAILLON M., MATHALY P., CAROLINALI N.A.P. et F DUCHIRON, **1998**. Extraction and purification of arabinoxylan from destarched wheat bran in a pilot scale. *Industrial Crops and Products*, Vol. 8, pp 37 – 43.

- BEAUGRAND J., CHAMBAT G., WONG V.W.K., GOUBET F., REMOND C., PAES G., BENAMROUCHE S., DEBEIRE P., O'DONOHUE M. et CHABBERT B., **2004**. Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. *Carbohydr. Res.*, Vol. 339, pp. 2529 – 2540.
- BELLISLE F., DIPLOCK A.T., HORNSTRA G., KOLETZKOS B., ROBERFROID M., SALIMINEN S. et JARIS W.H.M., **1998**. Fonctionnal food in Europe. *BR. J. Nutrit.*; 80, S1 - S193.
- BENGTSSON S. et AMAN P. **1990**. Isolation and chemical characterization of water- soluble aralinoylans in rye grain. *Carbohydr Polymers*, Vol. 12, pp. 267 - 277.
- BENNO Y., ENDO K., SHIRAGAMI N., SAYAMA K. et MITSUOKA T., **1987**. Effects of raffinose intake on human faecal microflora. *Bif. Microflora*, Vol.6, pp. 59 - 63.
- BIEDLY P., **1985**. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.*, Vol. 3, pp. 286–290.
- BIELY P., MARKOVIC O. et MISLOVICOVA D., **1985**. Sensitive detection of endo-1,4- β -xylanases in gels. *Anal. Biochem.*, Vol. 144, pp. 147 – 151.
- BLUMENKRANTZ N. et ASBOE-HANSEN G., **1973**. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, Vol. 54, pp. 484 – 489.
- BOLOGNANI F., RUMNAY C.J. et ROWLAND I.R., **1997**. Influence of carcinogen binding by lactic acid producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. *Food Chem. Toxicol.*, Vol. 35, pp. 535 - 545.
- BORRUEL N., CAROL M., et CASELLAS F., **2002**. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be down regulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut*, Vol. 51, pp. 659 - 664.
- BOUDREAU A. et MENARD G., **1992**. Le blé, elements fondamentaux et transformation. *Les presses de l'Université de Laval*, Sainte – Foy.
- BOUHNİK Y., FLOURIE B., D'AGAY-ABENSOUR L., POCHART P., GRAMET G. et DURAND M., **1997**. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *J Nut.*, Vol. 127, pp. 444 - 448.
- BOUHNİK Y., POCHART P., MARTEAU P., ARLET G., GODEREL I. et RAMBAUD J.C., **1992**. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium sp.* ingested in fermented milk. *Gastroenterology.*, Vol. 102, pp. 875 - 878.

- BOX G.E.P. et BEHNKEN D.W., **1960**. Some new three level designs for the study of quantitative variables, *Technometrics*, Vol. 2, pp. 455 - 475.
- BOX G.E.P. et WILSON K.B., **1951**. On the experimental attainment of optimum conditions, *Journal of the Royal Statistical Society*, Vol. 13, pp. 1 - 45.
- BRIGHENTI F., CASIRAGHI M.C., PELLINGRINI N., RISO P., SIMONETTI P. et TESTOLIN G., **1995**. Comparison of lactulose and inulin as reference standard for the study of resistant starch fermentation using hydrogen breath test. *Ital J Gastroenterol.*, Vol. 27, pp. 122 – 128.
- BRILLOUET J.M. et JOSELEAU J.P. **1987**. Investigation of the structure of a heteroxylan from the outer pericarp (beeswing bran) of the wheat kernel. *Carbohydr.Res.*, Vol. 159, pp. 109 - 126.
- BRILLOUET J.M., JOSELEAU J.P., UTILLE J.P. et LELIEVRE D., **1982**. Isolation, purification and characterization of a complex heteroxylan from industrial wheat bran. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 30, pp. 488 - 494.
- BROBERG S., **2004**. Studies of oligo and polysaccharides by MALDI-TOF and ESI-ITMS mass spectrometry. *Thèse: Univerité de Uppsala Swedish*.
- BRÜLL L., HUISMAN M., SCHOLS H., VORAGEN F., CRITCHLEY G., THOMAS-OATES J. et HAVERKAMP J., **1998**. Rapid molecular mass and structural determination of plant cell wall-derived oligosaccharides using off-line high performance anion exchange chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, Vol. 33, pp. 713 – 720.
- BUCHALA A.J., FRASER C.G. et WILKIE K.B.C., **1972**. An acidic galactoarabinoxylan from the stem of *avena sativa*. *Phytochem.* Vol. 11, pp. 2803 - 2814.
- BUCHANAN C.M., BUCHANAN N.L., DEBENHAM J.S., SHELTON M.C., WOOD M.D., VISNESKI et al., **2002**. Corn fiber for the production of advanced chemicals and materials: Separation of monosaccharides and methods thereof. *US Patent # 6,352,845*.
- BUDDINGTON K.K., DONAHOO J.B. et BUDDINGTON R.K., **2002**. Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. *J. Nutr.*, Vol. 132, pp. 472 - 477.
- BUYDENS P. et DEBEUCKLAERE S., **1996**. Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea: a placebo controlled trial. *Scand. J. Gastroenterol.*, Vol. 31, pp. 887 – 891.

C

- CAMPBELL J.M., FAHEY G.C. et WOLF B.W., **1997**. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J. Nutr.*, Vol. 127, pp. 130 – 136.
- CANDUCCI F., ARMUZZI A., CREMONINI F., CAMMAROTA G., BARTOLOZZI F., POLA P., GASBARRINI G. et GASBARRINI A., **2000**. A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, Vol. 14, pp. 1625 – 1629.
- CARRASCO F. et ROY C., **1992**. Kinetic study of dilute-acid prehydrolysis of xylan-containing biomass. *Wood Sci. Technol.*, Vol. 26, pp 189 - 208.
- CARTMAN S.T., **2004**. Spore probiotics as animal feed supplements. Dans: RICCA E., HENRIQUES A.O., CUTTING S.M. (eds), *Bacterial spore formers*, *Horizon Biosci Publisher*, Wymondham UK, pp. 155 – 161.
- CARVALHEIRO F., ESTEVES M.P., PARAJO J.C., PEREIRA H. et GIRIO F.M., **2004**. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technol.*, Vol. 91, pp. 93 – 100.
- CASCI T., RASTALL R.A. et GIBSON G.R., **2005**. Human gut microflora in health and disease : Focus on prebiotics. *Food Sci. Technol.*, Vol. 148, pp. 1133 – 1166.
- CHANLIAUD E., **1995a**. Thèse : Extraction, caractérisation et propriétés fonctionnelles des hétéroxylanes de son de maïs. ENSIA, Paris, France.
- CHANLIAUD E., SAULNIER L. et THIBAUT J.F., **1995b**. Alkaline extraction and characterization of heteroxylans from maize bran. *J. of Cereal Sci.* Vol. 21, pp. 195-203.
- CHAPLIN M.F., **1982**. A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. Vol. 123, pp. 336 - 341.
- CHARLESWORTH J.M., **1978**. Evaporative analyser as a mass detector for liquid chromatography. *Anal. Chem.*, Vol. 50, pp. 1414 – 1420.
- CHERYAN M., **1998**. Dans: Ultrafiltration and microfiltration Hand book. CHERYAN M. (ed), *Technomic Publishing C.O. Inc*, Lancaster Basel, p. 302.
- CLANCY R., **2003**. Immunototics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, Vol. 38, pp. 9 – 12.

- CLYDESDAL F., **1997**. A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. *Nutit Rev.*, Vol. 55, pp. 413 - 422.
- COCONNIER M.H., LIEVIN V., HEMERY E. et SERVIN A.L., **1998**. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 64, pp. 4573 – 4580.
- COLLINS T., GERDAY C. et FELLER G., **2005**. Xylanases, xylanase family and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, Vol. 29, pp. 3 – 23.
- COLOMBEL J.F., CORTOT A., NEUT C. et ROMOND C., **1987**. Yogurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effects. *Lancet*, Vol. 2, pp. 43.
- COUDRAY C., TRESSOL J., GUEUX E. et RAYSSIGUIER Y., **2003**. Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *Eur. J. Nutr.*, Vol. 42, pp. 91 - 98.
- COURTIN C.M. et DELCOUR J.A., **2001**. Relative activity of endoxylanases toward water-extractable and water-unextractable arabinoxylan. *J. Cereal Sci.*, Vol. 33, pp. 301–312.
- COUTINHO P.M. et HENRISSAT B., **1999**. Carbohydrate-active enzyme server (CAZY) à URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/>.
- CRITTENDEN R., KARPPINEN S., OJANEN S., TENKANEN M., FAGERSTRÖM R., MÄTTÖ J., SAARELA M., MATTILA-SANDHOLM T. et POUTANEN K., **2002**. In vitro fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *J. Sci. Food Agric.*, Vol. 82, pp. 781 - 789.
- CRITTENDEN R., LAITILA A., FORSSELL P., MATTO J., SAARELA M. et MATTILA-SANDHOLM T., **2001**. Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Appl Environ Microbiol.*, Vol. 67, pp. 3469-3475.
- CRITTENDEN R.G. et PLAYNE M.J., **1996**. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 7, pp. 353 - 361.
- CRITTENDEN R.G., **1999**. Prebiotics. Dans: Tannock G. (Ed); *Probiotics: a critical review*. Horizan Scientific Press, Wymondham.
- CSORDAS A., **1995**. Toxicology of butyrate and short-chain fatty acids. In: MJ Ed. *Role of gut bacteria in human toxicology and pharmacology.*, Taylor and Francis, London, pp. 105-25.

CUMMING, J.H. et ENGLYST, H.N. **1995a**. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. *Am. J. Clin. Nutr.* Vol.61, pp. 938S-945S.

CUMMINGS J.H., **1995b**. Short chain fatty acids. Dans: Gibson GR, Macfarlane GT, (eds). *Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology*, CRC Press Boca Raton, FL, pp. 101 – 130.

D

DAVIDSON M.H., MAKI K.C. et SYNECKI C., **1998**. Evaluation of the influence of dietary inulin on serum lipids in adults with hypercholesterolemia. *Nutr.*, Vol.18, pp. 503 - 517.

De VRIES R.P. et VISSER J., **2001**. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Vol. 65, pp. 497 – 522.

De VRIES R.P., KESTER H.C.M., POULSEN C.H., BENEN J.A.E. et VISSER J., **2000**. Synergy between enzymes from Aspergillus involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydr Res.*, Vol. 327, pp. 401 – 410.

DEERY M., STIMSON E. et CHAPPELL C.G., **2001**. Size exclusion chromatography/mass spectrometry applied to the analysis of polysaccharides. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, Vol. 15, pp. 2273 – 2283.

DEGAWA Y., SHIBANUMA K., TAKANO M. et BENNO Y., **2006**. The physiological response and shift of intestinal microbiota in rats fed oligosaccharides from partially-hydrolysed corn fiber. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, Vol. 53, pp. 48 – 54.

DELCOUR J.A., WAN WIN H. et GROBET P.J., **1999**. Distribution and structural variation of arabinoxylans in common wheat mill streams. *J. of Agric and Food chem.*, Vol. 45, pp. 271 - 275.

DERRINGER R. et SUICH R., **1980**. Simultaneous optimization of several response variables, *Journal of Quality Technology*, Vol. 12, pp. 214 - 219.

DESCHMPS F.S., BAILLET A. et CHAMINADE P., **2002**. Mechanism of response enhancement in evaporative light scattering detection with the addition of triethylamine and formic acid. *Analyst.*, Vol. 127, pp. 35 – 41.

DOEHLERT D.H., **1970**. Uniform shell designs. *Journal of the Royal Statistical Society*, Vol. 19, pp. 231 - 239.

- DOMON B. et COSTELLO C.E., **1988**. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj. J.*, Vol. 5, pp. 397- 409.
- DONNER L.W. et HICKS K.B., **1997**. Isolation of hemicellulose from corn fiber by alkaline hydrogen peroxide extraction. *Cereal Chem.*, Vol. 74, pp. 176 - 181.
- DONNER L.W., CHAU H.K.L., FISHMAN M.L. et HICKS K.B., **1998**. An improved process for isolation of corn fiber gum. *Cereal Chem.*, Vol. 75, pp. 408 - 411.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F., **1956**. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chem.*, Vol. 28, pp 350 – 356.
- DUPONT M.S. et SELVENDRAN R.R., **1987**. Hemicellulose polymers from the cell walls of beeswing wheat bran: Part 1, polymers solubilised by alkali at 2°. *Carbohydr. Res.*, Vol. 163, pp. 99 - 113.

E

- EBRINGEROVA A. et HEINZE T., **2000**. Xylan and xylan derivatives biopolymers with valuable properties, I Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Comm.*, Vol. 21, pp. 542 - 556.
- EBRINGEROVA A., et HROMADKVA Z., **2002**. Effect of ultrasound on extractibility of corn bran hemicelluloses. *Ultrasonics Sonochem.*, Vol. 9, pp. 225 - 229.
- EDWARDS C.A. et PARRETT A.M., **1996**. Plant cell wall polysaccharides, gums, and hydrocolloids : nutritional aspects. Dans Eliasson A:C. (ed.) *Carbohydrates in food*. New York, Marcel Dekker, Inc. pp. 319 - 346.
- EDWARDS C.A., **1995**. The physiological effects of dietary fiber. Dans KRITCHEVSKY D. et BONFIELD C. (eds) *Dietary Fiber in Health disease*. St. Paul, Minnesota: Eagan Press. pp. 58 - 71.
- ELLEGARD L., ANDERSSON H. et BOSAEUS I., **1997**. Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol, or the excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe, or bile acids but increases energy excretion in ileostomy subjects. *Eur J Clin Nutr* , Vol. 51, pp. 1 – 5.
- ENGLYST H.N., HAY S. et Mac FARLANE G.T., **1987**. Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol*, Vol. 95, pp. 163-171.

F

- FANG J.M., SUN R.C. et TOMKINSON J., **2000**. Isolation and characterization of hemicelluloses and cellulose from rye straw by alkaline peroxide extraction. *Cellulose*, Vol. 7, pp. 87 – 107.
- FANG J.M., SUN R.C., SALISBURY D., FOWLER P. et TOMKINSON J., **1999**. Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions. *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 66, pp. 423 – 432.
- FAUROT A.L., SAULNIER L., BEROT S., POPINEAU Y., PETIT M.D., ROUAU X. et al., **1995**. Large scale isolation of water-soluble and water-insoluble pentosans from wheat flour. *Food Science and Technology*, Vol. 28, pp. 436–441.
- FELDHEIM N. et WISKER E., **1995**. Nutritional aspects of rye. Dans: POUTANEN K., et AUTIO K. (eds). VTT Symposium 161, *International rye symposium : Technology and products*, Helsinki, Finland, 7-8 December, 1995. Espoo VVT., pp.93 - 102.
- FOOKS L.J. et GIBSON G.R., **2002**. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol. 39, pp. 67 – 75.
- FOOKS L.J., FULLER R. et GIBSON G.R., **1999**. Prebiotics probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy J.*, Vol. 9, pp. 53 – 61.
- FRANK A., **2002**. Prébiotiques. Dans : Aliments fonctionnels, Roberfroid M. (ed) *Editions Tec& Doc, Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires, Lavoisier*, Paris, pp. 105 - 123.
- FRANKS A.H., HARMSSEN H.J., RAANGS G.C., JANSEN G.J., SCHUT F. et WELLING G.W., **1998**. Variation of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 64, pp. 3336 – 3345.
- FUCHS C.S., GIOVANNUCI E.L., COLDITZ G.A., HUNTER D.J., STAMPFER M.J., ROSNER B., SPEIZER F.E. et WILLETT W.C., **1999**. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N. Engl. J. Med.* Vol. 340, pp.169 - 176.
- FUJITA K., KAKU M., YANAGASE Y. EZAKI T., FURUSE K., OZAWA A., SAIDI S.M., SANG W.K. et WAIYAKI P.G., **1990**. Physicochemical characteristics and flora of diarrhoeal and recovery faeces in children with acute gastro-enteritis in Kenya. *Ann. Trop. Paediatr.*, Vol. 10, pp. 339 – 345.
- FULLER R., **1989**. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, Vol. 66, pp. 365-378.

FULLER R., **1992**. History of development of probiotics. Dans *Fuller R. (ed.), Probiotic: the scientific basis. Chapman and Hall, Londres, UK, pp. 1 – 7.*

G

GABRIELI I., GATENHOLM P., GLASSER W.G., JAIN R.K. et KENNE L., **2000**. Separation characterization and hydrogel formation of hemicellulose from aspen wood. *Carbohydr. Polymers*, Vol. 43, pp. 367 - 374.

GALLAHER D.D. et KHIL J., **1999**. The effect of synbiotics on colon carcinogenesis in rats. *J. Nutr.*, Vol. 129, pp.1483 S- 1487 S.

GARROTE G., DOMINGUEZ H. et PARAJO J.C., **1999**. Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *J chem. Technol Biotechnol.*, Vol. 74, pp. 1101 – 1109.

GARROTE G., DOMINGUEZ H. et PARAJO J.C., **2002**. Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *J of food Engineering*, Vol. 52, pp. 211 – 218.

GARROTE G., DOMINGUEZ H. et PRAJO J.C., **2004**. Production of substituted oligosaccharides by hydrolytic processing of barley husks. *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol. 43, pp. 1608 – 1614.

GIBSON G.R. et ROBERFROID M.B., **1995**. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotic. *J. Nutr.*, Vol. 125, pp. 1401 – 1412.

GIBSON G.R. et WANG X., **1994**. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol.*, Vol. 77, pp. 412 – 420.

GIBSON G.R., BEATTY E.R., WANG X. et CUMMINGS J.H., **1995**. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, Vol. 108, pp. 975 – 982.

GIBSON G.R., BERRY-OTTAWAY P. et RASTALL R.A., **2000**. Dans: *Prebiotics: new developments in functional foods*. Chandos Publishing Limited. Oxford.

GIBSON R.G., **1995**. Fibre and effects on probiotics (the prebiotuc concept). *Clin. Nutr. Suoppl.*, Vol. 1, pp 25 – 31.

GILBERT H.J. et HAZELWOOD G.P., **1993**. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.*, Vol. 139, pp. 187 – 194.

- GLASSER W.G., JAIN R.K. et SJÖSTEDT M.A., **1995**. Thermoplastic pentosan-rich polysaccharides from biomass. *US Patent # 5,430,142*.
- GLASSER W.G., KAAR W.E., JAIN R.K. et SEALEY J.E., **2000**. Isolation options for non-cellulosic heteropolysaccharides (HetPS). *Cellulose*, Vol. 7, pp. 299 – 317.
- GLENISTER A., SALAMON K.E., SMITH K., BEIGHTON D. et KEEVIL C.W., **1988**. Enhanced growth of complex communities of dental plaque bacteria in mucin-limited continuous culture. *Microbiol. Ecol. Health Dis.*, Vol. 1, pp. 31 – 38.
- GLITSO L.V., BRUNSGARD G., HOJSGAARD S., SANDSTRÖM B. et BACH KNUDSEN K.E., **1998**. Intestinal degradation in pig of rye dietary with different structural characteristics. *Br. J. Nutr.*, Vol. 80, pp. 457 - 468.
- GLITSO L.V., GRUPPEN H., SCHOLS H.A., HOJSGAARD S., SANDSTROM B. et BACH KNUDSEN K.E., **1999**. Degradation of rye arabinoxylans in the large intestine of pigs. *J. Sci. Food Agric.*, Vol. 79, pp. 961 - 969.
- GRASTEN S., LIUKKONEN K.H., CHREVATIDIS A., EL-NEZAMI H., POUTANEN K. et MYKKANEN H., **2003**. Effects of wheat pentosan and inulin on the metabolic activity of fecal microbiota and on bowel function in healthy humans. *Nutr. Res.*, Vol. 23, pp. 1503 – 1514.
- Guandalini S., Pensabene L., Zikri M.A., Dias J.A., Casali L.G., Hoekstra H., Kolacek S., Massar K., Micetic-Turk D. et Papadopoulou A., **2000**. Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European study. *J.Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, Vol. 30, pp. 54 – 60.
- GUILLON F. et CHAMP M., **2000**. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Res. Int.*, Vol. 33, pp. 233-245.
- Gustavsson M., Bengtsson M., Gatenholm P., Glasser W.G., Teleman A. et Dahlman O., **2001**. Isolation, characterisation and material properties of 4-O-methylglucuronoxylan from aspen. Dans E. Chiellini, H. Gil, G. Braunegg, J. Buchert, P. Gatenholm, et M. van der Zee (Eds.), *Biorelated polymers: Sustainable polymer science and technology*. Kluwer Academic, New York, NY, pp. 41–52.

H

- HÄRKÖNEN M., PESSA E., SUORTTI T. et POUTANEN K., **1997**. Distribution and some properties of cell wall polysaccharides in rye milling fractions. *J. Cereal Sci.*, Vol. 26, pp. 95 - 104.

- HARRINGTON E.C., **1965**. The desirability function. *Industrial Quality Control*, Vol. 21, pp. 494 - 498.
- HARTEMINK R. et ROMBOUTS F.M., **1997**. Gas formation from oligosaccharides by the intestinal microflora. Dans: Hartemink R. (ed), *Non-digestible oligosaccharides: healthy food for the colon? Proceedings of the International Symposium*, Wageningen Graduate School VLAG. Wageningen, Netherlands, pp. 57 – 66.
- HARTLEY R.D. et FORD C.W., **1989**. Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. Dans: LEWIS N.G. et PAICE M.G. (eds), *Plant cell Wall polymers*, American chemical Society, Washington DC., pp. 137 - 145.
- HAVENAAR R. et HUIS In't VELD M.J.H., **1992**. Probiotics: a general view. Dans *Lactic acid bacteria in health and disease, Vol. I. Elsevier Appl. Sci. Publishers*, Amsterdam.
- HAYAKAWA K., MIZUTANI J., WADA K., MASAI T., YOSHIHARA I. et MITSUOKA T., **1990**. Effects of soybean oligosaccharides on human faecal flora. *Microbiol. Ecol. Health Dis.*, Vol. 3, pp. 293 - 303.
- HENRISSAT B. et COUTINHO P.M., **2001**. Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles. *Methods Enzymol.*, Vol. 330, pp. 183 – 201.
- HEYRAUD A., RINAUDO M. et TARAVEL F.R., **1984**. Isolation and characterisation of oligosaccharides containing D-fructose from juices of the Jerusalem artichoke: kinetic constant for acid hydrolysis. *Carbohydr. Res.*, Vol. 128, pp. 311.
- HIDAKA H., EIDA T., TAKIZAWA T., TOKUNAGA T. et TASHIRO Y., **1986**. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*, Vol. 5, pp. 37 – 50.
- HILL M.J. **1998**. Cereals, dietary fibre and cancer. *Nutr. Res.*, Vol. 18, pp. 653 - 659.
- HIPSLEY E.M., **1953**. Dietary fibre and pregnancy toxemia. *Br. Med. J.*, Vol. 2, pp. 420-422.
- HÖIJE A., GRÖNDAHL M. TOMMERAAS K. et GATENHOLM P., **2005**. Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks. *Carbohydr Polymers*, Vol. 61, pp. 266 - 275.
- HOLLMANN J. et LINDHAUER M.G., **2005**. Pilot-scale isolation of glucuronoarabinoxylans from wheat bran. *Carbohydr. Polymeres*, Vol. 59, pp. 225 – 230.
- HONG H.A., HONG DUC L. et CUTTING S.M., **2005**. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.*, Vol. 29, pp. 813 – 835.

HONG H.A., LE HONG DUC, et CUTTING S.M., **2005**. The use of bacterial spore formers as probiotics, *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 29, pp 813 - 835.

HROMADKVA Z. et EBRINGEROVA A., **2003**. Ultrasonic extraction of plant materials – investigation of hemicellulose release from buckwheat hulls. *Ultrasonics Sonochem.*, Vol. 10, pp. 127 - 133.

HSU C.K., LIAO J.W., CHUNG Y.C., HSEIH C.P. et CHAN Y.C., **2004**. Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development on rats. *J. Nutr.*, Vol. 134, pp. 1523 – 1528.

HUGHES R. et ROWLAND I.R., **2001**. Stimulation of apoptosis by two prebiotics chicory fructans in the rat colon. *Carcinogenesis*, Vol. 22, pp. 43 - 47.

HYNÖNEN U., WESTERLUND-WIKSTORM B., PALVA A. et KORHONEN T.K., **2002**. Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin- binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.*, Vol. 184, pp. 3360, 3367.

I

ISHIKAWA H., AKEDO I., UMESAKI Y., TANAKA R., IMAOKA A et OTANI T., **2003**. Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr*, Vol. 22, pp.56 - 63.

ITO M., DEGUCHI Y., MIYAMORI A., MATSUMOTO K., KIKUCHI H., MATSUMOTO K., **1990**. Effects of administration of galactooligosaccharides on the human ecal microflora, stool weight and abdominal sensation. *Microb. Ecol. Health Dis.*, Vol. 3, pp. 285-292.

IZYDORCZYK M.S., et BILIADERIS C.G., **1995**. Cereal arabinoxylans: Advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr. Polymers*, Vol. 28, pp. 33 – 48.

IZYDORCZYK M.S., MACRI L.J. et MACGREGOR A. W., **1998**. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides—II. Alkali-extractable b-glucans and arabinoxylans. *Carbohydr. Polymers*, Vol. 35, pp. 259 – 269.

J

J. JASKARI J., KONTULA P., SIITONEN A., JOUSIMIES SOMER H., MATTILA SANDHOLM T. et POUTANEN K., **1998**. Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for Bifidobacterium and Lactobacillus strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 49, pp. 175 – 181.

- JACOBS D.R., MARQUART L., SLAVIN J. et KUSHI L.H., **1998**. Whole-grain intake and cancer : an expanded review and meta-analysis. *Nutr. Cancer.*, Vol. 30, pp. 85 - 96.
- Janer C., Rohr L., Pelaez C., Laloï M., Cleusix V., Requena T. et Meile L., **2004**. Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium lactis*. *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol. 27, pp. 279 - 285.
- JANSEN G.J., WILDEOER-VELOO A.C., TONK R.H., FRANKS A.H. et WELLING G.W., **1999**. Development and validation of an automated microscopy-based method for enumeration of groups of intestinal bacteria. *J. Microbiol. Meth.*, Vol. 37, pp. 215 – 221.
- JASKARI J., KONTULA P., SIITONEN A., JOUSIMIES-SOMER H., MATTILA-SANDHOLM T. et POUTANEN K., **1998**. Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 49, pp. 175 – 181.
- JENKINS D., KENDALL C. et RANSOM T., **1998**. Dietary fibre, the evolution of human diet and coronary heart disease. *Nutr. Res.*, Vol. 18, pp. 633 - 652.
- JOHANSSON M.L., MOLIN G., JEPSSON B., NOBAEK S., AHRNE S. et BENGMARK S., **1993**. Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human mucosa and effect on the indigenous flora. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 59, pp. 15 – 20.
- JONSSON H., STRÖM E. et ROOS S., **2001**. Addition of mucine to the growth medium triggers mucin-binding activity in different strains of *Lactobacillus reuteri* *in vitro*. *FEMS Microbiol Letters*, Vol. 204, pp. 19 - 22.

K

- KABEL M.A., **2002a**. Characterisation of complex xylooligosaccharides from xylan rich by-products. Thèse: Université de Wageningen, Hollande.
- KABEL M.A., CARVALHEIRO F., GARROTE G., AVGERINOS E., KOUKIOS E., PARAJO J.C., GIRIO F.M., SCHOLS H.A. et VORAGEN A.G.J., **2002b**. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylooligosaccharides. *Carbohydr Polymers*, Vol. 50, pp. 47 – 56.
- KABEL M.A., KORTENOEVEN L., SCHOLS H.A. et VORAGEN A.G.J., **2002c**. In vitro fermentability of differently substituted xylooligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 50, pp. 6205 – 6210.

- KABIR A.M., AIBA Y., TAKAGI A., KAMIYA S., MIWA T. et KOGA Y., **1997**. Prevention of Helicobacter pylori infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut*, Vol. 41, pp. 49 – 55.
- KALLIOMAKI M., SALMINEN S. et POUUSA T., **2003**. Probiotics and prevention of atopic disease: 4 year follow-up of a randomised placebo controlled trial. *Lancet*, Vol. 361, pp. 1869 – 1871.
- KANAZAWA H., NAGINO M., KAMIYA S., KOMATSU S., MAYUMI T., TAKAGI K., ASAHARA T., NOMOTO K., TANAKA R. et NIMURA, Y., **2005**. Synbiotics reduce postoperative infectious complications: a randomized controlled trial in biliary cancer patients undergoing hepatectomy. *Langenbecks Arch. Surg.*, Vol. 390, pp. 104 – 113.
- KANEKO T., KOHMOTO T., KIKUCHI H., SHIOTA M., IINO H. et MITSUOKA T., **1994**. Effects of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerisation on human fecal bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 58, pp. 2288 - 2290.
- KAPLAN H. et HUTKINS R. W., **2000**. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 66, pp. 2682 - 2684.
- KASHKET E.R., **1987**. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.*, Vol. 46, pp. 233 – 244.
- KIRJAVAINEN P.V., SALMINEN S. et ISOLAURI E., **2003**. Probiotic bacteria in the management of atopic disease : underscoring the importance of viability. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, Vol. 36, pp. 223 – 227.
- KLEESSEN B., SYKURA B., ZUNFT H.J. et BLAUT M., **1997**. Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *Am J Clin Nutr.*, Vol. 65, pp. 1397 – 1402.
- KOBAYASHI T. et SAKAI Y., **1956**. Wood saccharification with strong sulphuric acid. IV. Hydrolysis rate of pentosan in dilute sulphuric acid. *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, Vol. 20, pp. 1 - 7.
- KOHMOTO T., FUKUI F., TAKAKU H., MACHIDA Y., ARAI M. et MITSUOKA T., **1998**. Effect of isomaltoligosaccharides on human fecal flora. *Bif. Microflora*, Vol. 7, pp. 61 - 69.
- KOLIDA S., TUOHY K. et GIBSON G.R., **2000**. The human gut flora in nutrition and approaches for its dietary modulation. *Br Nut Bull.*, Vol 25, pp. 223 - 231.
- KOLIDA S., TUOHY K., GIBSON G.R., **2002**. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br J Nutr.*, Vol. 87, pp. S 193 – S 197.

KONTULA P., VON WRIGHT A. et MATTILA-SANDHOLM T., **1998**. Oat bran β -gluco and xylo-oligosaccharides as fermentative substrates for latic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 45, pp. 163 -169.

KOPELOFF N., **1926**. *Lactobacillus acidophilus*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

KUAN H.K., STANOGLIAS G., et DUNKIN, A.C. **1983**. The effect of proportion of cell-wall material from lucerne leaf meal on apparent digestibility, rate of passage and gut characteristics in pig. *Anim .Prod.* Vol. 36, pp.201-209.

L

LAEMMLI U.K., **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, Vol. 227, pp 680 - 685.

LAMMERS K.M., HELWIG U. et SWENNEN E., **2002**. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am. J. Gastroenterol.*, Vol. 97, pp. 1182 – 1186.

LANGENDIJK P.S., SCHUT F., JANSEN G.J., RAANGS G.C., KAMPHUIS G.R. WILKINSON M.H. et WELLING G.W., **1995**. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 61, pp. 3069 – 3075.

LEE Y.K. et SALMINEN S., **1995**. The coming age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, Vol. 6, pp. 241 – 245.

LEVER M., **1972**. New reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal. Biochem.*, Vol. 47, pp. 273 – 279.

LILLY D.M. et STILLWELL R.H., **1965**. Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Sciences*, Vol. 147, pp. 747 – 748.

LOUVET F. et DELPLANQUE L., **2005**. Dans: Design of experiments : the french touch. Les plans d'expériences : une approche pragmatique et illustrée. Experimentique.

M

- MACKIE R.I., SGHIR A. et GASKINS H.R., **1999**. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*, Vol. 69, pp. 1035 S – 1045 S.
- MAES C. et DELCOUR J.A. **2002**. Structural characterisation of water- extractable and water- unextractable arabinoxylans in wheat bran. *J. of Cereal Sci.*, Vol. 35, pp. 315-326.
- MAES C. et DELCOUR J.A., **2001**. Alkaline hydrogen peroxide extraction of wheat bran non-starch polysaccharides. *Journal of Cereal Sci.*, Vol. 34, pp. 29 - 35.
- MAES C., VANGENEUGDEN B. et DELCOUR J.A., **2004**. Relative activity of two endoxylanases towards water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. *J. Cereal Sci.*, Vol. 39, pp. 181 – 186.
- MANDALARI G., FAULDS C.B., SANCHO A.I., SAIJA A., BISIGNANO G., LOCURTO R. et WALDRON K.W., **2005**. Fractionation and characterization of arabinoxylans from brewers' spent grain and wheat bran. *J. of Cereal.Sci.*, Vol. 42, pp. 205 - 212.
- MANGIN I., BONNET R., SEKSIK P. RIGOTTIER-GOIS L., SUTREN M., BOUHNİK Y., NEUT C., COLLINS M.D., COLOMBEL J.F., MARTEAU P. et DORE J., **2004**. Molecular inventory of fecal microflora in patients with Crohn's disease. *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol. 50, pp. 25 – 36.
- MARCHESSAULT R.H. et LIANG C.Y., **1962**. The infrared spectra of crystalline polysaccharides. VIII : xylans. *J. Polymer. Sci.*, Vol. 59, pp. 357 - 378.
- MARTEAU P., FLOURIE B., POCART P., CHASTANG C., DESJEUX J.F. et RAMBAUD J.C., **1990**. Effect of the lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase deficient humans. *Br. J. Nutr.*, Vol. 64, pp. 71 – 79.
- MARTEAU P., POCART P., DORE J., BERA-MAILLET C., BERNALIER A et CORTHIER G., **2001**. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 67, pp. 4939 – 4942.
- Mc DOUGALL G.J., MORRISON I.M., STEWART D. et HILLMAN J.R., **1996**. Plant cell wall as dietary fibre : range, structures, processing and function. *J. Sci. Food Agric.*, Vol. 70, pp. 133 - 150.
- McCARTER J.D. et WITHERS S.G., **1994**. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, Vol. 4, pp. 885 – 892.
- MERCENIER A., MULLER-ALOUF H. et GRANGETTE C., **2000**. Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues MOL. BIOL.*, Vol. 2, pp. 17 – 25.

- METCHNIKOFF E., **1907**. The prolongation of life. Dans *Optimistic study*, Butterworth-Heinemann, Londres, UK.
- MITSUOKA T., **1992**. Intestinal flora and aging. *Nutr. Rev.*; Vol. 50, pp. 438 – 446.
- MITSUOKA T., HIDAKA H. et EIDA T., **1987**. Effect of fructooligosaccharides on intestinal microflora. *Nahrung*, Vol.31, pp. 5 – 6.
- MOLIS C., FLOURIE B. et Ouarne F., **1996**. Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *Am J Clin Nutr*, Vol. 64, pp. 324 –328.
- MONTGOMERY R. et SMITH F., **1955**. The carbohydrates of the gramineae. VII: the constitution of a water-soluble hemicellulose of the endosperm of wheat (*triticum vulgare*). *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 77, pp. 3325 - 3328.
- MONTGOMERY R., SMITH F. et SRIVASTAVA M.C., **1957**. Structure of corn hull hemicellulose. Part IV : partial hydrolysis and identification of 3-O- α -D-xylopyranosyl- L- arabinose and 4-O- β - D-galactopyranosyl- β - D- xylose. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 79, pp. 698 - 700.
- MOORE W.E. et HOLDMAN L.V., **1974**. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.*, Vol. 27, pp. 961 – 979.
- MORALES M.L., GONZALEZ A.G. et TRONCOSO A.M., **1998**. Ion-exclusion chromatographic determination of organic acids in vinegars. *J. Chrom. A.*, Vol. 822, pp. 45 – 51.
- MULLER- HARVEY I., HARTLEY R.D., HARRIS P.J. et CURZON E.H., **1986**. Linkage of p- coumaryl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.*, Vol. 148, pp. 71 - 85.
- MULLIE C., YAZOURH A., SINGER E., LECROIX F., BLAREAU J.P., ROMOND M.B. et ROMOND C., **2002**. Partial characterization *Bifidobacterium breve* C50 cell-free whey compounds inducing modifications to the intestinal microflora. *J. Dairy Sci.*, Vol. 85, pp. 1383 – 1389.
- MYERS R.H. et MONTGOMERY D.C., **1995**. Dans Response surface methodology, Process and product optimization using designed experiments, *Wiley Ed.*, New-York.

N

NAKAKUKI T., **2005**. Present status and future prospects of functional oligosaccharides development in Japan. *J. Appl. Glycosci.*, Vol. 52, pp. 267 – 271.

NELDER J.A. et MEAD R., **1965**. A simplex method for function minimization. *Computer Journal*, Vol. 7, pp. 308 - 313.

NILSSON M., AMAN P., HÄRKÖNEN H., HALLMANS G., BACH KNUDSEN K.E., MAZUR W. et ADLERCREUTZ H., **1997**. Nutrient and lignan content, dough properties and baking performance of rye samples used in Scandinavia. *Acta Agric. Scand., Sect B, Soil and Plant Sci.* Vol. 47, pp. 26 - 34.

NILSSON M., SAULNIER L., ANDERSSON R. et AMAN P., **1996**. Water unextractable polysaccharides from three milling fractions of rye grain. *Carbohydr Polymers*, Vol. 30, pp. 229 - 237.

NILSSON U., OSTE R., JAGERSTAD M. et BIRKHED D., **1988**. Cereal fructans: in vitro and in vivo studies on availability in rats and humans. *J Nutr.*, Vol. 118, pp. 1325 – 1330.

NOMOTO K., **2005**. Prevention of infections by probiotics. *J. Biosci. Bioengin.*, Vol. 100, pp. 583 – 592.

O

O'SULLIVAN D.J., **1999**. Methods for analysis of the intestinal microflora. Dans *Probiotics: a critical review*, TANNOCK G.W. (ed.), *Horizon Sci. Press*, Wymondham, UK, pp. 23 – 44.

OKAZAKI M., FUJIKAWA S. et MATSUMOTO N., **1990**. Effect of xylooligosaccharides in the growth of bifidobacteria. *Bif. Microflora*, Vol. 9, pp. 77 – 86.

OLANO-MARTIN E., GIBSON G.R. et RASTALL R.A., **2002**. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *J Appl Microbiol.*, Vol. 93, pp. 505-511.

OSCARSSON, M., ANDERSSON R., SALOMONSSON A.C. et AMAN P., **1996**. Chemical composition of barley samples focusing on dietary fibre components. *J. Cereal Sci.*, Vol. 24, pp. 161 – 170.

P

PALFRAMAN R.J., GIBSON G.R. et RASTALL R. A., **2003**. Carbohydrate preferences of Bifidobacterium species isolated from the human gut. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, Vol. 4, pp. 71 - 75

- PANT A.R., GRAHAM S.M., ALLEN S.J., HARIKUL S., SABCHAREON A., CUEVAS L. et HART C. A., **1996**. Lactobacillus GG and acute diarrhoea in young children in the tropics. *J. Trop. Pediatr.*, Vol. 42, pp. 16 – 25.
- PARADES-LOPEZ O. et SAMAROPULOS M.E., **1982**. Scanning electronmicroscopy studies of limed corn kernels for tortilla making. *J. Food Technol.*, Vol. 17, pp. 687- 693.
- PARAJO J.C., GARROTE G., CRUZ J.M. et DOMINGUEZ H., **2004**. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends in food Sci. Technol.*, Vol. 15, pp. 155 – 120.
- PARKER R.B., **1974**. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health*, Vol. 29, pp. 4 – 8.
- PEDERSEN A., SANDSTROM B. et Van AMELSVOORT J.M.M., **1997**. The effect of ingestion of inulin on blood lipids and gastrointestinal symptoms in healthy females. *Br J Nutr.*, Vol.78, pp. 215 – 222.
- PERDIGON G., VALDEZ J.C. et RACHID M., **1998**. Antitumour activity of yoghurt: study of possible immune mechanisms. *J. Dairy Res.*, Vol. 65, pp. 129 - 138.
- PERLIN A.S., **1951**. Structure of soluble pentosans of wheat flour. *Cereal Chem.* Vol. 28, pp. 382 - 393.
- PERRIN P., PIERRE F., PATRY Y., CHAMP M., BERREUR M. et PRADAL G., **2001**. Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. *Gut* , Vol. 48, pp. 53-61.
- PERRIN S., FOUGNIES C., GRILL J., JACOBS H. et SCHNEIDER F., **2002**. Fermentation of chicory fructo-oligosaccharides in mixtures of different degrees of polymerization by three strains of bifidobacteria. *Can J. Microbiol.*, Vol. 48, pp. 759 - 763.
- POLLOCK C.J., HALL M.A. et ROBERT D.P., **1979**. Structural analysis of fructose polymers by gaz -liquid chromatography and gel filtration. *J. Chromat.*, Vol. 171, pp. 411.
- POTKINS Z.V., LAWRENCE T.L.J. et THOMLINSON J.R., **1991**. Effects of stuctural and non-structural polysaccharides in diet of growing pig on gastric emptying rate of passage of digesta to the terminal ileum and through the total gastro-intestinal tract. *Br. J. Nutr.*, Vol. 65, pp. 391 - 413.

R

- RABIU B.A., JAY A.J., GIBSON G.R. et RASTALL R.A. **2001**. Synthesis and fermentation properties of novel galactooligosaccharides by β -galactosidase from Bifidobacterium species. *Appl Environ Microbiol.*, Vol. 67, pp. 2526-2530.
- RACHMILEWITZ D., KATAKURA K., KARMELI F., HAYASHI T., REINUS C., RUDENSKY B., AKIRA S., TAKEDA K., LEE J., TAKABAYASHI K. et RAZ E., **2004**. Toll like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*, Vol. 126, pp. 520–528.
- RAFTER J., **2002**. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *Br J Nutr* , Vol. 88, pp. S 89 –S 94.
- RAFTER J., **2003**. Probiotics and colon cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* , Vol. 17, pp. 849 - 859.
- RASTALL R.A. et MAITIN V., **2002**. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Cur Opin Biotechnol.*, Vol. 13, pp. 490-496.
- RAYES N., HANSEN S. SEEHOFER D., MULLER A. R., SERKE S., BENGMARK S. et NEUHAUS P., **2002b**: Early enteral supply of fiber and lactobacilli versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery. *Nutrition*, Vol. 18, pp. 609 – 615.
- RAYES N., SEEHOFER D., HANSEN S., BOUCSEIN K., MULLER A. R., SERKE S., BENGMARK S. et NEUHAUS P., **2002a**. Early enteral supply of Lactobacillus and fiber versus selective bowel decontamination; a controlled trial in liver transplant recipients. *Transplantation*, Vol. 74, pp. 123 – 127.
- REDDY B.S., **1995**. Nutritional factors and colon cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Vol.35, pp. 175 - 190.
- REDDY B.S., **1999**. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J. Nutr.*, Vol. 129, pp. 1478 S- 1482 S.
- REIS A., COIMBRA M.A., DOMINGUES P., FERRER-CORREIA A.J. et DOMINGUES M.R.M., **2002**. Structural characterization of underivatized olive pulp xylooligosaccharides by mass spectrometry using matrix assisted laser desorption/ionisation and electrospray. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, Vol. 16, pp. 2124 – 2132.
- REIS A., COIMBRA M.A., DOMINGUES P., FERRER-CORREIA A.J. et DOMINGUES M.R.M., **2004**. Fragmentation pattern of underivatized xylooligosaccharides and their alditol derivatives by electrospray tandem mass spectrometry. *Carbohydr. Polymers*, Vol. 55, pp. 401 – 409.

- REIS A., DOMINGUES M.R.M., DOMINGUES P., FERRER-CORREIA A.J. et COIMBRA M.A., **2003**. Positive and negative electrospray ionisation tandem mass spectrometry as a tool for structural characterisation of acid released oligosaccharides from olive pulp glucuronoxylans. *Carbohydr. Res.*, Vol. 338, pp. 1497 – 1505.
- REIS A., DOMINGUES M.R.M., FERRER-CORREIA A.J. et COIMBRA M.A., **2003**. Structural characterisation by MALDI-MS of olive xylooligosaccharides obtained by partial acid hydrolysis. *Carbohydr. Polymers*, Vol. 53, pp. 101 – 107.
- RESTA-LENERT S. et BARRETT K.E., **2003**. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *E. coli* (EIEC). *Gut*, Vol. 52, pp. 988 – 997.
- RETTGER L.F. et CHEPLIN H.A., **1921**. A treatise on the transformation of the intestinal flora with special reference to the implantation of *Bacillus acidophilus*. *Yale University Press*, Londres, UK.
- RETTGER L.F., LEVY M.N., WEINSTEIN L. et WEISS J.E., **1935**. *Lactobacillus acidophilus* and its therapeutic application. *Yale University Press*, Londres, UK.
- RHEW B.K., LEE J.W., LEE C.S., HYUN S.I., PARK Y.J., AHN J.B., YANG C.K. et YOON S., **2002**. Effects of xylooligosaccharides on the growth of intestinal microflora. *Han guk Misaengmul-saengmyongkong Hakhoechi*. Vol. 30, pp. 380 – 387.
- RIGOTTIER-GOIS L., Le BOURHIS A.G., GRAMET G., ROCHET V. et DORE J., **2003**. Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human feces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol. 43, pp. 237 – 245.
- RIZKALLA S.W., LUO J., KABIR M., CHEVALIER A., PACHER N. et SLAMA G., **2000**. Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short chain fatty acid profiles : a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *Am. J. Clin. Nutr.*, Vol. 72, pp. 1474 – 1479.
- ROBERFROID M.B., **1998**. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. *Adv Exp Med Biol* , Vol.427, pp. 211 - 219.
- ROBERFROID M.B., Van LOO J.A.E. et GIBSON G.R., **1998**. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J Nutr.*, Vol. 128, pp. 11 - 19.
- ROMOND M.B., AIS A., GUILLEMOT F., BOUNOUADER R., CORTOT A. et ROMOND C., **1998**. Cell-free whey from milk fermented with *Bifidobacterium breve* C50 used to modify the colonic microflora of healthy subjects. *J. Dairy Sci.*, Vol. 81, pp. 1229 – 1235.

- ROSENFELDT V., BENFELDT E. et NIELSEN S.D., **2003**. Effect of probiotics Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 111, pp. 389 – 395.
- ROSSI M., CORRADINI C., AMARETTI A., NICOLINI M., POMPEI A., ZANONI S. et MATTEUZZI D., **2005**. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by Bifidobacteria : a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 71, pp. 6150 – 6158.
- ROWLAND I.R. et GANGOLLI S.D., **1999**. Role of gastrointestinal flora in the metabolic and toxicological activities of xenobiotics. Dans : Ballantyne B., Marrs T.C., Syverson T. (Eds), *General and Applied Toxicology*, Macmillan Publishers Ltd., 2nd Edition Londres, pp. 561-76.
- ROWLAND I.R. et TANAKA R., **1993**. The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. *J Appl Bacteriol.*, Vol. 74, pp. 667-674.
- ROWLAND I.R., RUMNEY C.J., COUTTS J.T. et LIEVENSE L.C., **1998**. Effect of Bifidobacterium longum and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, Vol. 19, pp. 281 - 285.
- RUEMMELE F.M., SCHWARTZ S., SEIDMAN E.G., DIONNE S., LEVY E. et LENTZE M.J., **2003**. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via mitochondrial pathway. *Gut*, Vol.52, pp. 94 - 100.
- RUSSO G.L., PIETRA V.D., MERCURIO C., PALUMBO R., IACOMINO G., RUSSO M., TOSTO M. et ZAPPIA V., **1999**. Protective effects of butyric acid in colon cancer. Dans ZAPPIA V. et al. (eds). *Advances in nutrition and cancer2*. New York: Kluner Academic, Plenum Publishers, pp.131 - 147.
- RYCROFT C.E., JONES M.R., GIBSON G.R. et RASTALL R.A., **2001**. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J Appl Microbid.*, Vol. 91, pp. 878 - 887.
- RYE C.S. et WITHERS S.G., **2000**. Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, Vol. 4, pp. 573 – 580.

S

- SAAKE B., KRUSE T. et PULS J., **2001**. Investigation on molar mass, solubility and enzymatic fragmentaion of xylan by multi- detected SEC chromatography. *Bioresource Technol.*. Vol. 80, pp. 195 - 204.
- SAARELA M., MOGENSEN G., FONDEN R., MÄTTÖ J. et MATTILA-SANDHOLM T., **2000**. Probioticc bacteria: safety functional and technological properties. *J.Biotechnol.*, Vol. 84, pp. 197 – 215.

- SAAVEDRA J.M., BAUMAN N.A., OUNG I., PERMAN J.A. et YOLKEN R.H., **1994**. Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *LANCET*, Vol. 344, pp. 1046 – 1049.
- SAHA B.C., **2000**. α -L-arabinofuranisidase : biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol Adv.*, Vol. 18, pp. 403 – 423.
- SAITO Y., TAKANO T. et ROWLAND I., **1992**. Effects of soybean oligosaccharides on the human gut microflora in vitro culture. *Microbiol. Ecol. Health Dis.*, Vol. 5, pp. 105 - 110.
- SALMINEN S. et SALMINEN E., **1997**. Lactulose, lactic acid bacteria, intestinal microecology and mucosal protection. *Scan J Gastroenterol.*, Vol 32, pp. S 45 – S 48.
- SALMINEN S., BOULEY C., BOUTRON-RUAULT M.C., CUMMINGS J.H., FRANCK A., GIBSON G.R., ISOLAURI E., MOREAU M.C. ROBERFROID M. et ROWLAND I., **1998**. Functionnal food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.*, Vol. 80, pp. 147 S – 171 S.
- SAMUELSEN A.B., COHEN E.H., SMESTAD PAULSEN B., BRÜLL L.P. et THOMAS-OATES J.E., **1999**. Structural studies of a heteroxylan from *Plantago major* seeds by partial hydrolysis HPAEC-PAD, methylation and GC-MS, ESMS and ESMS/MS. *Carbohydr Res.*, Vol. 315, pp. 312 – 318.
- SAULNIER L., MESTRES C., DOUBLIER J.L., ROGER P. et THIBAUT J.F., **1993**. Studies of polysaccharides solubilized during alkaline cooking of maize kernels. *J. Cereal Sci.* Vol. 17, pp. 267 - 276.
- SAULNIER L., VIGOUROUX J. et THIBAUT J.F., **1995**. Isolation and characterization of feruloylated-oligosaccharides from maize bran. *Carbohydr. Res.*, Vol. 272, pp. 241 - 253.
- SAXELIN M., PESSI T. et SALMINEN S., **1995**. Fecal recovery following oral administration of Lactobacillus strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *Int. J. Microbiol.*, Vol. 25, pp. 199 – 203.
- SCHOLS H., KABEL M., BAKX E., DAAS P., ALEBEEK G.J. et VORAGEN A., **2000**. *Proc.7th symp. AVH Association*, Reims, France, p. 39.
- SCHOLZ-AHRENS K. et SCHREZENMEIR J., **2000**. Inulin, oligofructose and mineral metabolism - experimental data and mechanism. *Brit. J.Nutr.*, Vol. 87, pp. S 186 – S 219.
- SCHOOLEY D.L., KUBIAK F.M. et EVANS J.V., **1985**. Capillary gas chromatographic analysis of volatile and non-volatile organic acids from biological samples as the t-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Chrom. Sci.*, Vol. 23, pp. 385 – 390.

- SCHREZENMEIR J. et de VRESE M., **2001**. Probiotics, prebiotics, and symbiotics – approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.*, Vol. 73, pp. 361 S – 364 S.
- SEKSIK P., RIGOTTIER-GOIS L., GRAMET G., SUTREN M., POCHART P., MARTEAU P., JIAN R. et DORE J., **2003**. Alteration of the dominant fecal bacteria groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, Vol. 52, pp. 237 – 242.
- SENESI S., **2004**. Bacillus spores as probiotic products for human use. Dans: RICCA E., HENRIQUES A.O. et CUTTING S.M. (eds), *Bacterial spore formers, Horizon Biosci. Publisher, Wymondham UK*, pp. 131 – 141.
- SGHIR A., CHOW J.M. et MACKIE R.I., **1998**. Continuous culture selection of bifidobacteria and lactobacilli from human faecal samples using fructooligosaccharides as selective substrates. *J Appl Microbiol.*, Vol. 85, pp. 769 - 777.
- SGHIR A., GRAMET G., SUAU A., ROCHET V., POCHART P. et DORE J., **2000**. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 66, pp. 2263 – 2266.
- SHARP R., FISHBAIN S. et MACFARLANE G.T., **2001**. Effect of short-chain carbohydrates on human intestinal bifidobacteria and Escherichia coli in vitro. *J Med Microbiol.*, Vol. 50, pp. 152 - 60.
- SHIIBA K., YAMADA H., HARA H., OKADA K. et NAGAO S., **1993**. Purification and characterization of arabinoxylans from wheat bran. *Cereal. Chem.*, Vol. 70, pp. 209-214.
- SHIMOJI Y.O, OGAWA Y., OSAKI M., KABEYA H., MARUYAMA S., MIKAMI T. et SEKIZAKI T., **2003**. Adhesive surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* bind to polystyrene, fibronectin, and type I and IV collagens. *J. Bacteriol.*, Vol. 185, pp. 2739 – 2748.
- SHORNIKOVA A.V., CASAS I.A., ISOLAURI E., MYKKANEN H. et VESIKARI T., **1997**. *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, Vol. 24, pp. 399 – 404.
- SILLANPÄÄ J., MARTINEZ B., ANTIKAINEN J., TOBA T., KALKKINEN N., TANKKA S., LOUNATMAA K., KERANEN J., HOOK M., WESTERLUND-WIKSTROM B., POUWELS P.H. et KORHONEN T.K., **2000**. Characterization of collagen-binding S-Layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *J. Bacteriol.*, Vol. 182, pp. 6440 – 6450.
- SLAVIN J.L., **2000a**. Mechanisms for the impact of whole grain food in cancer risk. *J. Am. Coll. Nutr.*, Vol. 19, pp. 300 S - 307 S.

- SLAVIN J.L., MARQUART L. et JACOBS D., **2000b**. Consumption of whole grain food and decreased risk of cancer : Proposed mechanisms. *Cereal Foods World.*, Vol. 45, pp. 54 - 58.
- SMIRICKY-TJARDES M.R., FLICKINGER E.A., GRIESHOP C.M., BAUER L.L., MURPHY M.R. et FAHEY G.C., **2003**. In vitro fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora. *J Anim Sci.*, Vol. 81, pp. 2505 - 2514.
- SMIRNOV A., PEREZ R., AMIT-ROMACH E., SKLAN D. et UNI Z., **2005**. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. *J. Nutr.*, Vol. 135, pp. 187 – 192.
- SMITH M.M. et HARTLEY R.D., **1983**. Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell wall polysaccharides in graminace plants. *Carbohydr. Res.*, Vol. 118, pp. 65 - 80.
- SORENSEN H.R., MEYER A.S. et PEDERSEN S., **2003**. Enzymatic hydrolysis of water soluble wheat arabinoxylan: 1. Synergy between α -L-arabinofuranosidases, Endo-1,4- β -Xylanases and β -Xylosidase activities. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 81, pp. 726 – 731.
- SORENSEN H.R., PEDERSEN S., VISKO-NIELSEN A. et MEYER A.S., **2005**. Efficiencies of designed enzyme combinaison in releasing Arabinose and Xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. *Enz. Microbial Technol.*, Vol. 36, pp. 773 – 784.
- SPENDLEY W., HEXT G.R. et HIMSWORTH F.R., **1962**. Sequential application of simplex designs in optimisation and evolutionary operation, *Technometrics*, Vol. 4, pp. 441-461.
- SPERTI G.S., **1971**. Probiotics. *Avi Publishing Co*, West Point, CT.
- SRIVASTAVA M.C. et SMITH F., **1957**. Structure of corn hull hemicellulose. Part. V : partial hydrolysis and identification of 4-O- β -D-xylopyranosyl-D-xylose and 5-O- β -D-galactopyranosyl-L-arabinose. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 79, pp. 982 - 984.
- STEVENS B.J.H., SELVENDRAN R.R., BAYLISS C.E. et TURNER R., **1988**. Degradation of cell wall material of apple and wheat bran by human faecal bacteria in vitro. *J. Sci. Food Agric.* Vol. 44, pp. 151 - 166.
- STOLYHWO A., COLIN H., MARTIN M. et GUIOCHON G., **1984**. Study of the qualitative and quantitative properties of the light scattering detector. *J chrom.*, Vol. 288, pp. 253 – 275.
- STONE-DORSHOW T. et LEVITT M.D., **1987**. Gaseous response to ingestion of a poorly absorbed fructooligosaccharide sweetener. *Am J Clin Nutr.*, Vol.46, pp.1 – 5.

SUAU A., BONNET R., SUTREN M., GODON J.J., GIBSON G.R., COLLINS M.D. et DORE J., **1999**. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 65, pp. 4799 – 4807.

SUN H.J., YOSHIDA S., PARK N.H. et KUSAKABE I., **2002**. Preparation of 1,4- β -xylooligosaccharides from acid hydrolysate of cotton seed xylan. Suitability of cotton seed xylan as a starting material for preparation of 1,4- β -D xylooligosaccharides. *Carbohydr Res.*, Vol. 337, pp. 657-661.

SUN R.C. et SUN X.F., **2002**. Fractional and structural characterization of hemicelluloses isolated by alkali and alkaline peroxide from barley straw. *Carbohydr. Polymers*, Vol. 49, pp. 415 – 423.

SUN R.C., LAWATHER J.M. et BANKS W.B., **1996**. Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses. *Carbohydr. Polymers*, Vol. 29, pp. 325 – 331.

SUZUKI M., **1968**. Fructosan in timothy halpocorm. *Can. J. Bot.*, Vol. 46, pp. 1201.

T

TANAKA R., TAKAYAMA H., MOROTOMI M., KUROSHIMA T., UEYAMA S. et MATSUMOTO K., **1983**. Effects of administration of TOS and Bifidobacterium breve 4006 on the human faecal flora. *Bif Microflora.*, Vol. 2, pp. 17-24.

TANNOCK G.W., **2002**. Probiotics and prebiotics: where are we going? Dans *TANNOCK (ed) Probiotics and Prebiotics: where are we going*, Caister Academic Press, Wyomondham, UK, pp. 1 – 20.

TATEYAMA I., HASHII K., JOHNO I., IINO T., HIRAI K., SUWA Y. et KISO Y., **2005**. Effect of xylooligosaccharides intake on severe constipation in pregnant women. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, Vol. 51, pp. 445 – 448.

TERADA A., HARA H., KATAOKA M. et MITSUOKA T., **1992**. Effect of lactulose on the composition and metabolic activity of the human faecal microbiota. *Microb Ecol Health Dis.*, Vol. 5, pp. 43 - 50.

THEANDER O., AMAN P., WESTERLUND E. et GRAHAM H., **1994**. Enzymatic/chemical analysis of dietary fiber. *J. AOAC Inter.*, Vol. 77, pp. 703 - 709.

TIMELL T.E., ENTERMAN W., SPENCER F. et SOLTES E.J., **1964**. The acid hydrolysis of glycosides: II, effect of substituents at C-5. *Can. J. Chem.*, Vol. 43, pp. 2296 – 2305.

- TOBA T., VIRKOLA R., WESTERLUND B., BJÖRKMAN Y., SILLANPÄÄ J., VARTIO T., KALKKINEN N. et KORHONEN T.K., **1995**. A collagen-binding S-Layer protein in *Lactobacillus crispatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 61, pp. 2467 – 2471.
- TRAN C.P., FAMILARI M., PARKER L.M., WHITEHEAD R.H. et GIRAUD A.S., **1998**. Short-chain fatty acids inhibit intestinal trefoil factor gene expression in colon cancer cells. *Am J Physiol- Gastrointest Liver Physiol.*, Vol. 275, pp. G 85-G 94.
- TROWELL H., SOUTHGATE D.A.T., WOLEVER T.M.S., LEEDS A.R., GASSULL M.A. et JENKINS D.J.A., **1976**. Dietary fibre redefined. *Lancet* 967.
- TUOHY K.M., KOLIDA S., LUSTENBERGER A.M. et GIBSON G.R., **2001**. The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides – a human volunteer study. *Br J Nut.*, Vol. 86, pp 341- 348.
- TUOHY K.M., PROBERT H.M., SMEJKEL C.W. et GIBSON G.R., **2003**. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Dis Today*, Vol. 8, pp. 692 – 700.

V

- Van der MEULEN R., AVONTS L. et De VUYST L., **2004**. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by bifidobacterium animalis DN-173 010. *Appl Environ Microbiol.*, Vol. 70, pp. 1923 - 1930.
- Van der VEEN P., FLIPPHI M.J.A., VORAGEN A.G.J. et VISSER J., **1991**. Induction, purification and characterization of arabinases produced by *Aspergillus niger*. *Arch. Microbiol.*, Vol. 157, pp. 23 – 28.
- Van LAERE K.M.J., BOSVELD M., SCHOLS H.A., BELDMAN G. et VORAGEN A.G.J., **1997**. Fermentative degradation of plant cell wall derived oligosaccharides by intestinal bacteria. Dans: Hartemink R, ed. *Non-digestible oligosaccharides: healthy food for the colon? Proceedings of the International Symposium*, Wageningen Graduate School VLAG. Wageningen, Netherlands: Wageningen Graduate School VLAG, pp. 37 – 46.
- VANHOUE T., HUYS G., De BRANDT E. et SWINGS J., **2004**. Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA genes primers. *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol. 48, pp. 437 – 446.

- VARDAKOU M., KATAPODIS P., SAMIOTAKI M., KEKOS D., PANAYOTOU G. et CHRISTAKOPOULOS P., **2003**. Mode of action of family 10 and 11 endoxylanases on water-unextractable arabinoxylan. *Int. J. Biological Macromol.*, Vol. 33, pp. 129 – 134.
- VAZQUEZ M.J., ALONSO J.L., DOMINGUEZ H. et PARAJO J.C., **2000**. Xylooligosaccharides manufactures and applications. *Trends in Feed Sciences an Technol.*, Vol. 11, pp. 387 – 393.
- VENTURI M., HAMBLY R.J., GLINGHAMMAR B., RAFTER J.J. et ROWLAND I.R., **1997**. Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: a study using the alkaline comet assay. *Carcinogenesis*, Vol. 18, pp. 2353 - 2359.
- VERGHESE M., RAO D., CHAWAN C., WILLIAMS L. et SHACKELFORD L., **2002**. Dietary inulin suppresses azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colon tumors at the promotion stage in young Fisher 344 rats. *J. Nutr.*, Vol. 132, pp. 2809-2813.
- VICKERS R., SUNVOLD G., KELLEY R. et REINHART G., **2001**. Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora. *Am J. Vet. Res.*, Vol. 62, pp. 609 - 615.
- VILA C., GARROTE G., DONIGUEZ H. et PARAJO J.C., **2002**. Hydrolytic processing of rice husks in aqueous media : a kinetic assesment. *Collect. Czech. Chem. Comm.*, Vol. 67, pp. 509 - 530.
- VISHWANATH S. et RAMPHAL R., **1984**, Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human tracheobronchial mucin. *Infect. Immun.* Vol. 45, pp. 197 – 202.

W

- WADA K., WATANABE J., MIZUTANI J., TOMODA M., SUZUKI H. et SAITOH Y., **1992**. Effects of soybean oligosaccharides in a beverage on human fecal flora and metabolites. *J Agri Chem Soc Japan*, Vol.66, pp. 127 - 135.
- WANG X. et GIBSON G.R., **1993**. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol.*, Vol. 75, pp. 373 – 380.
- WANG, X., BROWN I.L., KHALED D., MAHONEY M.C., EVANS A.J. et CONWAY P.L., **2002**. Manipulation of colonic bacteria and volatile fatty acid production by dietary high amylose maize (amylomaize) starch granules. *J. of Appl Microbiol.*, Vol. 93, pp. 390-397.

- WEIPERT D., **1997**. Processing performance of rye as compared to wheat. *Cereal Foods World*, Vol. 42, pp. 706 - 712.
- WHISTLER R.L. et RICHARD E.L., **1970**. Hemicelluloses. Dans : *the carboxydrates. Vol. IIA*. PIGMAN W. et NORTON D. (eds.). Academic press, New york, pp. 447 - 469
- WIJNANDS M.V.W., SCHOTERMAN H.C., BRUIJNTJES J.P., HOLLANDERS V.M.H. et WOUTERSEN R.A., **2001**. Effect of dietary galacto-oligosaccharides on azoxymethane induced aberrant crypt foci and colorectal cancer in Fischer 344 rats. *Carcinogenesis*, Vol. 22, pp. 127 - 132.
- WILKIE K.B.C., **1979**. The hemicellulose of grasses and cereals. *Advanced Carbohydr of chem and Biochem.*, Vol. 36, pp. 215 - 264.
- WILKIE K.C.B., **1985**. New perspectives on non-cellulosic cell-wall polysaccharides (hemicellulose and pectic substances) of land plants. Dans: *Biochemistry of plant cell walls*. BRETT C.T. et HILLMAN J.R. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-38.
- WILSON K.H. et BLITCHINGTON R.B., **1996**. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, pp. 2273 – 2278.
- WOLF D.D. et ELLMORE T.L., **1975**. Automated hydrolysis of non reducing sugars and fructosans from plant tissue. *Crop Sci.*, Vol. 15, pp. 775.
- WOLF M.J., Mac MASTERS M.M., CANNON J.A., ROSEWALL E.C. et RIST C.E., **1953**. Preparation and some properties of hemicelluloses from corn hulls. *Cereal Chem.* Vol.30, pp. 451 - 470.
- WONG K.K.Y., TAN L.U.L. et SADDLER J.N., **1998**. Multiplicity of β -1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev.* Vol. 52, pp. 305 – 317.

X

- XIAO S.D., ZHANG Z., LU H., JIANG S.H., LIU H.Y., WANG G.S., XU G.M. ZHANG Z.B., LIN G.J. et WANG G.L., **2003**. Multicenter, randomized, controlled trail of health-killed *Lactobacillus acidophilus* LB in patient with chronic diarrhea. *Adv. Ther.*, Vol. 20, pp. 252 – 260.
- XU Y., JIANG H., YONG Q. et YU S., **2001**. Effect of xylooligosaccharides on proliferation of Bifidobacterium adolescentis. *Shipin Kexue*, Vol. 22, pp. 15 – 17.

Y

- YAGUCHI M., ROY C., UJIIE M., WATSON D.C. et WAKARCHUK W., **1992**. Amino acid sequence of the low molecular weight xylanase from *Trichoderma viride*. *Progress Biotechnol.*, Vol. 7, pp. 149 – 154.
- YAMADA H., SHIBA K., HARA H., ISHIDA N. et SASAKI T., **1994**. Preparation of a new arabinoxylooligosaccharide from wheat bran hemicellulose and its structure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 58, pp. 288 – 292.
- YAN F. et POLK D.B., **2002**. Probiotic bacterium prevents cytokine induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, Vol. 277, pp. 50959 – 50965.
- YUAN X., WANG J. et YAO H., **2005a**. Feruloyl oligosaccharides stimulate the growth of *Bifidobacterium bifidum*. *Anaerobe*, Vol. 11, pp. 225 – 229.
- YUAN X., WANG J. YAO H. et VENANT N., **2005b**. Separation and identification of endoxylanases from *Bacillus subtilis* and their actions on wheat insoluble dietary fibre. *Process Biochem.*, Vol. 40, pp. 2339 – 2343.
- YUI T., IMDA K., SHIBAYA N. et OGAWA K., **1995**. Conformation of an arabinoxylan isolated from the rice endosperm cell wall by X-ray diffraction and conformational analysis. *Japan Biotechnol. and Biochem.* Vol. 59, pp. 965 - 968.

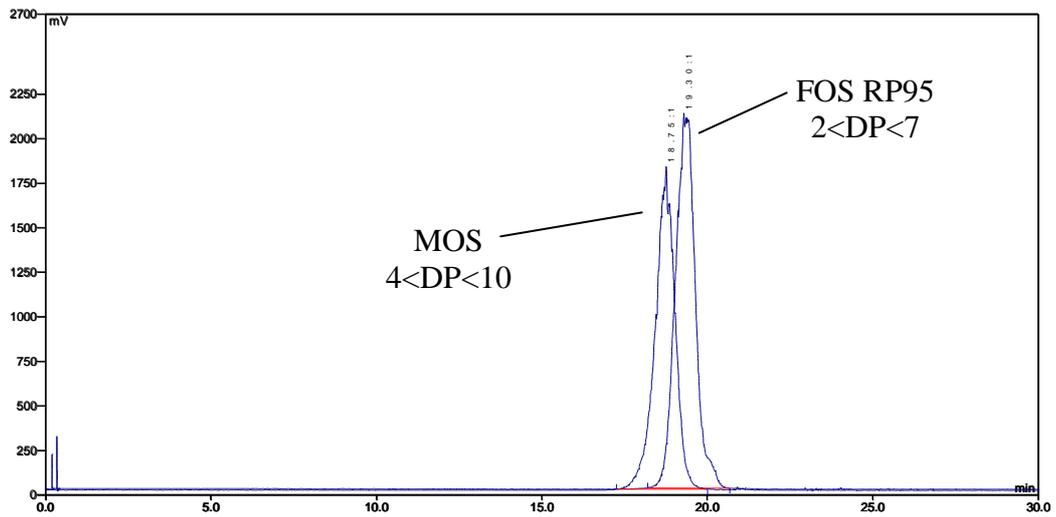
Z

- ZECHEL D.L. et WITHERS S.G., **2000**. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.*, Vol. 33, pp. 11 – 18.
- ZHANG J.H, XU Y, YONG Q., BU X.L. et YU S.Y., **2005**. Preparative separation of xylobiose and xylotriose and their in vitro application in fermentation by *Bifidobacteria*. *Linchan Huaxue Yu Gongye*, Vol. 25, pp. 15 – 18.
- ZHANG X.B. et OHTA Y., **1993**. Microorganisms in the gastro-intestinal tract of the rat prevent absorption of the mutagen-carcinogen 3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido (4,3-b) indole. *Can. J. Microbiol.*, Vol. 39, pp. 841 - 845.

ANNEXES

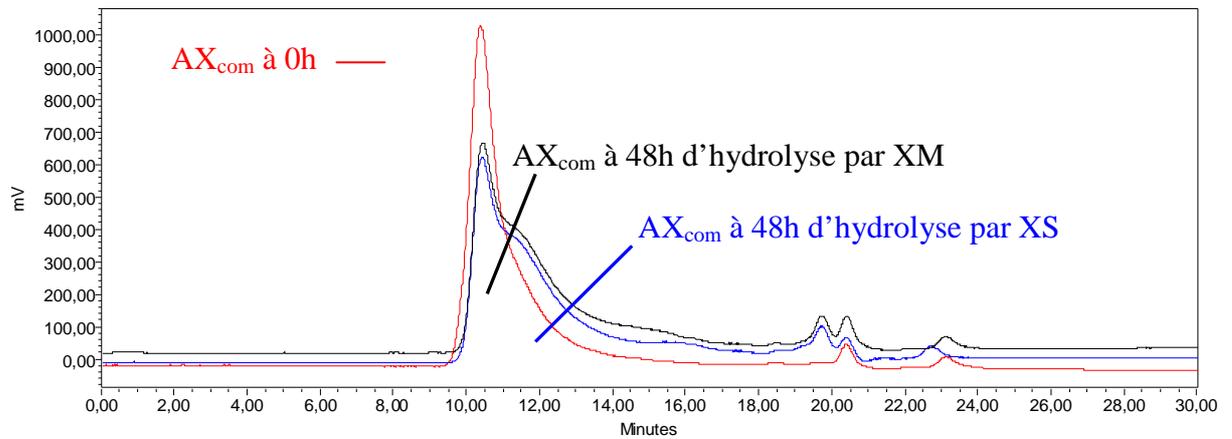
Annexe 1

Etalonnage du système HPSEC par le mélange commercial de maltooligosaccharides de DP compris entre 4 et 10 :



Annexe 2

Suivi par HPSEC de la distribution des masses moléculaires des AX_{com} de maïs à l'issue de 48h d'hydrolyse par les xylanases XS et XM.



Annexe 3

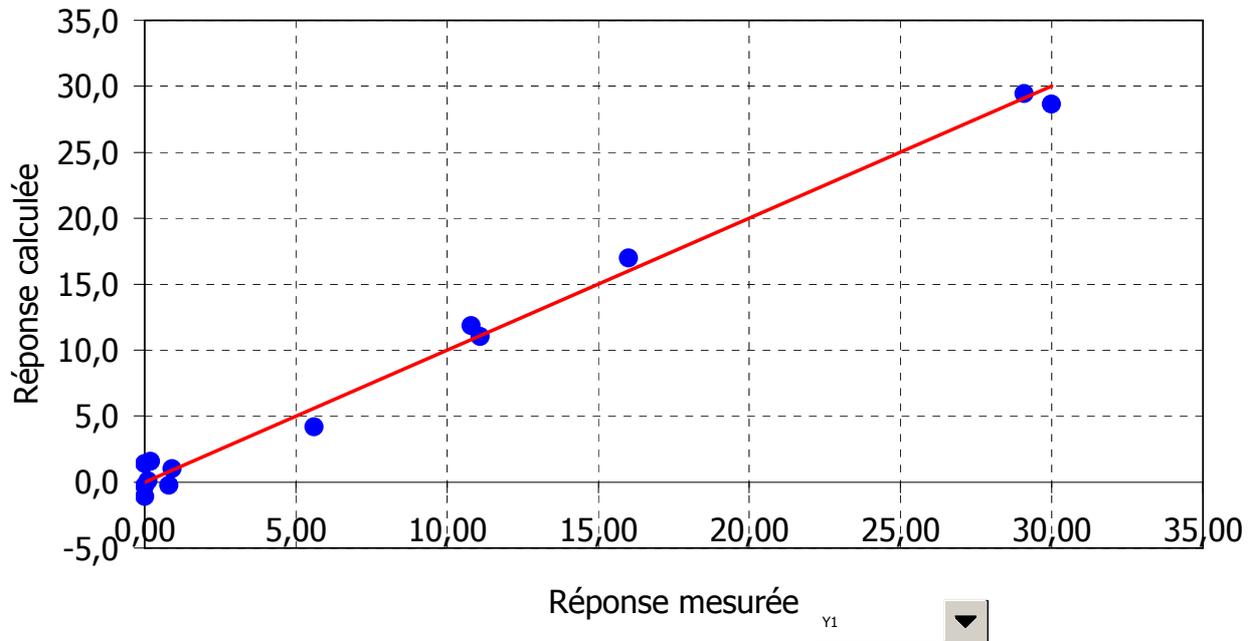
Tableau des coefficients du modèle polynomial du second degré relatif au Processus n°1, estimés par la méthode des moindres carrés, utilisée sous sa forme matricielle :

Coefficients	Valeurs calculées pour		
	Y ₁	Y ₂	Y ₃
α_0	0,1823	29,0037	15,0598
α_1	-8,7017	9,9236	1,2393
α_2	-9,3775	11,5011	1,5123
α_3	-7,6498	23,6547	2,7262
α_{1-1}	8,2666	-4,8902	-0,9392
α_{2-2}	8,4163	-3,9989	-0,7239
α_{3-3}	4,1273	12,2276	0,5009
α_{1-2}	9,0811	-0,7689	0,3072
α_{1-3}	5,9546	0,4055	-0,3740
α_{2-3}	7,7987	1,5223	-0,3166

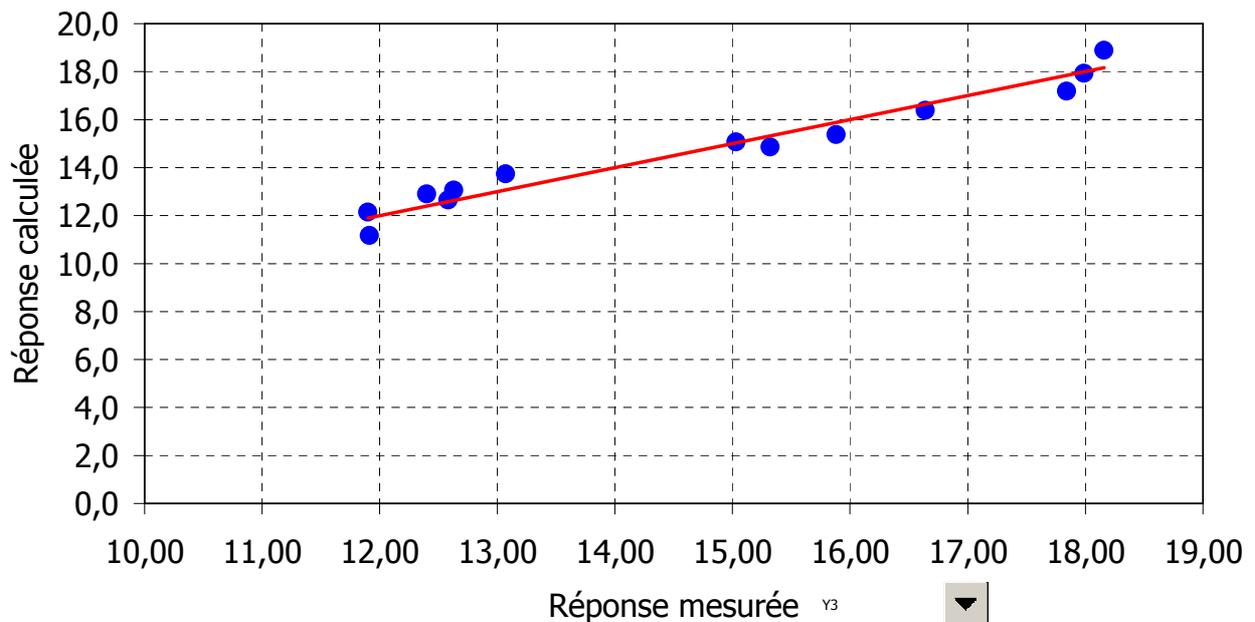
Annexe 4

Graphes d'adéquation relatifs aux réponses Y1 et Y3 du processus n°1 :

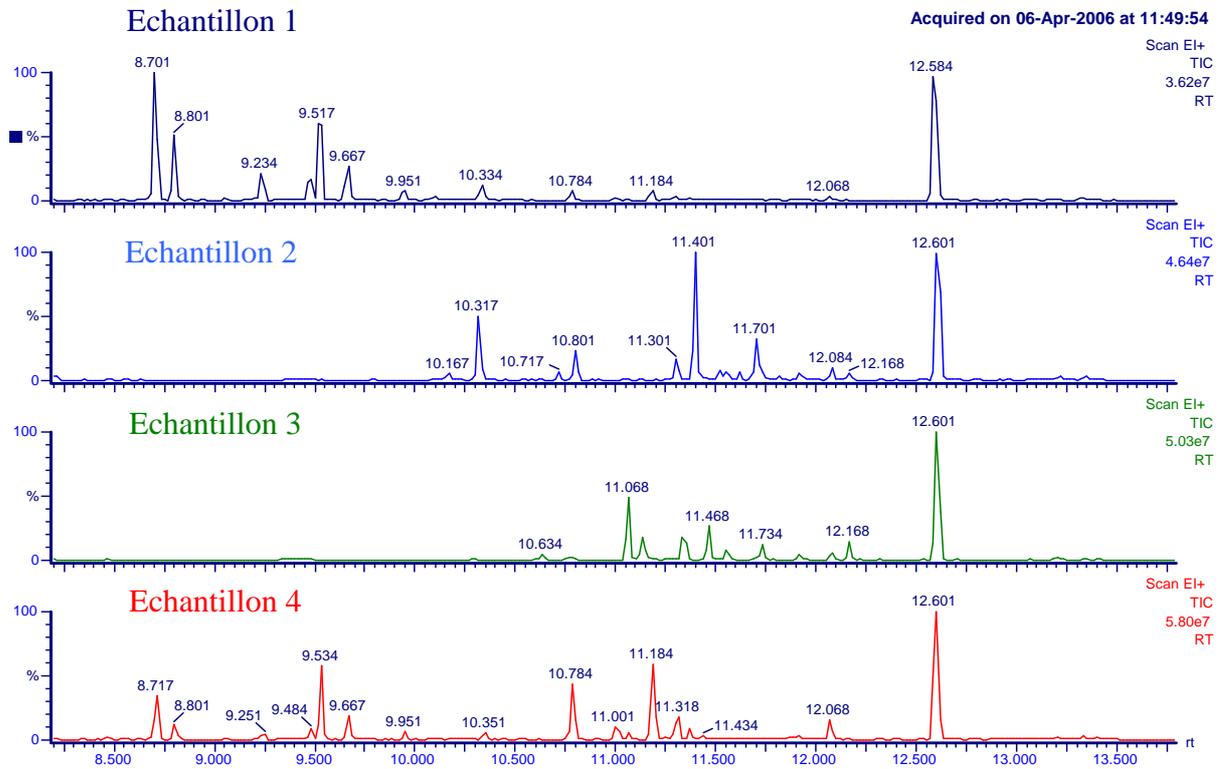
Adéquation de la réponse Y₁



Adéquation de la réponse Y₃



Annexe 5



Chromatogrammes obtenus en CPG après méthanolyse et dérivation au TMSIm de :

- Echantillon 1 : AXOS 1 de blé,
- Echantillon 2 : témoin acide glucuronique
- Echantillon 3 : témoin acide galacturonique,
- Echantillon 4 : témoins monosaccharides :
 - Arabinose (pic majoritaire T_R 8,717)
 - Xylose (pic majoritaire T_R 9,534)
 - Galactose (pic majoritaire T_R 10,784)
 - Glucose (pic majoritaire T_R 11,184)
 - Myoinositol, étalon interne (1 seul pic T_R 12,601)

Annexe 6

Fiche technique du mélange FOS RP95 : données fournisseur.

RAFTILOSE® P95

Product Sheet

Doc. A3-04*01/02



Description

RAFTILOSE®P95

- is a powder containing mainly oligofructose produced by partial enzymatic hydrolysis of chicory inulin;
- is a food ingredient composed of oligofructose, fructose, glucose and sucrose

Oligofructose

- is a mixture of oligosaccharides which are composed of fructose units linked together by $\beta(2-1)$ linkages. Part of these molecules are terminated by a glucose unit. The total number of fructose or glucose units (= Degree of Polymerisation or DP) of oligofructose ranges mainly between 2 and 8.

Compositional Specifications

All values expressed on dry matter.
Analytical Methods : see our Technical Brochures.

oligofructose	$\geq 93.2 \%$
glucose + fructose + sucrose	$< 6.8 \%$
Dry Matter (d.m.)	$97 \pm 1.5 \%$
Carbohydrate content	$> 99.5 \%$
Ash (sulphated)	$< 0.2 \%$
Conductivity (28 Brix)	$< 250 \mu\text{S}$
Heavy Metals	Pb, As each $< 0.1 \text{ mg/kg}$ Cd, Hg each $< 0.01 \text{ mg/kg}$
pH (30-50°Brix)	5.0 - 7.0

Microbiological Specifications

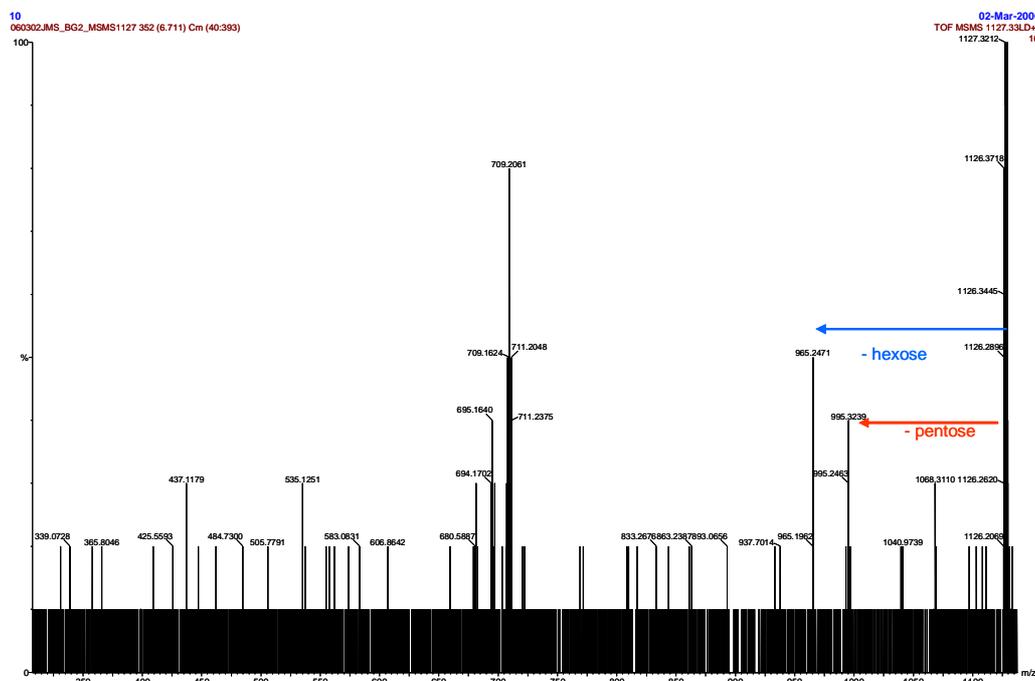
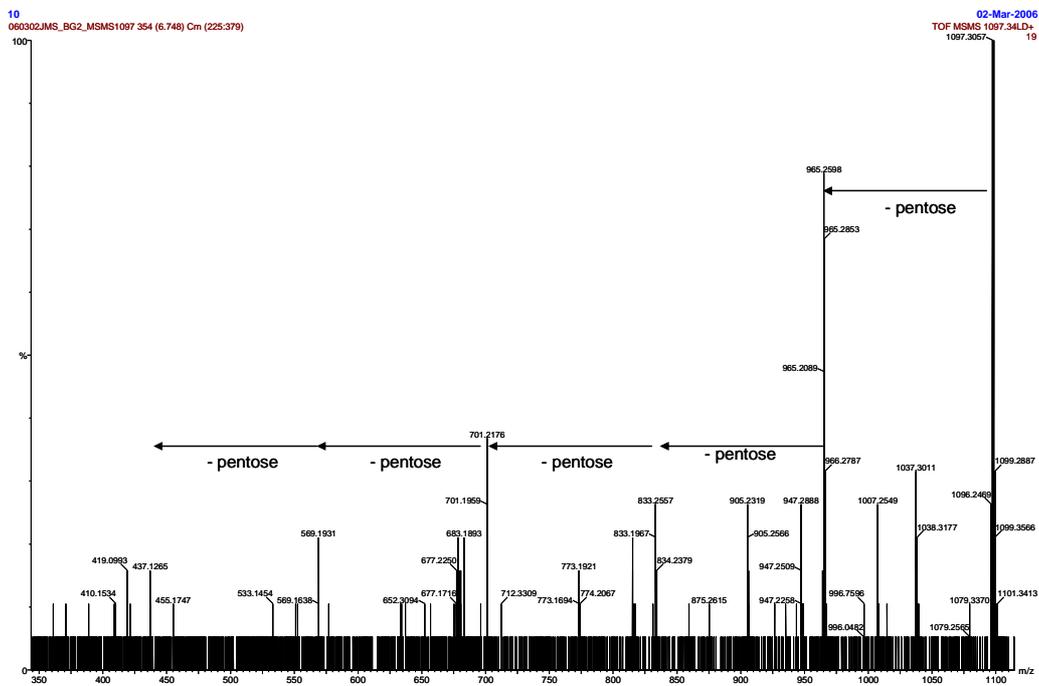
All values expressed on dry matter.
Analytical Methods : see our Technical Brochures.

Mesophilic bacteria - total count	max. 1000/g
yeasts	max. 20/g
moulds	max. 20/g
Thermophilic aerobic spores	max. 1000/g
Anaerobic H ₂ S producing thermophilic spores	max. 25/g
Enterobacteriaceae	absent in 1 g
Bacillus cereus	max. 100/g
Staphylococcus aureus	absent in 1 g
Escherichia coli	absent in 1 g
Clostridium perfringens	absent in 1 g
Clostridium botulinum	absent in 1 g
Salmonella	absent in 100 g
Shigella	absent in 10 g

ORAFI Active Food Ingredients • Aandorenstraat 1, B - 3300 Tienen, Belgium • Tel +32 (0)16 801 301 Fax +32 (0)16 801 308
afi@orafit.com • www.orafit.com

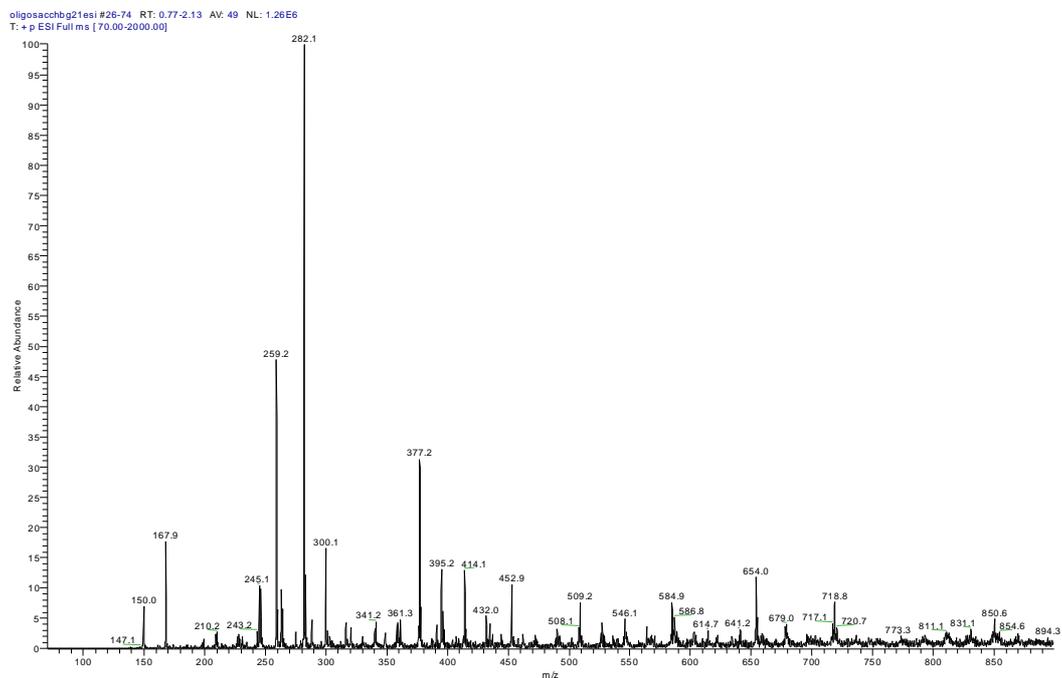
Annexe 7

Spectre de masse en mode MS-MS sur l'ion à m/z 1097 et a m/z 1127 de la fraction de AXOS 1_2 issue de maïs.

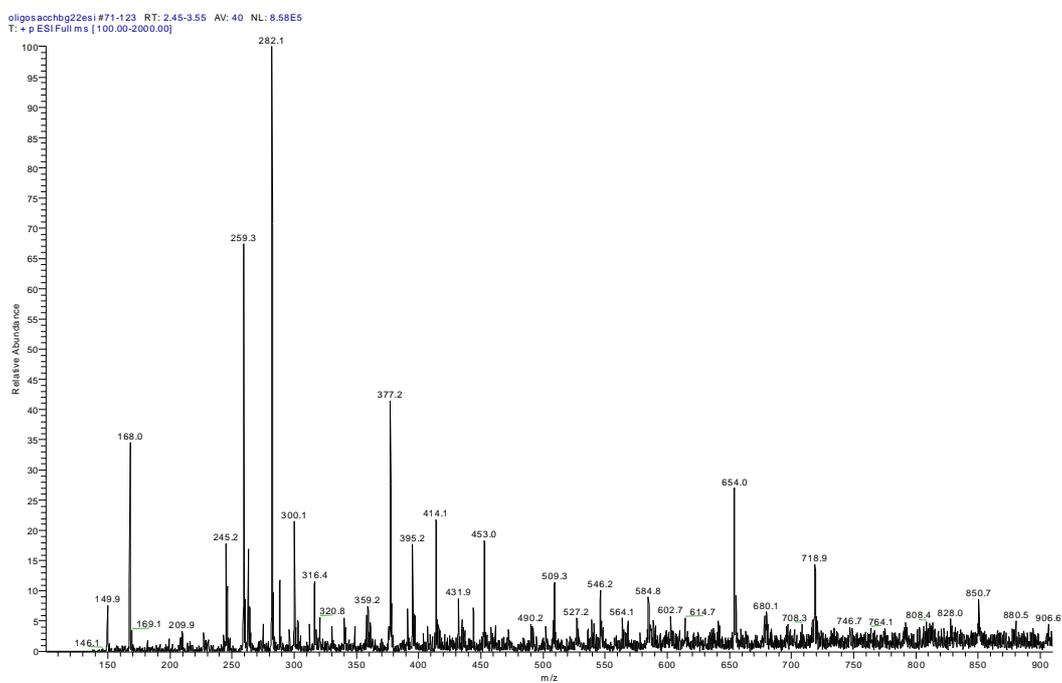


Annexe 8

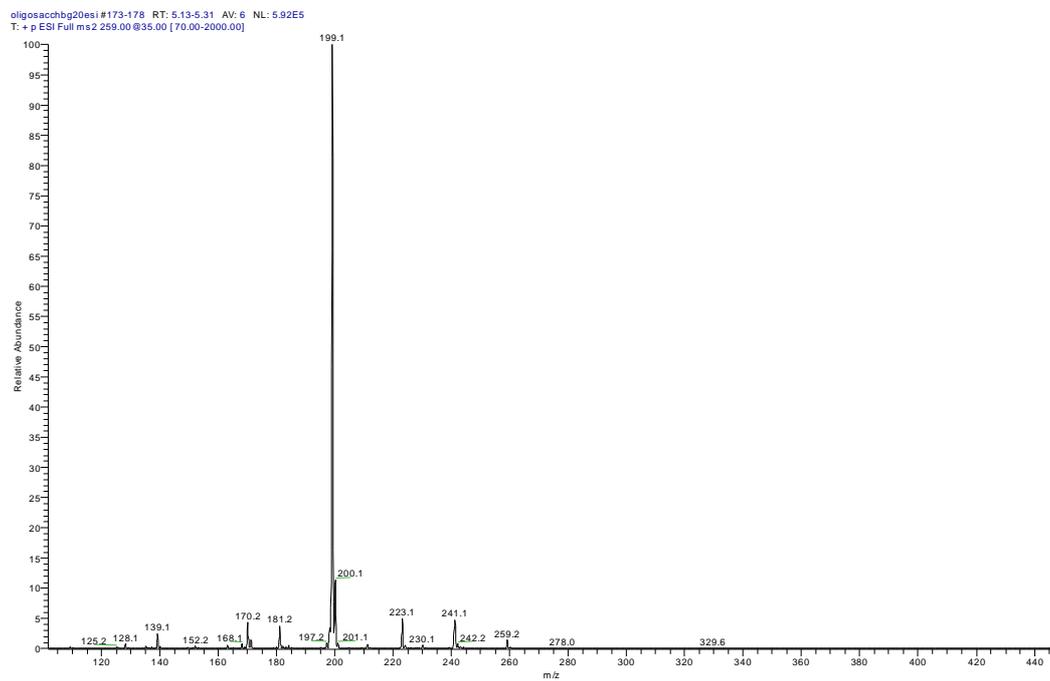
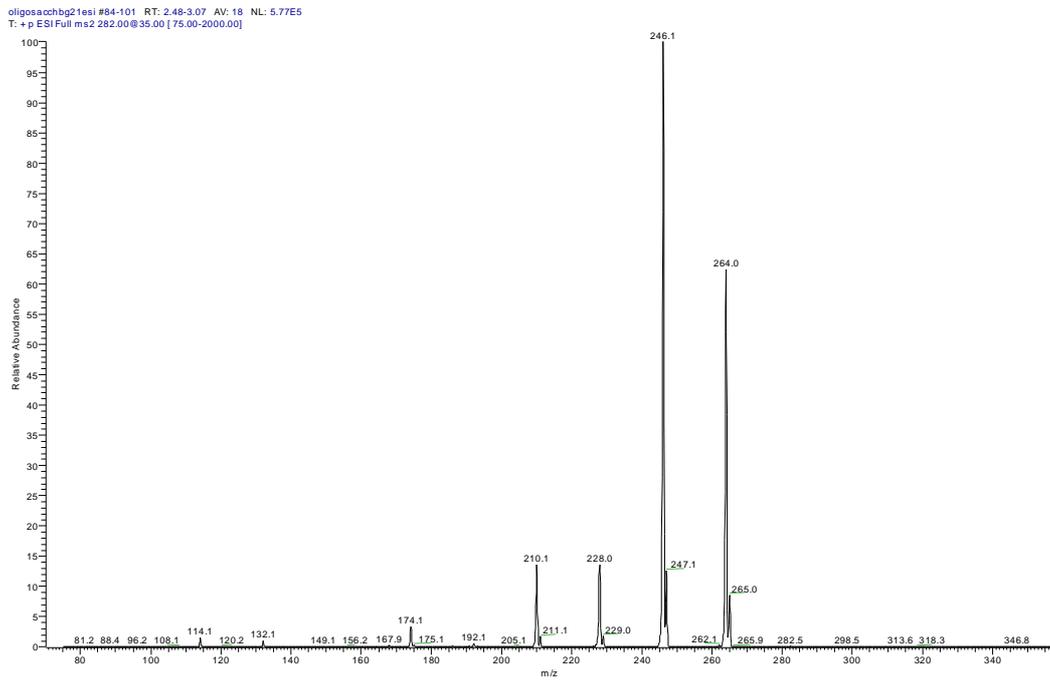
Analyse d'AXOS 2 issus de blé, par SM en mode ESI.



Analyse d'AXOS 2 issus de seigle, par SM en mode ESI.

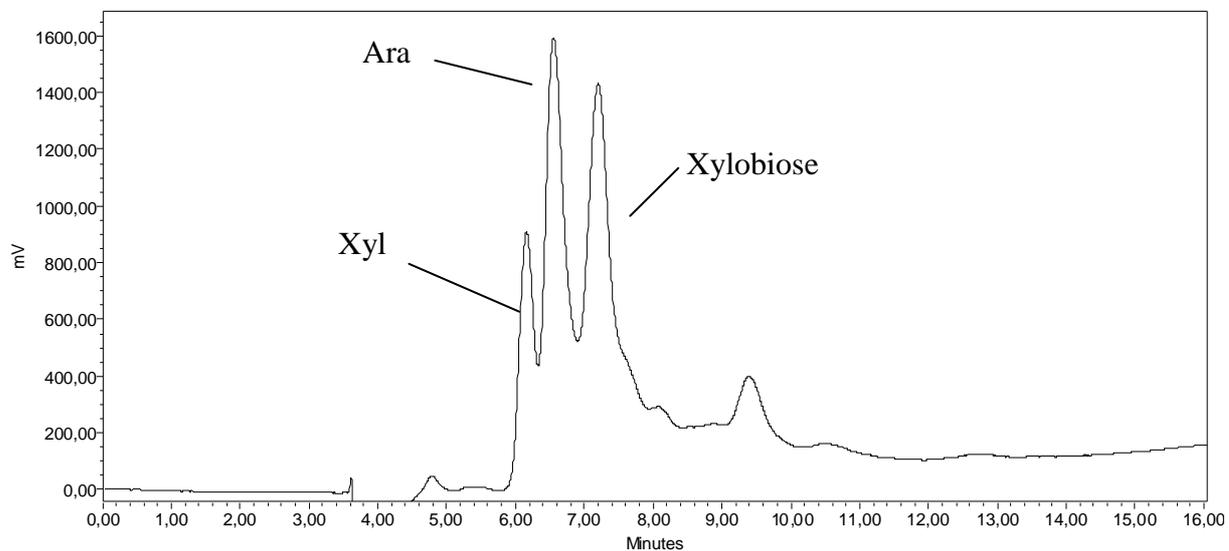


Spectre de masse en mode MS-MS sur l'ion à m/z 282 et a m/z 259 de la fraction de AXOS 2 issue de maïs

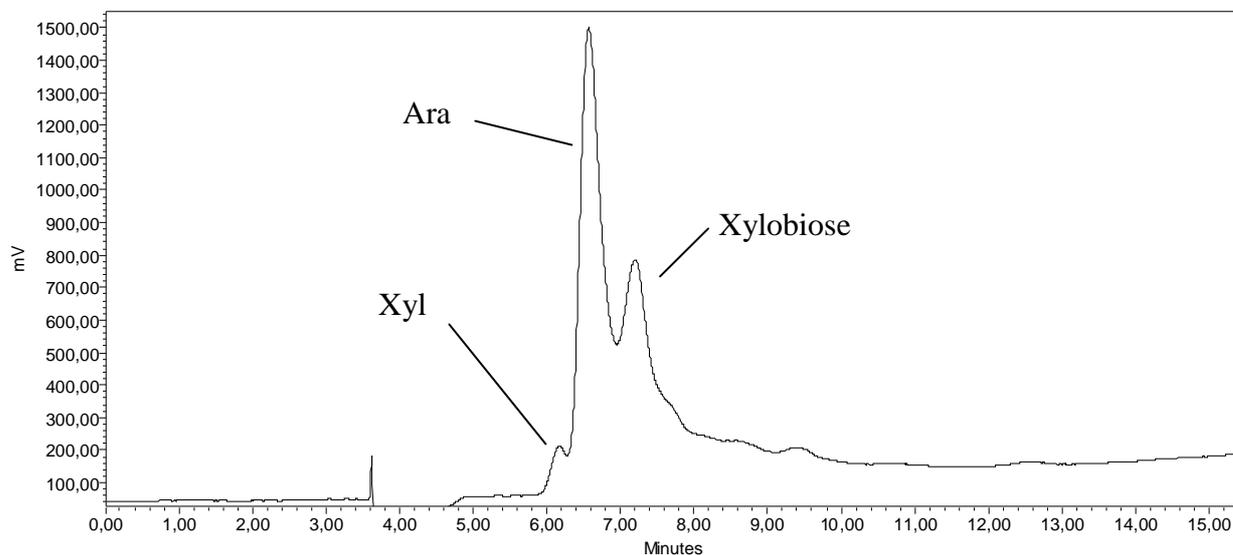


Annexe 9

Analyse de AXOS 2 de maïs par HPLC en phase normale sur gel de silice greffée amonipropyle et détection réfractométrique

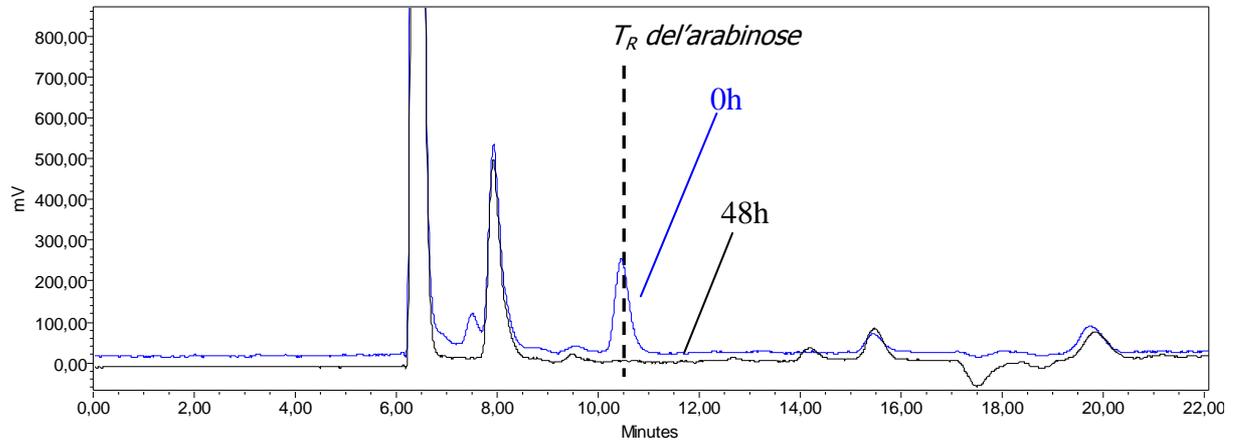


Analyse de AXOS 2 de blé par HPLC en phase normale sur gel de silice greffée amonipropyle et détection réfractométrique



Annexe 10

Analyse en HPLC, sur colonne Aminex et détection RI, d'un prélèvement d'une culture de *Clostridium butyricum*, à 0h et 48h.



Optimisation de la production d'arabinoxyloligosaccharides d'intérêt biologique à partir de sons de céréales : approches méthodologiques.

Dans le cadre de la valorisation de sous-produits de l'industrie céréalière, des sons de blé et de seigle ont été sélectionnés pour la production d'arabinoxyloligosaccharides (AXOS) d'intérêt prébiotique. Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires, glucidiques, non digestibles, stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'éléments de la flore colique parmi lesquels les bactéries probiotiques, ingérées vivantes par l'hôte produisent des effets bénéfiques sur sa santé. La fraction arabinoxylane des sons, extraite par traitement alcalin après délignification puis purification, est soumise à un traitement de dépolymérisation impliquant deux étapes successives d'hydrolyse, chimique (acide) puis enzymatique. L'optimisation du processus, par plans d'expériences, conduit à l'obtention d'AXOS avec un rendement de 50% pds/pds. La distribution en tailles des AXOS issus des différents sons est établie par SM/MALDI-TOF et ESI. Leurs propriétés prébiotiques ont été évaluées sur des souches bactériennes probiotiques reconnues, des genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* et *Bacillus* comparativement à celles de fructooligosaccharides de référence et d'AXOS issus de maïs.

Mots Clés : Arabinoxyloligosaccharide, bioconversion, valorisation, prébiotique, probiotique, plan d'expériences.

Production optimization of arabinoxyloligosaccharides of biological interest from industrial cereal bran: methodological aspects.

In the context of a valorisation of agricultural by-products, wheat and rye bran have been chosen as substrates for the production of arabinoxyloligosaccharides (AXOS) with prebiotics properties. Prebiotics are non-digestible food ingredients, mainly oligosaccharides, that benefit the host by selectively stimulating the growth and/or activity of one or a limited number of bacterial species already resident in the colon, named probiotics. Probiotics are live micro-organisms that exert health benefits beyond basic nutrition when ingested in sufficient quantities. After lignin removal and alkali treatment, the arabinoxylan fractions are converted into AXOS (50% w/w) by a two step hydrolytic treatment (chemical then enzymatic) optimized by experimental design approach. The AXOS mass distributions have been established by SM/MALDI-TOF or ESI. Their prebiotic properties have been evaluated on common probiotic bacterial strains, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *Clostridium butyricum* and *Bacillus cereus*, and compared to fructooligosaccharides and AXOS from maize bran.

Keywords: Arabinoxyloligosaccharide, bioconversion, valorisation, prebiotic, probiotic and experimental design.