



Université de Lille – Sciences et Technologies

École Doctorale Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de docteur en biotechnologies agroalimentaires,
sciences de l'aliment, physiologie.

Présentée par

Pauline Bruniaux

Développement de nouveaux ingrédients santé issus de la fermentation de coproduits de la filière chicorée

Thèse confidentielle

Préparée à l'UMRt BioEcoAgro 1158

Soutenue le 13 décembre 2024, devant le jury composé de :

Mme. Chantal Matar	Professeure (Université d'Ottawa, Université Laval)	Présidente du jury
Mme. Ingrid Fruitier	Professeure (Université de La Rochelle)	Rapportrice
Mme. Florence Husson	Maître de conférences (HDR) (L'institut Agro Dijon)	Rapportrice
M. Benoit Cudennec	Professeur (Université de Lille)	Directeur de thèse
M. François Coutte	Professeur (Université de Lille)	Co-directeur de thèse
M. Christophe Flahaut	Maître de conférences (HDR) (Université d'Artois)	Co-encadrant
M. Cyril Raveschot	Docteur (VF Bioscience)	Co-encadrant - invité

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux, notamment Ingrid Fruitier et Florence Husson en tant que rapportrices et à Chantal Matar en tant que présidente du jury.

Je remercie Jean-Louis Hilbert de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et Rozenn Ravallec, au sein de la team 7. Travailler au sein de cette équipe a été un réel plaisir.

Merci infiniment à Marc Fremont, qui m'a permis de réaliser cette thèse au sein de VF Bioscience. Merci pour votre confiance, j'ai hâte de continuer cette aventure avec vous. Marjo, merci pour ta bonne humeur, tu as toujours été là pour m'aider, répondre à mes questions et m'encourager, je suis heureuse de pouvoir continuer à travailler avec toi.

Merci Benoit d'avoir dirigé cette thèse et de m'avoir permis d'appartenir à la team 7. Merci pour ton implication, ta disponibilité, ta confiance, ton soutien, ta bonne humeur quand les résultats n'étaient pas toujours ceux attendus, et pour tes mille idées à la seconde. Cela a été un réel plaisir de pouvoir faire de la recherche à tes côtés.

Merci François pour ta disponibilité, ton encadrement, ces réunions régulières qui ont permis de faire avancer ce projet au mieux. Grâce à toi, j'ai énormément appris en microbiologie et en gestion de projet.

Merci Christophe de m'avoir aidée sur la partie caractérisation, qui est loin d'être mon point fort, merci pour tes conseils, tes critiques constructives et ta bienveillance.

Un immense merci à mon encadrant Cyril. Merci pour tout, ta disponibilité, ton aide, tes conseils, ton expérience, pour m'avoir dit quand c'était bien mais aussi quand c'était moins bien. Tu as été un vrai soutien durant ces trois années et je suis heureuse de pouvoir continuer à tes côtés.

Je souhaite remercier la Chaire Charles Violette et ses deux porteurs, Renato Froidevaux et François Coutte, de m'avoir permis de présenter mes travaux à de multiples reprises et de m'avoir permis d'avoir des échanges avec différents spécialistes et entreprises qui ont

pu faire avancer le projet. Je remercie également certains partenaires de cette Chaire, comme l'entreprise Leroux qui nous a fournis les co-produits de la filière chicorée, ainsi que l'association des producteurs d'endive de France (APEF) pour les co-produits de la filière endive qui ont été essentiels à la réalisation de ce projet.

Merci à la plateforme RealCat, et notamment à Quentin Haguët, de m'avoir permis de réaliser l'identification des souches provenant de l'isolement de l'endive, qui a été essentielle à la réalisation du projet, ainsi qu'à la société GenoScreen.

Je tiens également à remercier Maxime, Magalie, Tahiri et Mélanie pour leur aide dans toute la partie analytique du projet. Sans vos connaissances, il aurait été très difficile de tirer quoi que ce soit de ces montagnes de données.

Un grand merci à Théo de m'avoir aidée tout au long de ma thèse, pour ta disponibilité, ta gentillesse et pour tous les dénombrements que tu as dû faire à cause de moi. Merci Chloé pour ton aide sur la fermentation, et à Adrien pour l'ambiance que tu as apporté au bureau et ton soutien infailible. Merci à Sara, Fatima, Yanath, Kévin, Matthieu, et Servane pour votre bonne humeur et votre aide. Merci à Clémence et Matthias, le bureau de Polytech est bien plus drôle grâce à vous !

Un grand merci à la famille team 7. Merci à Camille, Hairati, Sandy, Barbara, Mathie, Elodie, Léa, Céline, Thomas, Julien et Tushar pour leur aide tout au long de ma thèse, leur disponibilité, leur soutien et tous les moments que l'on a passé au labo et en dehors. Merci Mélissa, tu m'as beaucoup aidée et, travailler avec toi est un réel plaisir, la team 7 a beaucoup de chance de t'avoir. Merci à la team Deino, Louis, Mathieu, Anne-So, Vanessa pour l'ambiance que vous avez apportée au SN2 et à Yannick pour ces heures passées à jouer au tarot le midi. Merci à mon binôme de Prague, Carlos, et à notre panaméen, Brayon, pour votre bonne humeur, votre soutien et pour tous les moments que l'on a passé ensemble. J'ai rencontré bien plus que des collègues mais de véritables amis (Brayon, je n'oublie pas le voyage au Panama 😊).

Pour finir, merci à toi Morgan, mon binôme de thèse, on a vécu toutes les étapes clés d'une thèse ensemble, entre le chapitre, le stress, les fermentations... cette thèse aurait été moins sympa sans toi !

Merci à mes amis, Manon, Camille, Baptiste, Emma, Thibaut, Antoine, Nathan et Arthur pour vos encouragements, votre soutien, et tous les moments passés avec vous.

Merci mille fois à mes parents qui ont été là du début à la fin, vous m'avez encouragée, supportée, et soutenue à chaque étape. Merci pour les petits gâteaux livrés à domicile et pour l'organisation du pot de thèse ! Vous êtes géniaux et je vous aime fort !

Pour finir, merci à toi l'homme de ma vie ! Qui mieux que toi peut comprendre ce que c'est que de faire une thèse, et tout ce que cela implique. Tu m'as toujours soutenue, que ce soit émotionnellement ou professionnellement. Merci pour ton aide que ce soit pour les fermentations ou pour la culture cell... Mais surtout merci de m'avoir réconfortée, dans les moments où le stress était trop important ou que les résultats n'allaient pas dans mon sens. Je n'aurais jamais passé d'aussi belles années sans toi ! Et surtout merci d'avoir postulé à ce stage de master pour que nos chemins se croisent ! Je t'aime !

Valorisation scientifique

Posters

- Congrès : One Health International Days (OHID), du 27 au 29 juin 2022, Villeneuve d'Ascq, France.
Titre : Development of health ingredients from chicory by-products fermentation : first step strains selection.
Auteurs : Pauline Bruniaux, Cyril Raveschot, Théo Daboudet, Christophe Flahaut, François Coutte et Benoit Cudennec

Conférences orales

- Congrès : 4th International Conference on Food Bioactives Health (FBHC), du 18 au 21 septembre 2023, Prague, République Tchèque.
Titre : Valorization of endive co-products for fonctionnal food applications.
Auteurs : Pauline Bruniaux, Cyril Raveschot, Christophe Flahaut, François Coutte et Benoit Cudennec
- Congrès : One Health International Days (OHID), du 27 et 28 juin 2024, Villeneuve d'Ascq, France.
Titre : Valorizing Belgian endive co-products for anti-oxidant ingredient innovation.
Auteurs : Pauline Bruniaux, Cyril Raveschot, Christophe Flahaut, François Coutte et Benoit Cudennec
- Congrès : NutrEvent, du 1 au 2 octobre 2024, Lille, France
Titre : Développement de procédés de bioconversion de produits végétaux pour des applications santé.
Auteurs : Pauline Bruniaux, Morgan Le Rouzic, Cyril Raveschot, François Krier, Fabrice Coloma, Vincent Phalip, Christophe Flahaut, Rozenn Ravallec, Benoit Cudennec et François Coutte
- Congrès : Tech-Day, du 13 au 14 novembre 2024, Amiens, France.
Titre : Valorisation de co-produits végétaux par procédés microbiens pour des applications santé, exemples des travaux issus de la Chaire Industrielle Charles Viollette.
Auteurs : Pauline Bruniaux, Morgan Le Rouzic, Cyril Raveschot, François Krier, Fabrice Coloma, Vincent Phalip, Christophe Flahaut, Rozenn Ravallec, Benoit Cudennec et François Coutte

Chapitre d'ouvrage

- Nom de l'ouvrage : *Lactobacillus* - A Multifunctional Genus.
Titre : *Lactobacillus* Use for Plant Fermentation : New Ways for Plant-Based Product Valorization.
Auteurs : Morgan Le Rouzic, Pauline Bruniaux, Cyril Raveschot, François Krier, Vincent Phalip, Rozenn Ravallec, Benoit Cudennec et François Coutte.

Article scientifique

- Prêt pour soumission
Titre : Lactic fermentation of chicory by-products : a way of valorization for antioxidant ingredient production.
Auteurs : Pauline Bruniaux, Cyril Raveschot, Théo Daboudet, Maxime De Sousa, Christophe Flahaut, François Coutte et Benoit Cudennec.

Liste des abréviations

4CL : 4-coumaroyl CoA lyase	CUPRAC : <i>reducing antioxidant capacity</i>
AAPH : 2,2'-azobis-2-méthylpropanimidamide, dihydrochloride	CSE : <i>Caffeoyl Sikimate Esterase</i>
ABTS : le 2,2-Azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid radical scavenging	D : décarboxylases
ACP : analyses en composantes principales	DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
ADN : acide désoxyribonucléique	DGIS : digestion gastro-intestinale simulée
ADNdb : acide désoxyribonucléique double brin	DHPD : le N,N-Diméthyl-p-phenylenediamine radical scavenging
ADNsb : acide désoxyribonucléique simple brin	DMEM : <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
ALAT : alanine aminotransférase	DO : densité optique
Akt-1 : protéine kinase B	DPPH : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle
APEF : association des producteurs d'endives de France	E : estérification
ASAT : aspartate aminotransférase	ECBU : épiluchures de Carmines® broyées au blender et à l'ULTRA-TURRAX®
BHA : butylhydroxyanisole	EEBU : épiluchures d'endives broyées au blender et à l'ULTRA-TURRAX®
BHT : butylhydroxytoluène	EFSA : <i>european food safety authority</i>
BI : barrière intestinale	EN : endive
C3'H : p-coumaroyl ester 3'-hydroxylase	ERO : espèces réactives de l'oxygène
C4H : cinnamate 4-hydroxylase	FDA : <i>food and drug administration</i>
CCK8 : cell counting kit-8	FE : féruloyl estérase
CCL₄ : tétrachlorure	FRAP : <i>ferric ion reducing antioxidant power</i>
CE : cinnamoyl estérase	GLP-1 : glucagon-like peptide-1
CNTBU : fines de cossettes non torréfiées broyées au blender et à l'ULTRA-TURRAX®	GN : gélose nutritive
COMT : acide caféique-O-méthyltransférase	GPI : glucosylphosphatidylinositol
COX-2 : cyclooxygénase-2	GRAS : <i>generally recognized as safe</i>
	H : hydroxylation

HBSS : <i>Hank's balanced salt solution</i>	PIP : phospholipides d'inositol
HCT : hydroxycinnamoyl-CoA	PG : peptidoglycanes
HEPES : 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique	PLA : acide polypeptidique
HHBSS : HEPES-buffered Hank's balanced salt solution	PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate
IL : interleukines	PRR : <i>Pattern Recognition Receptor</i>
iNOS : oxyde nitrique synthase	PYY : peptide YY
INAF : institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels	QPS : <i>qualified presumption of safety</i>
LAM : lipoarabinomannanes	R : réductases
LP : lipoprotéines	RC : racines en champs
LPS : lipopolysaccharides	RF : racines après forçage
LST : lactones sesquiterpènes	RPMI : <i>Roswell park memorial institute medium</i>
LTA : acide lipoteichoïque	SCFA : <i>short-chain fatty acids</i>
M : méthylation	SOD : superoxyde dismutase
Man : mannane	SVF : sérum de veau fœtal
MB : milieu de base	TBHQ : tert-butylhydroquinone
MCBU : marc de chicorée broyé au blender et à l'ULTRA-TURRAX®	TEAC : <i>trolox equivalence antioxidant capacity</i>
MICI : maladies inflammatoires chroniques intestinales	TEER : résistance électrique transépithéliale
MRS : <i>deMan, Rogosa, Sharpe</i>	TLR : <i>toll-like receptor</i>
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite	TNF-α : tumor necrosis factor-alpha
NF-κB : facteur nucléaire kappa B	TOSCA : <i>total radical scavenging capacity</i>
NOS : oxyde nitrique	TRAP : <i>total radical trapping antioxidant parameter</i>
ORAC : <i>oxygen radical absorbance capacity</i>	Trolox : 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique
PAL : phénylalanine ammonia-lyase	UV : ultraviolet
Papp : perméabilité apparente	Zym : zymosane
PBS : phosphate-buffered saline	
PDA : potato dextrose agar	

Sommaire

Remerciements.....	3
Valorisation scientifique	7
Liste des abréviations	9
Liste des figures	17
Liste des tables	21
Préambule	23
Introduction bibliographique	25
1. <i>Cichorium intybus</i>	27
1.1. La chicorée : <i>Cichorium intybus</i> variété <i>sativum</i>	27
1.1.1. Généralités sur les <i>Asteraceae</i>	27
1.1.2. Production de la chicorée industrielle.....	27
1.2. L'endive : <i>Cichorium intybus</i> variété <i>foliosum</i>	29
1.2.1. Généralités sur l'endive	29
1.2.2. Production de l'endive	30
1.3. Composition moléculaire de la chicorée et de l'endive	32
1.3.1. L'inuline.....	34
1.3.2. Les lactones sesquiterpènes.....	36
1.3.3. Les acides hydroxycinnamiques	39
2. Propriétés bioactives de la chicorée et de l'endive	43
2.1. Activité antioxydante	43
2.1.1. Le stress oxydatif	43
2.1.2. Les molécules antioxydantes	47
2.2. Activité anti-inflammatoire	49
2.2.1. L'inflammation.....	49
2.2.2. L'activité anti-inflammatoire de la chicorée	51
2.3. Activité hépato-protectrice	53
2.3.1. Les maladies hépatiques	53
2.3.2. Les propriétés hépato-protectrices de la chicorée.....	54
2.4. Les bioactivités de la chicorée au niveau intestinal.....	56
2.4.1. La digestion gastro-intestinale	56
2.4.2. L'impact du microbiote intestinal	57
3. Voies de valorisation des co-produits de chicorée et d'endive	58

3.1.	Les co-produits alimentaires	58
3.2.	Les voies de valorisation des co-produits alimentaires d'origine végétale..	60
3.3.	La valorisation des co-produits de chicorée et d'endive	62
4.	La fermentation par les souches de <i>Lactobacillus</i> comme voie de valorisation.	63
4.1.	Généralités sur les <i>Lactobacillus</i>	63
4.2.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VS <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	66
4.3.	La valorisation des co-produits végétaux par les <i>Lactobacilles</i>	69
4.4.	La fermentation des chicorées par les <i>Lactobacillus</i>	70
	<i>Objectifs de la thèse</i>	73
	<i>Matériels et Méthodes</i>	77
1.	Matériels	79
1.1.	Co-produits de chicorée et d'endive	79
1.2.	Souches de <i>Lactobacillus</i> provenant de la collection de VF Bioscience	79
1.3.	Isolement du biote de l'endive.....	80
1.3.1.	Co-produits de l'endive.....	80
1.3.2.	Milieux de culture	80
1.3.3.	Isolement du biote externe	81
1.3.4.	Isolement du biote endophyte.....	82
1.3.5.	Macération des co-produits	82
1.3.6.	Identification des souches	83
2.	Méthodes	84
2.1.	Culture des <i>Lactobacillus</i> sur des extraits d'endive ou de chicorée	84
2.1.1.	Milieu de culture	84
2.1.2.	Sélection des co-produits : culture en deepwell	84
2.1.3.	Sélection des souches : culture en fiole d'Erlenmeyer	85
2.1.4.	Culture en bioréacteurs	86
2.1.5.	Amélioration des paramètres de culture	87
2.1.6.	Amélioration de la croissance des <i>Lactobacillus</i>	87
2.1.6.1.	Détermination des auxotrophies en acides aminés et en vitamines des trois souches de <i>Lactobacillus</i> sélectionnées	87
2.1.6.2.	Amélioration de la croissance des <i>Lactobacillus</i> en milieu simple complétement.....	89

2.1.6.3. Amélioration de la croissance des <i>Lactobacillus</i> par complémentation du milieu de fermentation composé d'épluchures d'endives	89
2.1.7. Mesure de l'activité antioxydante par la méthode DPPH	90
2.1.8. Conditions de culture des lignées cellulaires	90
2.1.9. Analyse de la cytotoxicité.....	91
2.1.10. Mesure de l'activité antioxydante par la méthode au DCFH ₂ -DA.....	91
2.1.11. Détermination de l'activité hépato-protectrice	93
2.1.12. Détermination de l'activité anti-inflammatoire	94
2.2. Devenir des surnageants de fermentation dans le tractus gastro-intestinal	95
2.2.1. Digestion gastro-intestinale simulée <i>in vitro</i>	95
2.2.2. Interactions des digestats avec un modèle de barrière intestinale	97
2.2.2.1. Vérification de l'intégrité de la barrière intestinale	97
2.2.2.2. Incubation des échantillons avec le modèle de barrière intestinale	98
2.2.2.3. Évaluation de la perméabilité apparente (Papp) par Lucifer Yellow	99
2.2.2.4. Évaluation de la confluence et de la présence éventuelle de multicouches cellulaires.....	99
2.3. Caractérisation biochimique des échantillons par chromatographie et spectrométrie de masse	100
2.3.1. Caractérisation des polyphénols par HPLC	100
2.3.2. Caractérisation des échantillons par approche métabolomique	100
2.4. Analyses en composantes principales et factorielle multiple	101
2.5. Statistiques	102
Résultats	105
1. Isolement du biote de l'endive	107
2. Criblage des co-produits de chicorée et d'endive par fermentation des souches de <i>Lactobacillus</i>	109
2.1. Évaluation de la croissance des souches sélectionnées sur les co-produits de chicorée et d'endives	109
2.1.1. Évaluation de la croissance par acidification	109
2.1.2. Évaluation de la croissance par dénombrement	111
2.2. Évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH des différents substrats fermentés	112
2.3. Évaluation de l'activité hépato-protectrice des différents substrats fermentés	114

2.3.1.	Mises au point du test hépato-protecteur.....	114
2.3.2.	Activité hépato-protectrice des surnageants de fermentation des différents substrats	117
2.4.	Caractérisation des polyphénols par analyse HPLC-PDA des surnageants de fermentation des différents substrats	118
2.5.	Analyse factorielle multiple pour le criblage des co-produits d'endive et de chicorée	121
3.	Criblage des souches de <i>Lactobacillus</i>	123
3.1.	Évaluation de la croissance des souches de <i>Lactobacillus</i> sur les épluchures d'endive	123
3.2.	Activité antioxydante sur les cellules hépatiques et intestinales	124
3.3.	Activité anti-inflammatoire sur les U937 différenciées en macrophages...	126
3.4.	Caractérisation des surnageants de fermentation des trois souches sélectionnées par approche métabolomique	128
3.5.	Analyse en composantes principales des fermentations d'épluchures d'endives réalisées en erlenmeyer	129
4.	Optimisation des paramètres de fermentation	130
4.1.	Évaluation de la croissance	131
4.2.	Évaluation de l'activité antioxydante sur les cellules hépatiques HepG2 ..	132
4.3.	Évaluation de l'activité hépato-protectrice des surnageants de fermentation sur les cellules HepG2	134
5.	Évaluation de la croissance au cours des fermentations réalisées en bioréacteurs avec les paramètres précédemment sélectionnés	135
6.	Optimisation de la croissance des <i>Lactobacillus</i>	136
6.1.	Détermination des auxotrophies en acides aminés et en vitamines des souches de <i>Lactobacillus</i> sélectionnées.....	136
6.2.	Suivi de croissance en milieu complémenté.....	138
6.2.1.	Complémentation du milieu MB en extrait de levure	138
6.2.2.	Complémentation du milieu de fermentation contenant les épluchures d'endives en extrait de levure	140
7.	Impacts de la digestion et du passage de la barrière intestinale sur les bioactivités des surnageants des fermentations réalisées en bioréacteurs	142
7.1.	Intégrité de la barrière intestinale et mesure de la perméabilité des jonctions serrées au contact des digestats	143
7.2.	Activité antioxydante sur les cellules HepG2 des échantillons après fermentation, DGIS et après passage de la barrière intestinale	145
	<i>Discussion</i>	147

1. Isolement du biote de l'endive	149
2. Screening des co-produits et des souches de <i>Lactobacillus</i>	150
3. Optimisation des paramètres de fermentation et de la croissance des souches de <i>Lactobacillus</i>	152
4. Activité antioxydante des co-produits et des surnageants de fermentation	156
5. Activité anti-inflammatoire des co-produits et des surnageants de fermentation	160
6. Impacts de la digestion et du passage de la barrière intestinale sur les activités antioxydantes	163
<i>Conclusions et perspectives</i>	167
<i>Références</i>	175
<i>Annexes</i>	201

Liste des figures

<i>Figure 1 : Schéma présentant la production de la chicorée industrielle (Réussir la culture de l'endive ; Fabrication de la chicorée).</i>	28
<i>Figure 2 : Arbre phylogénétique des chicorées (Chicorée et endive).</i>	29
<i>Figure 3 : Différentes variétés d'endives produites par l'APEF.</i>	30
<i>Figure 4 : Représentation schématique des différentes étapes de la production de l'endive (Cichorium intybus var. foliosum).</i>	31
<i>Figure 5 : Structure moléculaire de l'inuline.</i>	34
<i>Figure 6 : Les 8 principales lactones sesquiterpènes de la chicorée d'après Van Arkel et al., (2022).</i>	37
<i>Figure 7 : Voie de synthèse des acides hydroxycinnamiques de la chicorée (Legrand et al., 2016; Taofiq et al., 2017).</i>	41
<i>Figure 8 : Voie de synthèse des ERO au sein des cellules, d'après (Dussert, 2020)</i>	44
<i>Figure 9 : Production d'ERO dans la membrane interne de la mitochondrie.</i>	46
<i>Figure 10 : Localisation des TLR au sein de la cellule et leurs ligands respectifs, selon Uematsu and Akira, (2008); Wicherska-Pawłowska et al., (2021).</i>	50
<i>Figure 11 : Photographies de Limosilactobacillus reuteri sur une gélose MRS.</i>	64
<i>Figure 12 : Schéma des voies fermentaires des Lactobacilles.</i>	65
<i>Figure 13 : Transformations des esters d'acides cinnamiques par les enzymes de L. plantarum et L. reuteri (Rodríguez et al., 2008; Muñoz et al., 2017).</i>	67
<i>Figure 14 : Diverses utilisations de la chicorée fermentée par les Lactobacilles.</i>	71
<i>Figure 15 : Démarche expérimentale adoptée pour mener à bien les objectifs de l'étude.</i>	76
<i>Figure 16 : Photographies des co-produits utilisés pour l'isolement du biote de l'endive.</i>	80
<i>Figure 17 : Photographie annotée d'un bioréacteur en fonctionnement.</i>	86
<i>Figure 18 : Mécanisme intracellulaire de l'oxydation induite par l'AAPH sur la DCFH₂-DA.</i>	92
<i>Figure 19 : Protocole permettant de déterminer l'activité antioxydante cellulaire.</i>	93
<i>Figure 20 : Protocole permettant de déterminer l'activité hépato-protectrice sur les cellules HepG2.</i>	94
<i>Figure 21 : Protocole permettant de déterminer l'activité anti-inflammatoire sur les cellules U937.</i>	95
<i>Figure 22 : Schéma de la digestion gastro-intestinale simulée in vitro des surnageants de fermentation.</i>	97
<i>Figure 23 : Schéma illustrant le modèle de barrière intestinale réalisé à l'aide de la coculture Caco-2/HT29-MTX.</i>	98
<i>Figure 24 : Diminution du pH au cours des fermentations.</i>	110
<i>Figure 25 : Croissance des souches de lactobacillus dans les différents milieux de fermentation.</i>	111
<i>Figure 26 : Activité antioxydante des surnageants de fermentation en µM d'équivalent Trolox.</i>	113

<i>Figure 27 : Impact du Trolox, de la vitamine C et de l'éthanol sur la viabilité des cellules HepG2.</i>	114
<i>Figure 28 : Comparaison de l'effet du Trolox sur la viabilité des cellules HepG2 en fonction du moment de son ajout.</i>	115
<i>Figure 29 : Effet du Trolox à différentes concentrations en présence d'éthanol sur la viabilité des cellules HepG2.</i>	116
<i>Figure 30 : Activité hépato-protectrice des surnageants de fermentation sur les cellules HepG2 exposées à une concentration de 1,95 mM d'éthanol.</i>	117
<i>Figure 31 : Profils phénoliques des co-produits d'endive et de chicorée obtenus par HPLC.</i>	119
<i>Figure 32 : Caractérisation des polyphénols dans les surnageants de fermentation des co-produits d'endive et de chicorée.</i>	120
<i>Figure 33 : Analyse factorielle multiple réalisée à partir de la croissance, la caractérisation et les bioactivités obtenues après fermentation des co-produits d'endive et de chicorée en Deepwell.</i>	122
<i>Figure 34 : Évaluation de la croissance des différentes souches inoculées à 5 X après 24 h de fermentation.</i>	124
<i>Figure 35 : Activité antioxydante des surnageants de fermentation à 0 h et 24 h avec une concentration d'inoculum de départ de 5 X évaluée par la production d'ERO intracellulaire à l'aide de la DCFH2-DA.</i>	125
<i>Figure 36 : Mesure de la réponse inflammatoire des cellules U937 en présence des surnageants de fermentation (24 h, 5 X) et de LPS.</i>	126
<i>Figure 37 : Caractérisation des surnageants de fermentation en acide lactique, en acides hydroxycinnamiques et en N-Fructosyl pyroglutamate.</i>	128
<i>Figure 38 : Analyse en composantes principales réalisée à partir des données de croissance, de caractérisation et de bioactivités obtenues à partir des fermentations d'épluchures d'endives.</i>	129
<i>Figure 39 : Suivi de la croissance lors des fermentations d'épluchures d'endives en fonction du temps et de la concentration initiale en inoculum.</i>	132
<i>Figure 40 : Activité antioxydante des surnageants de fermentation des souches 31c, 46a et RC16 sur les cellules HepG2 à différents temps de fermentation, et de concentrations d'inoculum de départ.</i>	133
<i>Figure 41 : Activité hépato-protectrice des surnageants de fermentation en fonction de la concentration en inoculum de départ et du temps de fermentation sur les cellules HepG2.</i>	134
<i>Figure 42 : Croissances des souches de Lactobacillus durant la fermentation sur milieu EEBU en bioréacteur.</i>	136
<i>Figure 43 : Croissance des souches de Lactobacillus en milieu MB complétement ou non, ou en milieu MRS.</i>	139
<i>Figure 44 : Croissance des souches de Lactobacillus en fonction de la concentration en extrait de levure dans les milieux contenant les épluchures d'endives et le milieu MB.</i>	140
<i>Figure 45 : Démarche expérimentale adoptée pour étudier l'impact de la digestion gastro-intestinale et du contact avec la barrière intestinale sur les activités biologiques des surnageants de fermentation.</i>	142

Figure 46 : Vérification de l'intégrité et de la perméabilité apparente de la coculture Caco-2/HT29-MTX..... 144

Figure 47 : Coloration au DAPI de la coculture Caco-2/HT29-MTX après 3 semaines de culture..... 145

Figure 48 : Activité antioxydante des surnageants de fermentation sur les cellules HepG2 après fermentation, digestion et passage de la barrière intestinale..... 146

Figure 49 : Schéma récapitulatif de la démarche scientifique et des principaux résultats de la thèse. 171

Figure 50 : Interactions des polyphénols avec la voie de signalisation TLR4/NF- κ B (Yu et al. 2022). 173

Figure 51 : Perspectives envisagées pour la suite du projet. 174

Liste des tables

<i>Table 1 : Composition en macronutriments de la chicorée pour 100 g de matière sèche selon Nwafor et al., (2017); Perović et al.,(2021); Pouille et al.,(2022).</i>	<i>33</i>
<i>Table 2 : Espèces réactives de l’oxygène - production et rôle (Gülçin, 2020; Sies and Jones, 2020)......</i>	<i>45</i>
<i>Table 3 : Origine et nom des souches de Lactobacillus utilisées durant la thèse.</i>	<i>79</i>
<i>Table 4 : Composition des milieux utilisés pour l’isolement du biote de l’endive.</i>	<i>81</i>
<i>Table 5 : Concentration des co-produits dans le PBS et abréviations utilisées</i>	<i>84</i>
<i>Table 6 : Acides aminés et vitamines testés pour déterminer les auxotrophies des souches de Lactobacillus.</i>	<i>88</i>
<i>Table 7 : Collection issue des co-produits d’endive (var. Darling et Baccara).</i>	<i>108</i>
<i>Table 8 : Croissances des souches de Lactobacillus en absence d’un acide aminé ou d’une vitamine.....</i>	<i>137</i>
<i>Table 9 : Gain en activité antioxydante (%) obtenu par fermentation, évaluée par la méthode DPPH, de différentes matrices.</i>	<i>158</i>

Préambule

Cette thèse CIFRE est le fruit d'un partenariat entre l'entreprise VF Bioscience et l'unité mixte de recherche transfrontalière (UMRt) 1158 BioEcoAgro. Cette UMRt regroupe environ 400 chercheurs, techniciens et doctorants des deux côtés de la frontière franco-belge. Elle constitue un pôle d'excellence international dans les domaines du génie biologique appliqué à l'agriculture, aux biotechnologies, à l'agroalimentaire et à l'environnement. VF Bioscience, fondée en 2011, est spécialisée dans le développement d'ingrédients santé et de compléments alimentaires innovants, préventifs contre diverses pathologies. Ses produits sont élaborés à partir de plantes, de probiotiques et de produits issus de la fermentation. L'entreprise possède une vaste collection de souches de *Lactobacillus* utilisées comme probiotiques ou pour la fermentation de différents substrats.

Depuis plusieurs années, VF Bioscience et l'UMRt 1158 BioEcoAgro collaborent autour de projets axés sur les probiotiques. En 2021, la Chaire industrielle Charles Viollette a été créée, avec pour objectif la valorisation de co-produits d'origine végétale. Ce consortium réunit des entreprises comme Eurabiotech, Premier Tech, Gecco, Leroux, l'Association des Producteurs d'Endives de France (APEF), VF Bioscience, ainsi que l'Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (INAF) au Québec et l'UMRt 1158 BioEcoAgro.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la chaire Charles Viollette et a pour principal objectif le développement d'un ingrédient santé issu de la fermentation de co-produits de chicorée et d'endive.

Introduction bibliographique

1. *Cichorium intybus*

1.1. La chicorée : *Cichorium intybus* variété *sativum*

1.1.1. Généralités sur les *Asteraceae*

La chicorée dite industrielle ou *Cichorium intybus* variété *sativum* appartient à la famille des *Asteraceae*. Elle est la deuxième plus grande famille derrière celle des *Orchidaceae*, et comporte 25 000 espèces réparties en 1 600 genres. Les *Asteraceae* sont des plantes herbacées utilisées dans divers domaines comme l'ornementation, la médecine ou encore l'agro-alimentaire. Parmi ces espèces, il y a les tournesols, les laitues, les coréopsis, les dahlias ou encore les marguerites (Nikolić and Stevović, 2015). Cette famille est présente dans le monde entier, exceptée dans les régions avec des climats glacials ou tropicaux, et se caractérise par une diversité morphologique très importante. Elle présente une grande diversité en termes de taille de la plante, de particularité des feuilles et des fleurs ou encore de pérennité (Šesták, 2002). Les espèces de cette famille sont nutritivement faibles en calories et en protéines, et sont sources de vitamines et de minéraux comme le sodium, le calcium, le potassium ou encore le magnésium (García-Herrera et al., 2020). Les *Asteraceae* sont reconnues pour leurs propriétés biologiques, ce qui a conduit à leur utilisation dans diverses applications thérapeutiques. Certaines espèces sont même cultivées depuis plus de 3 000 ans dans le cadre de la médecine traditionnelle. Les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, prébiotiques et hépato-protectrices sont les plus couramment observées. Les molécules responsables de ces effets sont généralement des métabolites secondaires, notamment les polyphénols tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes, ainsi que les triterpènes (Rolnik and Olas, 2021).

1.1.2. Production de la chicorée industrielle

La chicorée (var. *sativum*) est aujourd'hui majoritairement produite pour sa racine, qui une fois transformée, est consommée en tant que boisson, ou ajoutée au café. Elle est cultivée dans de nombreuses régions du monde notamment en Asie, en Amérique du

Nord et en Afrique, mais c'est surtout en France, premier pays producteur avec environ 90 000 tonnes par an, que sa production est la plus importante (La Chicorée, 2024). La société Leroux, basée à Orchies (département du Nord), collabore avec 200 planteurs pour fournir 95 % de la production des Hauts-de-France (Agroalimentaire, La Chicorée Leroux, 2024 ; Fabrication de la chicorée).

La chicorée dite industrielle, est semée au printemps puis récoltée à l'automne (**Figure 1**). Les chicorées sont effeuillées et les racines sont ensuite lavées, découpées en lamelles (appelées cossettes) et déshydratées pour atteindre un taux d'humidité de 10 % permettant une bonne conservation. Les cossettes sont ensuite torréfiées puis concassées afin d'extraire le maximum de saveur lors de l'infusion. La chicorée liquide est filtrée, centrifugée puis évaporée afin de la concentrer. Selon le type de produit, la chicorée peut être séchée par atomisation (Fabrication de la chicorée).

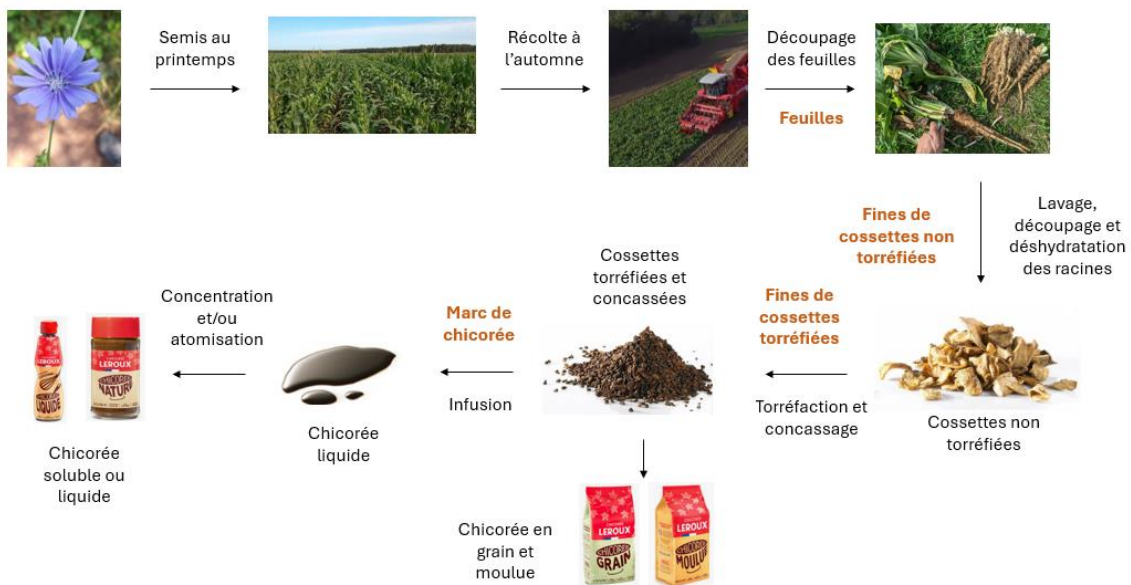


Figure 1 : Schéma présentant la production de la chicorée industrielle (Réussir la culture de l'endive ; Fabrication de la chicorée).

En noir : les différentes étapes de production et les produits, en orange : les co-produits générés lors de cette production. La chicorée est semée au printemps et récoltée en automne où elle est effeuillée avant d'être lavée et découpée en cossettes. Les cossettes sont ensuite déshydratées, torréfiées et concassées. Une partie de ces cossettes est commercialisée en l'état tandis que l'autre partie est infusée afin d'obtenir de la chicorée liquide qui sera concentrée et/ou atomisée avant d'être commercialisée.

Au cours du processus de production de la chicorée industrielle, différents co-produits sont générés. Parmi ces derniers, il y a les feuilles de chicorée, les fines de cossettes non torréfiées, les fines de cossettes torréfiées ainsi que le marc de chicorée.

1.2. L'endive : *Cichorium intybus* variété *foliosum*

1.2.1. Généralités sur l'endive

L'endive (*Cichorium intybus* variété *foliosum*) est la petite sœur de la chicorée, elle fut découverte en 1850 par le plus grand des hasards. En effet, un jardinier belge, M. Bréziers, aurait caché des pieds de chicorée sauvage dans une cave afin de payer moins d'impôts. Celui-ci aurait découvert quelques semaines plus tard des plantes blanches en fuseaux se développant sur les pieds de chicorée, c'est ainsi que serait née l'endive (Le chicon, l'endive du Nord). Cette endive belge, également appelée chicon en Belgique ou dans le nord de la France, souvent consommée en salade ou en gratin, appartient comme la chicorée à la famille des *Asteraceae*. La phylogénie des chicorées est présentée en **Figure 2**.

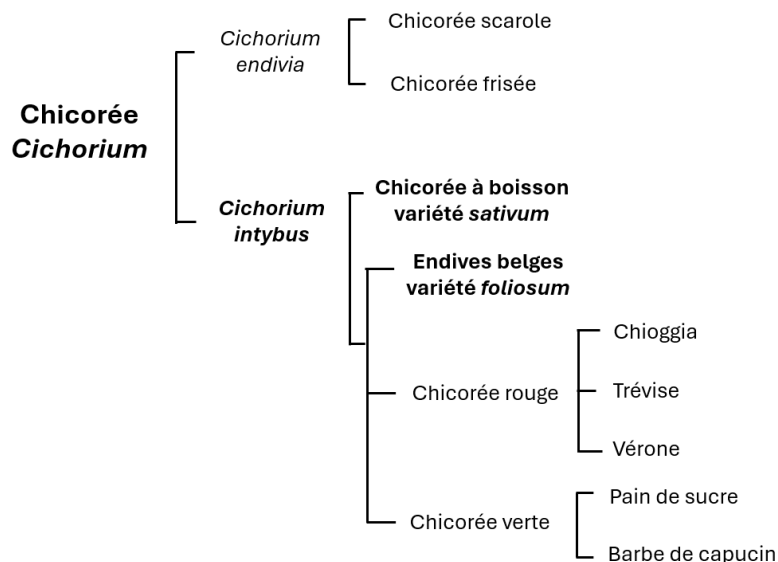


Figure 2 : Arbre phylogénétique des chicorées (Chicorée et endive).

L'endive est essentiellement cultivée en Europe notamment en Italie, en Grèce, au Luxembourg ou encore en Belgique, mais surtout en France, qui reste le premier pays

producteur mondial avec 124 400 tonnes d'endives produites lors de la saison 2022-2023. Cependant, cette production subit une diminution d'environ 18 % depuis 2018 (Endive. Agreste, la statistique agricole, 2024). En effet, l'endive est un légume caractérisé par une texture croquante mais également une amertume prononcée qui peut déplaire aux nouveaux consommateurs.

1.2.2. Production de l'endive

La région Hauts-de-France produit 95 % des endives cultivées en France, la seconde région productrice étant la Bretagne. L' Association de Producteurs d'Endives de France (APEF) fournit 78 % de la production française, avec plusieurs variétés : l'endive blanche qui est la plus connue, mais également la Carmine[®], qui est un croisement entre l'endive blanche et l'endive rouge, ainsi que la Barbucine[®] qui est une endive frisée (**Figure 3**) (APEF – endive.fr).



Figure 3 : Différentes variétés d'endives produites par l'APEF.

La culture de l'endive se déroule en deux étapes, la première concerne l'obtention de racines cultivées en champs et la seconde le forçage, qui permet d'obtenir la tête de l'endive qui sera ensuite consommée. L'endive est semée chaque année au printemps à partir des graines provenant de sa fleur bleue dans un sol riche et drainé (**Figure 4**).

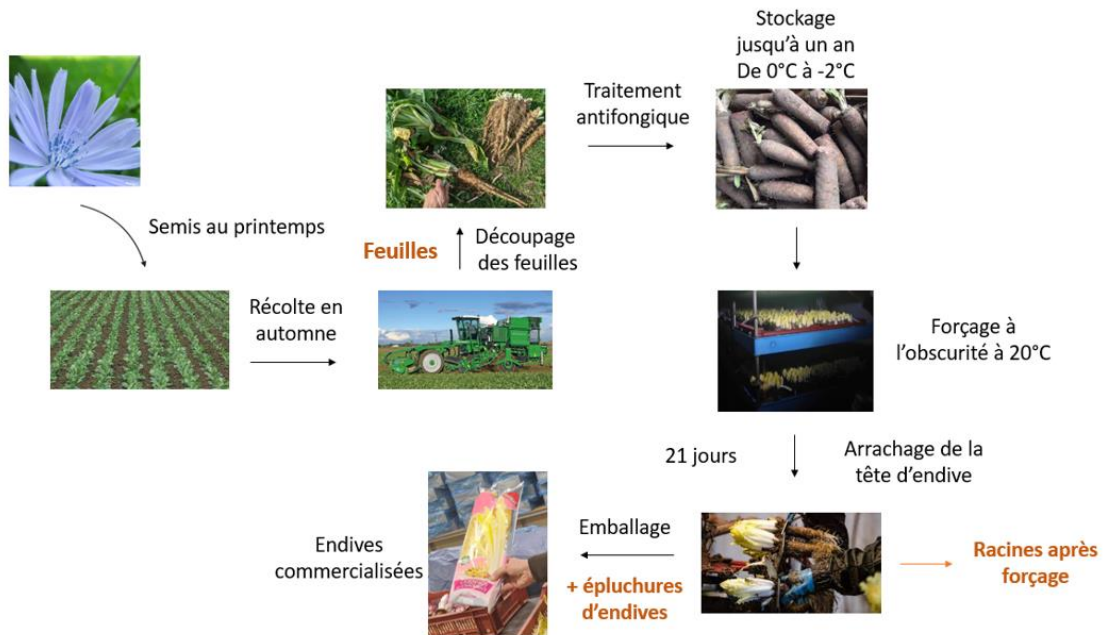


Figure 4 : Représentation schématique des différentes étapes de la production de l'endive (*Cichorium intybus var. foliosum*).

L'endive est semée au printemps puis récoltée en automne. Elle est ensuite effeuillée, et traitée afin d'éviter un développement fongique. Les racines pivotantes sont ensuite forcées durant 21 jours à l'obscurité afin d'obtenir les têtes d'endives commercialisées après élimination des feuilles externes. En noir : les différentes étapes de production, en orange : les co-produits générés lors de cette production.

Les racines pivotantes sont récoltées à l'automne. Elles sont effeuillées et seules les racines dont le calibre est conforme sont sélectionnées. Avant leur stockage, elles subissent un traitement antifongique car elles sont très sensibles à certains champignons comme *Phytophthora sp.* et *Sclerotinia sp.* Elles sont ensuite stockées en chambre froide entre -2 °C et 0 °C avec une humidité relative comprise entre 95 et 98 % pendant une période qui peut atteindre un an. Les racines sont ensuite forcées dans des chambres à l'abri de la lumière à une température de 20 °C pendant 21 jours. Durant le forçage, les racines sont alimentées par une solution nutritive hydroponique permettant d'apporter les nutriments nécessaires à la croissance des têtes d'endives hors de la terre. À la suite de ces trois semaines, les têtes d'endives sont séparées des racines qui contiennent encore 50 % des nutriments présents avant forçage. Ces dernières constituent l'un des co-produits majeurs de la production d'endives belges qui représente environ 400 000 tonnes par an. En plus des racines après forçage, les feuilles en champs, les racines n'ayant pas le bon calibre, et les épluchures d'endives retirées avant emballage, constituent l'ensemble des co-produits générés au cours de la

production de l'endive. Ces derniers sont utilisés en alimentation animale, en production de biogaz ou encore en compost (Van Arkel et al., 2022).

1.3. Composition moléculaire de la chicorée et de l'endive

Il est assez complexe de déterminer la composition exacte de la chicorée et de l'endive. En effet, les différentes teneurs en macroéléments et en microéléments varient non seulement en fonction de la variété, mais également en fonction des conditions de culture, du processus de production ou encore des conditions météorologiques. De plus, certaines études portant sur *Cichorium intybus L.* ne donnent pas de spécification sur la variété étudiée, *sativum* ou *foliosum*.

L'endive et la chicorée ont une composition moléculaire relativement proche. Elles sont toutes deux très riches en eau, avec environ 94 g pour 100 g de matière fraîche. Cependant, les quantités des différents composés varient entre les racines et les feuilles, ces dernières étant plus riches en eau (**Table 1**).

Table 1 : Composition en macronutriments de la chicorée pour 100 g de matière sèche selon Nwafor et al., (2017); Perović et al., (2021); Pouille et al., (2022).

Composé	Quantité en g/100 g de matière sèche	
	Racine	Feuille
Eau	96*	93-95*
Cendres	3,8-9	10,9-18,7
Protéines	1,4-6,8	10,2-14,7
<i>Protéines solubles</i>	5,6	14,1
<i>Acides aminés libres</i>	1,2	8,5
Lipides	0,1-3,1	1,9-2,5
Glucides	70,4-91,5	38,2-72,1
<i>Glucides solubles</i>	11,1-12,3	7,8
<i>Inuline</i>	44,7-91,5	ND
Fibres alimentaires	31,2-49	16,8-22,4
<i>Fibres solubles</i>	0,4-66,9	ND
<i>Fibres insolubles</i>	22,9-30,7	11

* : valeur pour 100 g de matière fraîche

L'apport énergétique de la chicorée comme de l'endive est très faible, entre 17 et 23 kcal pour 100 g de matière fraîche. Ceci est dû à leurs faibles teneurs en protéines et en lipides, ainsi qu'à leur forte teneur en eau. En revanche, elles présentent des teneurs importantes en minéraux, en vitamines et en fibres alimentaires. Concernant les protéines, la quantité pour 100 g de matière sèche est comprise entre 1,4 et 14,7 g. Les lipides sont les macronutriments les moins présents au sein de la chicorée avec des teneurs allant de 0,1 à 3 g/100 g. La chicorée est considérée comme un aliment riche en fibres alimentaires avec des teneurs allant de 16,8 à 49 g/100 g. Parmi ces fibres alimentaires, la principale est l'inuline, un glucide complexe dont la teneur est beaucoup plus importante dans les racines que dans les feuilles. Les glucides représentent 38,2 à 90,8 g/100 g et sont les macronutriments les plus abondants (Nwafor et al., 2017; Saeed et al., 2017; Perović et al., 2021; Pouille et al., 2022).

1.3.1. L'inuline

La molécule de réserve des *Asteraceae* est l'inuline (**Figure 5**), un polymère de fructose, principalement linéaire, comprenant entre 2 et 60 monomères liés par des liaisons O-glycosydique de type $\beta(2-1)$ et se terminant par une molécule de glucose.

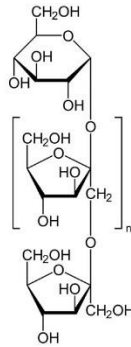


Figure 5 : Structure moléculaire de l'inuline.

La chicorée est très riche en inuline, et plus particulièrement au niveau des racines (Van Arkel et al., 2022), qui en contiennent entre 60 et 91,5 g/100 g de matière sèche. L'inuline est ainsi extraite des racines de chicorée pour être utilisée par l'industrie agroalimentaire en tant que fibre alimentaire.

L'endive en contient moins que la chicorée industrielle, et l'inuline qu'elle produit présente un degré de polymérisation plus faible. C'est pourquoi, l'endive n'est pas utilisée pour l'extraction de l'inuline. La quantité d'inuline dans la racine fluctue au cours du temps. Les racines pivotantes en champs, qui sont des organes de stockage, contiennent 63,4 g/100 g de glucides dont 52,5 g/100 g d'inuline. Pendant le stockage, la quantité d'inuline dans les racines diminue à 33 g/100 g pour former du saccharose, du fructose et du glucose, maintenant une quantité de glucides totaux stable. Plus la température de stockage est importante, plus la dégradation de l'inuline l'est aussi (Van Arkel et al., 2022). Cette caractéristique a permis de développer un test pour déterminer le niveau de maturité des racines pivotantes. Si le jus issu des racines forme un gel après 24 h à température ambiante, alors elles ne sont pas encore mures. Ce gel résulte du taux important d'inuline (Wan et al., 2020; APEF – endive.fr).

Durant le forçage, la teneur en inuline dans les racines diminue encore. En revanche, la quantité totale de glucides provenant de la lyse de l'inuline augmente pour atteindre entre 35,41 et 50,9 g/100 g de matière sèche (Van Arkel et al., 2022), ce qui signifie que plus de 70 % des glucides totaux se trouvent encore dans la racine après forçage. Par rapport aux racines, les têtes d'endives ont des teneurs en inuline faibles, mais sont plus riches en glucides libres avec des valeurs comprises entre 33,6 et 38,8 g/100 g de matière sèche. En effet, au fur et à mesure de la croissance de la tête d'endive, l'inuline de la racine est hydrolysée en fructose libre afin de servir de source de carbone pour la croissance des têtes d'endives.

En plus d'être utilisée comme fibre alimentaire, l'inuline possède de nombreux effets, notamment celui de prébiotique. Les prébiotiques sont des composants alimentaires non digestibles ayant des effets bénéfiques pour la santé en stimulant l'activité et la croissance de nombreuses bactéries comme les Bifidobactéries et les *Lactobacilles*. C'est l'une des raisons pour lesquelles les co-produits de la filière endive sont en partie revalorisés en alimentation animale. L'inuline se place même en tête de liste des prébiotiques les plus utilisés, en raison de sa grande disponibilité dans de nombreuses plantes (Samanta et al., 2013; Uerlings et al., 2020). Son effet prébiotique permet la régulation du taux de lipides dans le sang, l'amélioration de l'absorption intestinale de minéraux tel que le calcium ou le magnésium. L'inuline exerce également un effet bifidogène, favorisant le développement des bifidobactéries au détriment de certains pathogènes (Shoaib et al., 2016). Il a été rapporté qu'un faible degré de polymérisation de l'inuline et des conditions de stockage à basse température durant 4 mois engendraient un meilleur effet prébiotique. Afin de mesurer cet effet prébiotique, certains chercheurs ont utilisé des *Lactobacilles*, et plus précisément des *Lacticaseibacillus paracasei* capables de dégrader l'inuline comme source de carbone pour leur croissance. L'inuline pourrait également jouer un rôle dans la prévention du cancer colorectal en inhibant la formation de foyers de cryptes aberrantes, un marqueur précancéreux. De plus, la production de butyrate issue de la fermentation de l'inuline pourrait réduire, voire inhiber, la croissance tumorale (Wan et al., 2020).

L'inuline possède également des activités antidiabétiques et hypocholestérolémiantes. En effet, une étude menée chez le rat a montré que l'administration de chicorée, à court

et à long terme, pouvait ralentir la progression du diabète de type 2 (Ghamarian et al., 2012). Un extrait éthanolique de chicorée administré durant 14 jours à des rats a permis une diminution de 20 % du glucose plasmatique, de 91 % de triglycérides et de 16 % du cholestérol total. Ces effets seraient potentiellement dus à la présence d'inuline (Perović et al., 2021). Outre son effet prébiotique, l'inuline possède une activité hépatoprotectrice. En effet, une étude réalisée sur 24 porcelets mâles castrés a montré que l'inuline régulait l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et augmentait l'expression des protéines impliquées dans la protection des hépatocytes contre le stress oxydatif (Lepczyński et al., 2017; Ignat et al., 2021).

La chicorée n'est donc pas seulement utilisée en tant que boisson mais également afin d'en extraire l'inuline qui possède également de nombreuses propriétés technofonctionnelles. L'inuline est hydrosoluble, stabilise les émulsions, améliore la texture ainsi que la viscosité. Elle est thermiquement stable, ce qui signifie qu'elle résiste à des températures élevées, même proches de 100 °C. De plus, son caractère hygroscopique permet d'améliorer la durée de conservation des aliments. L'inuline a un faible indice glycémique lorsque la chaîne de fructose est relativement petite. Elle possède un pouvoir sucrant équivalent à 30-50 % de celui du saccharose, et peut être utilisée pour substituer le sucre dans certains cas. Elle peut aussi être utilisée dans le domaine pharmaceutique pour ces capacités à stabiliser certains médicaments, notamment ceux à base de protéines (Kaur and Gupta, 2002; Wan et al., 2020; Pouille, 2022; Van Arkel et al., 2022).

1.3.2. Les lactones sesquiterpènes

La chicorée est riche en métabolites secondaires, notamment en terpènes, et plus particulièrement en lactones sesquiterpènes (LST), ce qui lui permet d'interagir avec son environnement en exerçant un rôle de défense (Perović et al., 2021). Les LST sont des composés organiques solubles, constitués d'une chaîne de 15 carbones, qui possède un cycle lactone contenant un groupe exométhylène conjugué (α -méthylène- γ -lactone). Les LST sont les deuxièmes métabolites spécialisés les plus retrouvés chez les *Asteraceae*, et sont responsables en grande partie de l'amertume de la chicorée. Ces derniers sont stockés dans des compartiments spécialisés, appelés lactifères, dans les feuilles

comme dans les racines, (Twarogowska et al., 2020; Perović et al., 2021; Van Arkel et al., 2022).

Les principaux LST présents dans la chicorée sont de type guaianolide. Parmi ces derniers, il y a la lactucine, la dihydrolactucine, la lactucine-15-oxalate, la 8-déoxylactucine-15-oxalate, la lactucopicine, et la lactucopicine-15-oxalate, principalement présents sous leur forme oxalée (**Figure 6**). Les quantités des LST diffèrent entre la chicorée industrielle et l'endive. Les racines de chicorée industrielle en contiennent 0,8 g/100 g de matière sèche (Perović et al., 2021; Pouille, 2022).

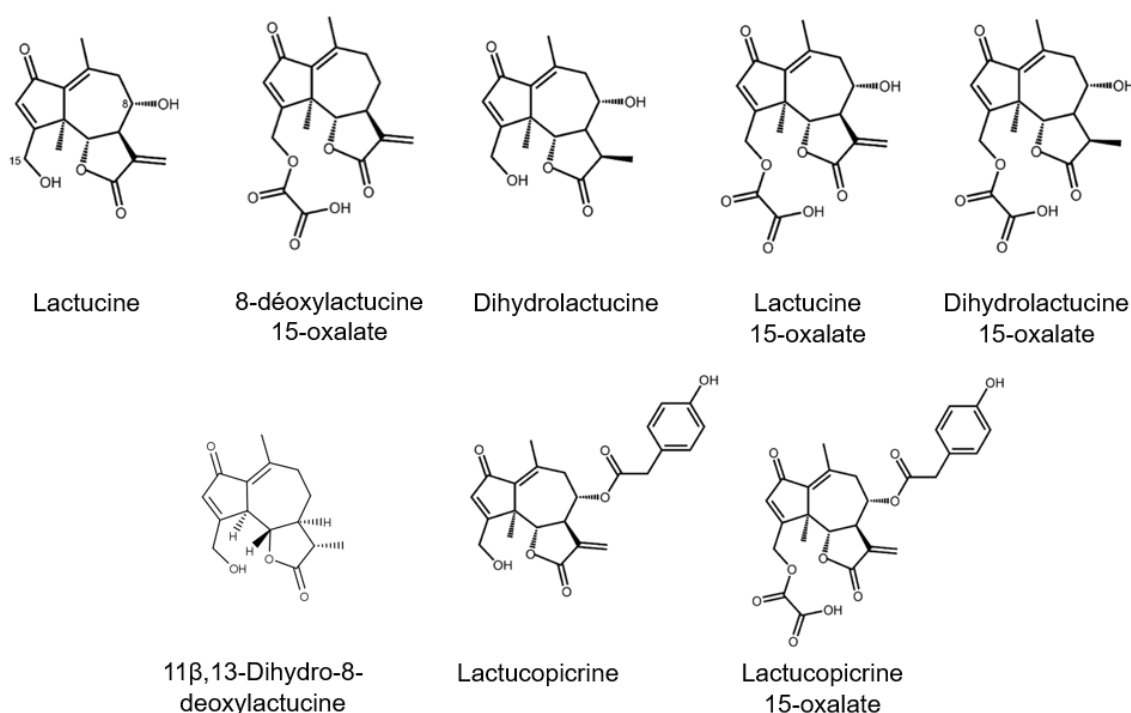


Figure 6 : Les 8 principales lactones sesquiterpènes de la chicorée d'après Van Arkel et al., (2022).

Concernant l'endive qui est moins riche en LST, sa composition varie au cours des différentes étapes du processus de production. Pour la lactucine, la lactucopicine, la dihydrolactucine et la lactucopicine-15-oxalate, leur teneur diminue durant le stockage et augmente durant le forçage : plus la durée de stockage est longue, plus la quantité après forçage est importante. Les teneurs de lactucine-15-oxalate et de 8-déoxylactucine-15-oxalate stagnent ou augmentent très légèrement durant le stockage, puis augmentent légèrement lors du forçage, tout comme les autres LST. Il a été rapporté que la quantité de dihydrolactucine-15-oxalate augmentait durant le

stockage par rapport à celle présente dans les racines en champs. Globalement, la quantité de LST est significativement plus importante dans les racines après forçage que dans les têtes d'endives (Van Arkel et al., 2022).

Généralement, une faible teneur en LST dans les têtes d'endives est bénéfique à l'appréciation du consommateur. En effet, les LST sont responsables de l'amertume de l'endive, particulièrement la 8-déoxylactucine glycoside. Il est possible de mesurer l'amertume. Plus son seuil de détection papillaire ($\mu\text{g/g}$) est faible, plus le pouvoir amer du composé est élevé. Pour la lactucopicrine et la dihydrolactucopicrine, les seuils sont respectivement de 0,5 et 0,2 $\mu\text{g/g}$. Ils sont plus importants pour la lactucine et la dihydrolactucine avec respectivement 1,4 et 1,7 $\mu\text{g/g}$. Certains procédés peuvent réduire l'amertume de l'endive, comme la cuisson à plus de 40 °C pendant plus de 2 minutes, qui permet l'extraction des LST (Twarogowska et al., 2020).

Tout comme les autres composés présents dans l'endive, les profils de LST varient en fonction de la variété, de la matrice, des conditions de croissance, des conditions météorologiques, et des conditions et de la température de stockage. Plus cette dernière est faible, plus la quantité de LST est importante (Twarogowska et al., 2020; Van Arkel et al., 2022).

Les LST ont également été caractérisés pour leur activité anti-tumorale, car ces molécules, possédant un cycle, facilitent l'alkylation des thiols en sensibilisant les cellules cancéreuses aux traitements chimiques (Van Arkel et al., 2022). D'autres études ont montré que les LST exerçaient une activité anti-inflammatoire. En effet, lorsqu'ils sont mis au contact de macrophages en présence de lipopolysaccharides (LPS), ils réduisent la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Les LST ont également montré une activité pro-apoptotique sur des cellules hépatiques HepG2 en induisant une augmentation dose-dépendante du pourcentage de cellules apoptotiques (Pouille et al., 2022).

Les LST sont produits par les plantes dans un but de défense, c'est donc pour ces raisons que la chicorée possède des activités antifongiques ou encore antiparasitaires. Une étude a montré que les LST de la chicorée et plus particulièrement la 8-déoxylactucine et la 11 β ,13-dihydrolactucine étaient responsables de l'activité antifongique contre *Pythium ultimum* ou *Trichophyton tonsurans var. sulfureum* (Mares et al., 2005).

D'autres études ont montré que des extraits de LST de feuilles de chicorée inhibaient l'éclosion des œufs du parasite *Ostertagia ostertagi*. Parmi ces LST, la lactucine, la 11,13-dihydrolactucine, la 8-déoxylactucine, la 11,13-dihydro-8-déoxylactucine, la lactucopicrine et la 11,13-dihydrolactucopicrine pouvaient être responsables de cette activité antiparasitaire (Peña-Espinoza et al., 2015, 2017; Woolsey et al., 2019).

Les LST auraient également des activités anti-malaria. En effet, dans les années 70, les racines de chicorée étaient utilisées en Afghanistan comme remède pour lutter contre cette maladie parasitaire. Une étude a montré que les LST et plus particulièrement la lactucine et la lactucopicrine de la chicorée étaient responsables de cette activité (Bischoff et al., 2004).

1.3.3. Les acides hydroxycinnamiques

Les principaux métabolites spécialisés produits par la chicorée sont les polyphénols. Leur structure est caractérisée par un ou plusieurs cycles benzéniques contenant au moins 2 groupes hydroxyles. Ces fonctions hydroxyles sont chimiquement très réactives, ce qui leur confèrent certaines activités mais réduisent leur stabilité. En effet, certaines réactions chimiques comme l'auto-oxydation, l'épimérisation, l'estérification ou encore l'alkylation peuvent les modifier. Différents facteurs physiques peuvent accentuer ces réactions, comme la température : plus elle est basse, plus la stabilité de ces composés est grande. Après différents traitements, tels que 30 minutes à 70 °C ou 7 minutes à 98 °C, environ 20 % des polyphénols sont dégradés. Les températures de stockage peuvent donc affecter leur stabilité. Ainsi, plus le stockage est long, plus la température doit être faible. Un stockage à 4 °C est une température suffisamment faible pour ne pas impacter la structure des polyphénols. Cependant, pour des longues périodes de stockage, il est nécessaire de congeler les matrices contenant les polyphénols. Ces derniers sont également très sensibles à la lumière. Il est donc nécessaire de les protéger lors de leur stockage. En plus des paramètres physiques, des paramètres chimiques comme le pH peuvent réduire leur stabilité. Lorsqu'il est alcalin, les polyphénols sont instables. Un pH adapté aux polyphénols est un pH inférieur à 6. D'autres facteurs comme la présence d'oxygène peuvent également contribuer à leur dégradation. En effet, en raison de leur forte activité antioxydante, les polyphénols peuvent s'auto-oxyder (Deng et al., 2018).

Les polyphénols sont classés selon plusieurs familles : les flavonoïdes, les tannins, les stilbènes, les coumarines, les lignanes, les xanthanes, les amides polypénoliques et les acides phénoliques. Cette dernière famille est composée d'acides benzoïques et d'acides hydroxycinnamiques. Ces derniers sont présents dans la chicorée, comme l'acide chicorique, les acides chlorogénique et isochlorogénique, l'acide caféique ou encore l'acide caftarique. Les acides hydroxycinnamiques sont composés d'un cycle benzénique et d'une chaîne comportant entre 3 et 6 atomes de carbone. Les acides hydroxycinnamiques proviennent de la voie de synthèse de l'acide shikimique. Ces acides sont majoritairement synthétisés à partir de deux acides aminés, la phénylalanine et la tyrosine, ainsi que par l'action de différentes enzymes d'hydroxylation, de méthylation et d'estérification (**Figure 7**) (Tsao, 2010; Taofiq et al., 2017; Meyer, 2018; Pouille, 2022).

chlorogénique, isochlorogénique A et caftarique. La différence est déjà présente entre les feuilles et les racines en champs. Pour les quatre composés, les feuilles sont plus riches avec 378,5 µg/g d'acide caftarique, 666,4 µg/g d'acide chlorogénique, 1085,7 µg/g d'acide chicorique et 114,4 µg/g d'acide isochlorogénique A, comparé respectivement à 2,6 µg/g, 469,4 µg/g, 31,9 µg/g et 97,9 µg/g pour les racines. Durant le stockage et le forçage, les quantités des composés comme les acides caftarique, chicorique, chlorogénique et isochlorogénique A varient (Nwafor et al., 2017; Twarogowska et al., 2020). Ces teneurs peuvent varier en fonction de la sous espèce, des conditions de production et météorologiques, mais également en fonction des solvants d'extraction (Willeman et al., 2014).

Tout comme les LST, les polyphénols sont des composés ayant de nombreuses activités biologiques. En effet, les plantes produisent des polyphénols afin de s'adapter à leur environnement, notamment afin de lutter contre les stress biotique et abiotique : les ultraviolet (UV), les autres plantes, les insectes ou encore les bactéries et les virus. De plus, les polyphénols sont aussi responsables de la couleur, de l'odeur ou encore de la saveur des plantes et des fleurs (Rasouli et al., 2017; Taofiq et al., 2017; Van Arkel et al., 2022). La principale activité biologique des polyphénols est l'activité antioxydante, mais les acides hydroxycinnamiques sont également connus pour leurs propriétés antidiabétiques. Une étude a évalué le potentiel anti-hyperglycémique de 3 acides hydroxycinnamiques présents dans les racines de chicorée, les acides chicorique, caféique et férulique. *In vitro*, l'acide caféique et l'acide férulique ont réduit la glycogénolyse induite par le glucagon dans les cellules hépatiques. Ces travaux ont également montré chez le rat que l'acide férulique induisait une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques, tout en inhibant la captation du glucose par les cellules musculaires. Ces 3 acides hydroxycinnamiques seraient donc capables de diminuer la glycémie sans détériorer les cellules hépatiques (Azay-Milhau et al., 2013; Jackson et al., 2017). L'acide chlorogénique, quant à lui, pourrait améliorer la régulation de la glycémie postprandiale chez les personnes âgées ou atteintes de diabète de type 2. Cet effet antidiabétique, tout comme celui de l'acide caftarique et de l'acide chicorique, pourrait être en partie dû à l'inhibition de l' α -glucosidase et de la lipase

pancréatique, comme cela a été observé chez des patients consommant une infusion contenant de la chicorée (Verhulst et al., 2023).

En plus de ces activités, les acides hydroxycinnamiques de la chicorée ont un pouvoir antibactérien. Une étude portant sur la conservation de produits cosmétiques a montré que l'acide p-coumarique était capable d'inhiber certains pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans*. L'acide chlorogénique a montré des activités antibactériennes sur de nombreuses souches. Pour les Lactobacilles, la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'acide chlorogénique est comprise entre 125 et 1000 µg/mL. De plus, des études ont montré que leur activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif était renforcée lorsqu'ils étaient combinés aux antibiotiques ou aux acides hydroxycinnamiques. Ces acides exercent une activité antibactérienne similaire à celle de acides benzoïques, probablement en raison du même nombre de groupe hydroxyle qu'ils possèdent (Taofiq et al., 2017; Godlewska-Żytkiewicz et al., 2020).

2. Propriétés bioactives de la chicorée et de l'endive

2.1. Activité antioxydante

2.1.1. Le stress oxydatif

L'oxydation est le transfert d'un électron d'un atome à un atome d'oxygène, qui agit comme accepteur final de cet électron. Au niveau cellulaire, l'oxydation est une réaction essentielle, impliquée dans de nombreux mécanismes de défense et de signalisation. Cependant, elle peut évoluer en stress oxydatif lorsque la production de radicaux libres ou d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) devient excessive (**Figure 8**). Ces ERO sont des composés chimiques caractérisés par la présence d'électrons non appariés sur leur couche externe, ce qui les rend instables et leur confère une demi-vie relativement courte. Ces ERO sont décrits dans la **Table 2** (Gülçin, 2012; Dussert, 2020; Sies and Jones, 2020).

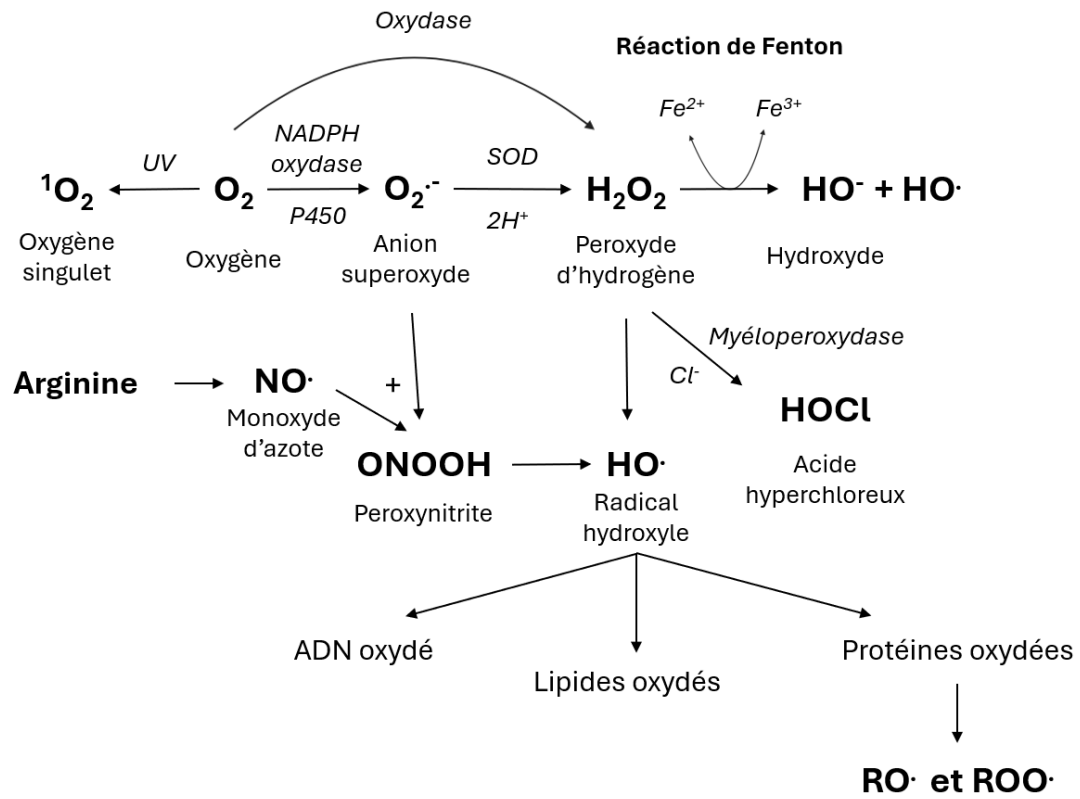


Figure 8 : Voie de synthèse des ERO au sein des cellules, d'après (Dussert, 2020)

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite, SOD : superoxyde dismutase.

Table 2 : Espèces réactives de l'oxygène - production et rôle (Gülçin, 2020; Sies and Jones, 2020).

Nom	Abréviation	Production	Rôle
Radical hydroxyle	HO·	Espèce la plus réactive, produit à partir d'H ₂ O ₂ et de ONOOH, sous-produit de l'action immunitaire lors de la réaction de Fenton	Initie la peroxydation des lipides, induit des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides, impliqué dans des troubles neurologiques
Anion superoxyde	O ₂ ⁻	Produit à partir d'O ₂ par P450 et la NADPH oxydase	Permet la formation de H ₂ O ₂ et O ₂ par la superoxyde dismutase, impliqué dans la signalisation cellulaire, initie des réactions de défense
Hydroperoxydes d'hydrogène	RO· et ROO·	Généré lors de la peroxydation des lipides	Signalisation cellulaire
Hydroperoxydes organiques	ROOH	Généré lors de la peroxydation des lipides	Signalisation cellulaire, affecte les lipoprotéines
Monoxyde d'azote	NO·	Produit à partir d'arginine	Messenger cellulaire, diminue la pression artérielle, produit ONOO avec O ₂ ⁻
Peroxynitrite	ONOO·	Produit à partir de NO· et O ₂ ⁻	Induit la peroxydation des lipides, signalisation cellulaire
Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂	Produit par la SOD à partir de l'anion superoxyde	Signalisation redox, génère des radicaux hydroxyles en présence d'ions métalliques
Oxygène singulet	¹ O ₂	Produit dans les tissus exposés à la lumière	Dommages cutanés
Acide hyperchloreux	HOCl	Produit dans les vacuoles phagocytaires à partir d'H ₂ O ₂	

ADN : acide désoxyribonucléique.

Ces espèces sont continuellement produites par l'organisme. Les trois organites responsables de la production d'ERO forment le triangle redox composé de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique et des peroxysomes (Sies et al., 2022).

La mitochondrie est l'organite responsable de la plus importante production d'ERO, se situant au niveau de la chaîne respiratoire, dans la membrane interne (**Figure 9**).

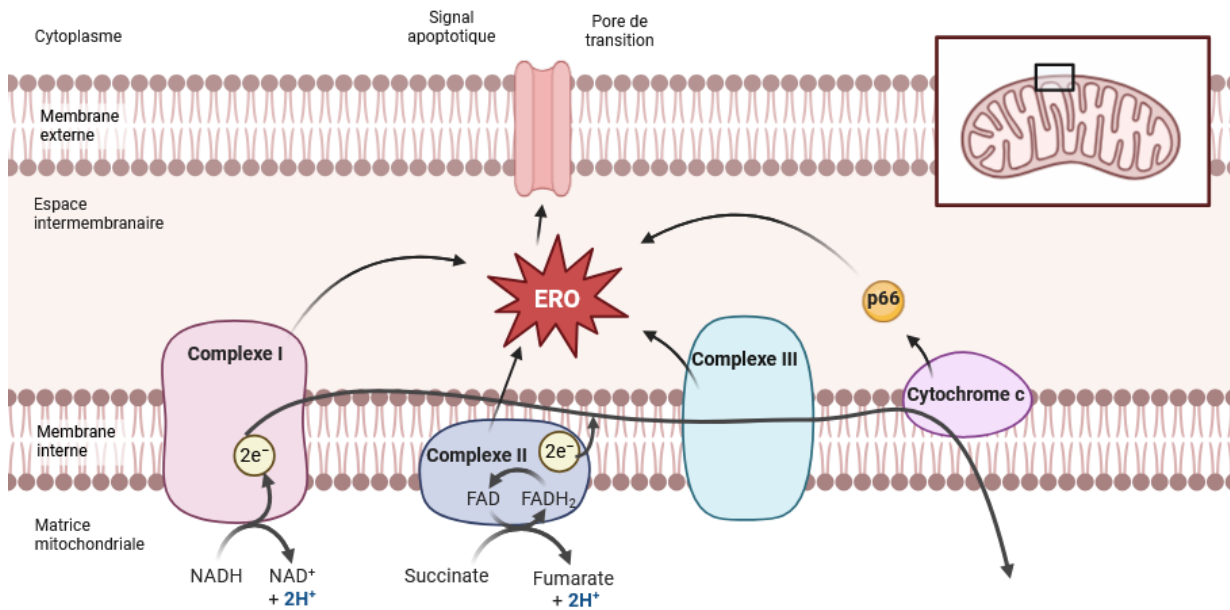


Figure 9 : Production d'ERO dans la membrane interne de la mitochondrie.

Trois complexes au sein de la mitochondrie sont responsables de la production d'ERO. Le premier correspond à la NADPH-ubiquinone oxydoréductase, le deuxième à la succinate déshydrogénase et le troisième à l'ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase. Si les ERO produits sont trop importants, alors la cellule met en place des canaux anioniques ou des pores de transition afin de les sécréter. Si la sécrétion ne suffit pas, alors un signal apoptotique est émis.

Au sein de la mitochondrie, trois complexes produisent des ERO, le premier est la NADH-ubiquinone oxydoréductase, la principale source d'ERO. Le deuxième, est la succinate déshydrogénase qui transforme le succinate en fumarate par oxydation. Le troisième complexe correspond à l'ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase. L'enzyme p66^{SHC} induit un signal d'apoptose en générant des ERO par l'oxydation du cytochrome c. Cette oxydation provoque la formation de H₂O₂ à partir de O₂⁻ (Giorgio et al., 2005; Yang and Lian, 2020). Dans le réticulum endoplasmique, les enzymes productrices d'ERO sont le cytochrome p-450, qui produit H₂O₂ et O₂⁻, à partir de stéroïdes, ou encore les cyclooxygénases qui oxydent l'acide arachidonique en prostaglandines et thromboxanes. Pour finir, les lipoxygénases situées dans les peroxysomes, catalysent la peroxydation des acides gras. Les cyclooxygénases et les lipoxygénases sont des intermédiaires d'activation et de contrôle de la réponse inflammatoire (Dussert, 2020; Sies and Jones,

2020). La production d'ERO peut également être due à des sources exogènes comme les UVs, les rayons X, les ultrasons, les micro-ondes, la chaleur ou encore les agents chimiques. C'est le plus souvent ces sources de production non contrôlées par l'organisme qui peuvent lui être néfastes (Sies, 1997; Dussert, 2020).

Les EROs sont souvent considérées comme délétères pour l'organisme. Cependant, elles sont essentielles et agissent comme des molécules de signalisation dans de nombreuses voies (Yang and Lian, 2020). Seule leur surproduction est néfaste pour les cellules en provoquant un stress oxydatif. Ce dernier correspond à une production d'ERO supérieure au seuil physiologique et non compensée par leur antioxydant endogène. L'équilibre redox est donc régulé par différentes enzymes afin d'éviter cette surproduction, comme les catalases, les peroxydases, la NADPH oxydase ou la superoxyde dismutase. D'autres systèmes peuvent également être mis en place par les cellules, notamment au niveau des mitochondries. Les ERO induisent la production de canaux anioniques au niveau de la membrane interne, ainsi que des pores de transition de perméabilité mitochondriale afin de sécréter ces ERO dans le cytosol. Si le taux de ERO dans la mitochondrie est trop important et que son mécanisme de sécrétion ne lui permet pas de revenir au seuil adéquat, la mitochondrie peut se dissocier et avoir un rôle délétère pour la cellule (Zorov et al., 2014). La mutation de certaines enzymes, comme la NADH-ubiquinone oxydoréductase ou la p66^{SHC}, peut également augmenter le taux d'ERO. Le stress oxydatif peut être à l'origine de nombreuses pathologies comme le diabète, les maladies cardiaques, inflammatoires et neurologiques, les accidents vasculaires cérébraux, l'infertilité, le syndrome d'immunodéficience ou encore le cancer. (Gülçin, 2020; Yang and Lian, 2020).

2.1.2. Les molécules antioxydantes

Le rôle des molécules antioxydantes est de palier aux différentes pathologies liées à la surproduction d'ERO. Les antioxydants sont définis comme « une substance qui, présente à de faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable, retarde ou inhibe de manière significative l'oxydation de ce substrat » (Sies, 1997). Ces antioxydants préviennent les réactions en chaîne et le développement de maladies chroniques. Certaines de ces molécules antioxydantes sont utilisées par l'industrie agroalimentaire

pour prolonger la durée de conservation des aliments tout en préservant leur propriétés organoleptiques, notamment en retardant la peroxydation des lipides (Gülçin, 2020).

Il existe des antioxydants synthétiques ou naturels. Les antioxydants synthétiques sont soumis à de nombreuses règles d'utilisation strictes, notamment à cause de leurs potentiels effets toxiques et cancérigènes. Les plus connus sont le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), le tert-butylhydroquinone (TBHQ) et le gallate de propyle (Gülçin, 2012). Il est donc préférable de privilégier les antioxydants naturels. Les fruits et les légumes sont des sources naturelles d'antioxydants, et principalement de polyphénols (Wolfe et al., 2008). Ces métabolites secondaires, décrits précédemment dans le manuscrit, sont largement répandus dans le règne végétal. Leur activité antioxydante dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyles. Ainsi, les acides hydroxycinnamiques ont une activité significativement plus élevée que les autres acides phénoliques, tels que les acides hydroxybenzoïques (Chen and Ho, 1997). Cette activité accrue est due aux conjugaisons au sein des doubles liaisons du(des) cycle(s) aromatique(s), qui permettent une meilleure stabilisation des radicaux libres. Parmi ces acides, les plus importants sont les acides caféique, férulique, chlorogénique et rosmarinique. D'autres molécules ont également une activité antioxydante significativement élevée comme les flavonoïdes, les flavonols, les caroténoïdes, les vitamines, les stilbènes, les coumarines, les lignans et les tanins (Shahidi, 1997; Gülçin, 2020).

Afin d'identifier et de comparer ces antioxydants, plusieurs tests ont été développés, basés sur différents mécanismes biochimiques, permettant de mettre en évidence les propriétés variées des antioxydants. Certains de ces tests reposent sur la capacité des antioxydants à transférer un atome d'hydrogène, comme les tests Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), Total Radical trapping Antioxidant Parameter (TRAP), Total radical Scavenging Capacity Assay (TOSCA), ainsi que sur l'inhibition de l'oxydation induite des lipoprotéines de faible densité, le test de blanchiment du β -carotène et le test basé sur la chimiluminescence. D'autres tests sont basés sur le transfert d'électrons, tels le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu, le Trolox Equivalence Antioxidant Capacity assay (TEAC), le Ferric ion Reducing Antioxidant Power assay (FRAP), le 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay (DPPH), le 2,2-Azinobis

3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid radical scavenging assay (ABTS^{•+}), le N,N-Diméthyl-p-phenylenediamine radical scavenging Assay (DHPD^{•+}) et le CUPric ions (Cu²⁺) Reducing Antioxidant Capacity assay (CUPRAC). (Amorati and Valgimigli, 2015; Gülçin, 2020; Munteanu and Apetrei, 2021).

2.2. Activité anti-inflammatoire

2.2.1. L'inflammation

L'inflammation est définie comme une réaction de défense de l'organisme face à une infection ou à une lésion des tissus. Elle peut se manifester par une rougeur, une chaleur et parfois un gonflement à l'endroit où elle se produit (Définition inflammation). Elle est souvent provoquée par des infections virales ou bactériennes, mais peut également résulter de caillots sanguins, de cancers, de blessures physiques, de maladies neurodégénératives, de l'exposition à des composés chimiques ou de troubles du système immunitaire (Roe, 2021). L'inflammation est régulée par le système immunitaire, qui constitue un réseau complexe d'interactions. Il existe deux types d'immunité. L'immunité innée reconnaît les pathogènes et les dommages tissulaires grâce à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR, de l'anglais *Pattern Recognition Receptor*). Cette réponse immunitaire est rapide, non spécifique et implique des cellules telles que les macrophages, les neutrophiles et les cellules Natural Killer. En revanche, l'immunité adaptative ou acquise est lente et spécifique, et elle conduit à la formation d'une mémoire immunitaire. Cette immunité est médiée par les cellules dendritiques, ainsi que par les lymphocytes T et B (Dinarello, 2010; Netea et al., 2020; Paço et al., 2022).

Les principales molécules impliquées lors d'une inflammation sont les cytokines, de petites molécules sécrétées qui jouent un rôle crucial dans les interactions et la communication entre les cellules, ainsi que dans la modulation de la perception de la douleur. Parmi les cytokines, il y a les lymphokines, les monokines, les chimiokines qui jouent un rôle dans l'attraction des cellules immunitaires, et les interleukines qui agissent principalement sur les leucocytes. Les cytokines peuvent être pro-inflammatoires, comme les chimiokines et les interleukines (IL) 1, 2, 6, 8 et le facteur de nécrose tumorale

alpha (TNF- α , de l'anglais *tumor necrosis factor- α*), ou anti-inflammatoire, comme les interleukines 1, 4, 10, 11 et 13, et l'IL-10 identifiée comme étant la plus puissante (Zhang and An, 2007).

D'autres composés jouent des rôles majeurs dans l'inflammation, tels que les *toll-like receptors* (TLR), qui sont des protéines membranaires présentes chez tous les organismes pluricellulaires. Ces récepteurs appartiennent à la famille des PRR et déclenchent une réponse innée lorsqu'ils se lient à leurs ligands respectifs (**Figure 10**).

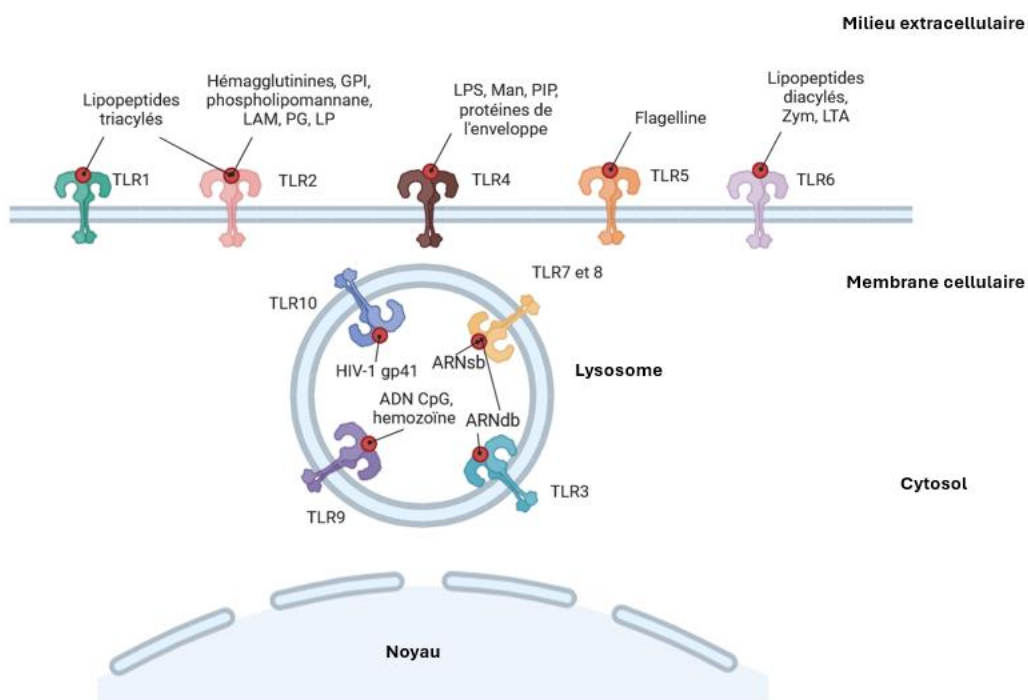


Figure 10 : Localisation des TLR au sein de la cellule et leurs ligands respectifs, selon Uematsu and Akira, (2008); Wicherska-Pawłowska et al., (2021).

Les cellules possèdent différents TLR au niveau de leur membrane plasmique (TLR1, 2, 4, 5 et 6) ou de la membrane des lysosomes (TLR3, 7, 8, 9 et 10). Ces récepteurs TLR permettent de déclencher une réponse immunitaire lors d'une infection par des agents pathogènes en se liant à leurs ligands spécifiques. GPI : glucosylphosphatidylinositol, LAM : lipoarabinomannane, PG : peptidoglycanes, LP : lipoprotéines, LPS : lipopolysaccharides, Man : mannane, PIP : phospholipides d'inositol, Zym : Zymosane, LTA : acide lipoteichoïque.

Ils sont donc impliqués dans le système immunitaire et sont présents sur les cellules de l'immunité comme les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules B, mais également sur les cellules épithéliales. Les TLR peuvent être présents à la surface des cellules (TLR1, 2, 4, 5 et 6) ou intracellulaires, au niveau des endosomes (TLR3, 7, 8, 9 et

10). Chaque TLR possède des ligands spécifiques : par exemple, les TLR1 reconnaissent les lipopeptides triacylés des bactéries, les TLR3 reconnaissent les ADN double brin (ADNdb) et les ADN simple brin (ADNsb) des virus, et les TLR5 reconnaissent les flagellines. Les TLR2, quant à eux, sont des récepteurs qui reconnaissent les PRR tels que l'hémagglutinine, les porines, le glycosylphosphatidylinositol, le phospholipomanane, le lipoarabinomanane, le peptidoglycane et les lipoprotéines. Les TLR4 reconnaissent l'inositol, le mannane, les phospholipides, les protéines de l'enveloppe ainsi que les lipopolysaccharides (Mullaly and Kubes, 2006; Takeuchi and Akira, 2010; Wicherska-Pawłowska et al., 2021).

L'inflammation, lorsqu'elle se prolonge sans contrôle peut provoquer des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique, mais également d'autres pathologies, telles que les maladies auto-immunes, les maladies neurodégénératives, le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'obésité, le diabète de type 2 et l'arthrite. De plus, le cancer et l'obésité sont des facteurs aggravants de l'inflammation (Dinarello, 2010; Yahfoufi et al., 2018; Singh et al., 2019; Roe, 2021). Il est donc crucial de quantifier l'inflammation. À cette fin, certains biomarqueurs de l'inflammation peuvent être mesurés, notamment la cyclooxygénase-2 (COX-2), la 5-lipoxygénase, les métalloprotéines, les protéines C réactives du facteur de croissance endothéliale vasculaire, mais surtout les cytokines (Roe, 2021).

2.2.2. L'activité anti-inflammatoire de la chicorée

Les molécules anti-inflammatoires sont définies comme des agents destinés à combattre l'inflammation. Les anti-inflammatoires stéroïdiens, appelés corticoïdes, sont à distinguer des anti-inflammatoires non stéroïdiens, qui agissent également contre la douleur et la fièvre (Définition anti-inflammatoire).

La chicorée est reconnue pour ses effets anti-inflammatoires. Ces propriétés sont principalement attribuées aux LST, qui diminuent l'activité du facteur nucléaire d'activation des cellules T et l'activation du calcineurine/Cr2 dans la voie de signalisation calcique impliquée dans la réponse immunitaire. Les LST inhibent

également la voie AMPK/SIRT1/FXR, qui est impliquée dans la réponse au stress, réduisant la production de monoxyde d'azote et la sécrétion du TNF- α et de l'IL-6 (Baixinho et al., 2021; Meng et al., 2022). Il a ainsi été mis en avant dans une tri-culture composée de cellules Caco-2/HT29-MTX/M, que la 8-desoxylactucine et la dihydro-13-dihydro-8-desoxylactucine réduisaient les taux d'IL-8, l'activité enzymatique de COX-2, ainsi que l'expression de l'oxyde nitrique synthase (iNOS), une enzyme induite par des stimuli inflammatoires qui provoque la production d'ERO et de monoxyde d'azote (Cankar et al., 2023). L'activité anti-inflammatoire des LST dépend de leur structure. Il a été démontré que la fraction β -méthylène-lactone et la fonction ester en position C8 jouaient des rôles essentiels dans cette activité (Paço et al., 2022).

Les polyphénols possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, notamment en réduisant la concentration en TNF- α , IL-1 β et IL-6, en inactivant le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) et en modulant la voie des Mitogen-Activated Protein (MAPkinases), de l'acide arachidonique, ainsi que d'autres protéines et enzymes impliquées dans la réponse inflammatoire. Les polyphénols peuvent également inhiber l'expression des TLR2 et TLR4. L'activité anti-inflammatoire est étroitement liée à l'activité antioxydante, et les propriétés anti-inflammatoires des polyphénols sont souvent dues à leurs capacités antioxydantes. En effet, ils augmentent la biosynthèse des enzymes antioxydantes impliquées dans l'inflammation, telles que COX-2 et la synthase d'oxyde nitrique (NOS). L'ensemble de ces effets seraient principalement attribués aux acides caféique et rosmarinique (González et al., 2011; Tsuda et al., 2012; Akyol et al., 2013; Yahfoufi et al., 2018). Les flavonoïdes présentent également des effets anti-inflammatoires grâce à leurs propriétés antioxydantes, car ils inhibent la synthèse des prostaglandines et réduisent le stress oxydatif en diminuant le nombre de fibroblastes et la formation de granulomes (Keshk et al., 2019). Enfin, l'acide phénolique, ayant l'activité anti-inflammatoire la plus significative, est l'acide chicorique. Une étude évaluant l'effet de l'acide chicorique contre la colite induite par le sulfate de dextran sodique chez le rat a permis de montrer que cet acide améliore les lésions, réduit l'expansion de l'inflammation et augmente la production d'enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, et la glutathion réductase. Dans cette même étude effectuée sur des rats, l'acide chicorique a également été

caractérisé pour son effet anti-apoptotique et réducteur de l'expression de NFκB et des MAP kinases. Il a également diminué la production de TNF-α, d'IL-1β, d'IL-6 et d'IL-10 (Alharthi, 2023).

2.3. Activité hépato-protectrice

2.3.1. Les maladies hépatiques

Le foie joue un rôle central dans le métabolisme des macronutriments, en assurant à la fois le stockage des glucides, l'homéostasie des lipides et du cholestérol, ainsi que la synthèse de protéines. Il participe à la régulation du volume sanguin, est impliqué dans le système immunitaire, et joue également un rôle dans le contrôle endocrinien des voies de signalisation de la croissance (Trefts et al., 2017). Bien que le foie ait une capacité remarquable de régénération, il est cependant exposé à de nombreuses menaces (Neshat et al., 2021). En effet, 4 % des décès dans le monde sont liés à des maladies du foie. Les hommes étant deux fois plus touchés que les femmes. Parmi ces maladies, peuvent être mentionnées, la cirrhose, le carcinome hépatocellulaire, les hépatites virales A, B, C, D et E, la stéatose hépatique qui peut évoluer en stéatohépatite, la cholangite sclérosante primaire et biliaire primitive, l'hépatite auto-immune, et l'insuffisance hépatique qui est le plus souvent induite par des médicaments (Devarbhavi et al., 2023). Malgré les progrès constants dans la prise en charge de ces maladies, et en raison des multiples fonctions du foie dans l'organisme, il est impératif de soutenir les patients avec une alimentation adaptée et équilibrée, qui contribue également à la prévention des maladies hépatiques (Mandato et al., 2017).

La consommation d'alcool moyenne dans le monde était de 6,4 L par personne et par an en 2016. La prévalence mondiale des troubles liés à l'alcool est de 5,1 %. En Europe, cette valeur est nettement plus élevée, atteignant 14,8 % chez les hommes et 3,5 % chez les femmes (Devarbhavi et al., 2023). L'alcool est la principale cause des maladies du foie. Il est d'abord absorbé par l'intestin grêle, où il peut perturber les jonctions serrées, entraînant une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale, avant d'être métabolisé par le foie (Mandato et al., 2017; Mackowiak et al., 2024). Dans le foie, il est oxydé en acétaldéhyde, puis en acétate par les alcools déshydrogénases. Ce processus

peut générer des ERO, provoquant ainsi un stress oxydatif. En excès, l'acétaldéhyde est cancérigène et constitue une des causes des maladies hépatiques (Neshat et al., 2021). Une consommation excessive d'alcool peut également altérer la biogenèse mitochondriale, endommager l'ADN mitochondrial et, par conséquent, induire un stress oxydatif pouvant provoquer la mort cellulaire (Mackowiak et al., 2024). Le stress oxydatif joue un rôle clé dans les maladies hépatiques liées à l'alcool, tout en ayant un impact sur le système immunitaire.

Le foie agit comme une barrière immunitaire, capable de détecter et de lyser les agents pathogènes. Toutefois, en l'absence d'homéostasie immunitaire, une inflammation excessive peut favoriser la progression de pathologies telles que la stéatohépatite, la cirrhose, le carcinome hépatocellulaire ou encore la fibrose hépatique (Neshat et al., 2021; Mackowiak et al., 2024). Les cellules de Kupffer, macrophages localisés dans le foie, sont essentielles dans la reconnaissance des pathogènes via les PRR. Elles jouent un rôle aussi bien dans la lésion des tissus que dans l'apoptose cellulaire. En effet, l'hépatite auto-immune, une maladie inflammatoire du foie, est déclenchée par les auto-anticorps et les débris cellulaires, ce qui active une réponse immunitaire (Neshat et al., 2021).

2.3.2. Les propriétés hépto-protectrices de la chicorée

L'effet hépto-protecteur, contrairement aux activités antioxydantes ou anti-inflammatoires, n'est pas lié à un mécanisme spécifique. Il fait plutôt référence à la capacité de molécules ou de plantes à prévenir ou à traiter les lésions hépatiques provoquées par des substances hépatotoxiques. Le phytomédicament Liv-52, qui contient notamment de la chicorée, a été mis sur le marché en 1955. Il empêche la perte de l'intégrité fonctionnelle des membranes cellulaires, active le cytochrome p-450, et favorise la régénération des cellules hépatiques (Durazzo et al., 2021). Depuis, de nombreuses études réalisées sur l'homme ou des modèles murins ont confirmé les propriétés hépto-protectrices de la chicorée. L'inuline permettrait indirectement de réguler l'expression protéique et de diminuer le cholestérol hépatique contribuant à diminuer la stéatose hépatique non alcoolique (Ignat et al., 2021).

L'effet hépato-protecteur est généralement attribué à des molécules issues de plantes, et particulièrement aux flavonoïdes. Il a été démontré que, comme pour les acides hydroxycinnamiques, la structure des flavonoïdes influençait leur activité. La double liaison C₂-C₃ dans le cycle A ainsi que la présence des groupes hydroxyles sur les carbones C₃ et C₄, et d'un carbonyle en C₂ améliorent leur efficacité (Majee et al., 2023).

Plusieurs études ont évalué la capacité de la chicorée à contrer l'effet hépatotoxique du tétrachlorure (CCl₄), pouvant induire une inflammation et une fibrose hépatique. Des extraits de chicorée ont permis de protéger les lésions induites par le CCl₄ dans un modèle murin, en modulant l'activité des enzymes protéine kinase B (Akt-1) et caspase-1, impliquées dans l'apoptose. Ils réduisaient également les niveaux de cholestérol plasmatique et de la synthèse d'acides gras, limitant ainsi la dégénérescence graisseuse du foie. En outre, ces extraits ont également contribué à améliorer le profil protéique en empêchant l'oxydation des protéines et en réduisant l'activité des enzymes alanine (ALAT) et aspartate aminotransférases (ASAT), qui sont généralement élevées en cas de lésions hépatiques (Atta et al., 2010; Li, 2014; Li et al., 2015; Soliman et al., 2016; Siddiqa et al., 2024). Parmi les composés bioactifs de la chicorée, l'acide chicorique est le plus référencé pour son activité hépato-protectrice. Ce polyphénol possède également des propriétés antivirales, notamment contre le virus de l'hépatite B, en réduisant la réplication de l'ADN viral et le niveau d'antigène (Zhang et al., 2014; Janda et al., 2021).

La chicorée permettrait de réduire le stress oxydatif en inhibant la fragmentation de l'ADN et en induisant la production du glutathion, un tripeptide antioxydant essentiel pour réguler le potentiel redox du cytoplasme cellulaire. L'ensemble des études portant sur les effets hépato-protecteurs de la chicorée rapporte que ces effets sont majoritairement attribués aux activités antioxydantes et anti-inflammatoires de ses composés bioactifs. (Atta et al., 2010; Durazzo et al., 2021; Farag et al., 2023).

2.4. Les bioactivités de la chicorée au niveau intestinal

2.4.1. La digestion gastro-intestinale

Les activités biologiques des molécules peuvent être modifiées au cours du processus de digestion gastro-intestinale, influençant ainsi leur efficacité. De nombreuses études se sont intéressées au devenir des molécules et de leurs activités biologiques dans le tractus gastro-intestinal. Par exemple, dans le cas des protéines, il est bien établi que les enzymes digestives, telles que la pepsine dans l'estomac et les enzymes pancréatiques, dégradent les protéines pour libérer des acides aminés libres ainsi que des di- et tri-peptides, qui sont ensuite absorbés par les entérocytes. Des peptides de tailles variées, résistants aux enzymes digestives, peuvent également être produits. Ces peptides possèdent souvent des propriétés bioactives, soit en interagissant avec les récepteurs des entérocytes et les enzymes présentes dans la lumière intestinale, soit en traversant la barrière intestinale pour atteindre leurs cibles dans l'organisme. De plus, ils peuvent être métabolisés par le microbiote intestinal, générant ainsi des métabolites bioactifs (Caron et al., 2017; Dugardin et al., 2022; Fleury et al., 2022).

Le devenir des polyphénols dans le tractus gastro-intestinal est moins connu et dépend de plusieurs facteurs, notamment de leur structure, de leur stabilité et de leur encombrement stérique. La digestion simulée *in vitro* a montré que la phase orale impactait la plupart des polyphénols, entraînant une diminution de leur activité antioxydante. En revanche, la digestion gastrique permettait d'augmenter leur activité, alors qu'elle diminuait de nouveau lors de la digestion intestinale, avec *in fine* une réduction de la teneur en polyphénols et de leur l'activité antioxydante en fin de digestion (Li et al., 2023). Cependant, une autre étude a évalué l'impact de la digestion simulée *in vitro* sur les activités antioxydante et anti-inflammatoire des polyphénols de cannelle et de clou de girofle. Les résultats ont montré que la digestion gastro-intestinale diminuait l'activité antioxydante de la cannelle alors qu'elle augmentait celle des clous de girofle. Cette conclusion s'appliquait également à l'activité anti-inflammatoire qui était liée à l'enzyme COX-2 (Baker et al., 2013). L'impact de la digestion sur les polyphénols varie donc en fonction de différents paramètres comme la nature des composés phénoliques ou la matrice qui les contient. Une autre étude s'est intéressée à l'impact de la digestion

gastro-intestinale, simulée *in vitro*, sur les polyphénols de mûres en mesurant l'activité antioxydante par différents tests biochimiques (ORAC, TEAC et la décoloration du β -carotène) ainsi que sur les cellules intestinales Caco-2. Il a été démontré que les anthocyanes et les flavonols étaient dégradés au cours de la digestion en polyphénols de plus petite taille, présentant une activité antioxydante accrue et une biodisponibilité supérieure (Sánchez-Velázquez et al., 2021). Ce phénomène a également été observé avec des polyphénols provenant du marc d'olive. La digestion gastro-intestinale a eu un impact positif sur l'activité antioxydante et la biodisponibilité des polyphénols. Une hypothèse avancée est que les polyphénols de petite taille sont plus susceptibles d'être absorbés, bien que leur dégradation au cours de la digestion puisse entraîner une diminution de leur activité antioxydante (Radić et al., 2020).

2.4.2. L'impact du microbiote intestinal

Le microbiote est une communauté microbienne complexe. L'intestin est le compartiment où cette population est la plus importante, jusqu'à représenter plus d'1 kg du poids corporel. Seule une faible partie de ce microbiote est considérée comme pathogène, sans menacer la santé de l'hôte (Milani et al., 2017). Le microbiote intestinal est représenté à 90 % par 4 phylums incluant les Firmicutes suivi des Bacteroidetes, des Actinobacteria et enfin des Proteobacteria. Cependant, le microbiote intestinal est modulé par des facteurs génétiques et environnementaux dès le plus jeune âge, l'alimentation étant le facteur environnemental le plus important (Bibbò et al., 2016). Une alimentation riche en calories, en aliments ultra-transformés, trop grasse, trop sucrée et faible en fibres, provoque une augmentation de la population bactérienne opportuniste et une inflammation intestinale, tout en diminuant les bactéries bénéfiques et les acides gras à chaînes courtes. Au contraire, les régimes à base de plantes possèdent de nombreux bénéfices. Les plantes sont riches en fibres alimentaires qui sont métabolisées par le microbiote intestinal en acides gras à chaînes courtes (SCFA, de l'anglais *short-chain fatty acids*)(Beam et al., 2021). Ces derniers sont une source d'énergie, mais possèdent également de nombreux bénéfices pour l'organisme. En effet, les SCFA sont anti-inflammatoire, anti-apoptotique et régule la lipogenèse (Flint et al., 2015). De plus, ils ont la capacité de moduler la prise alimentaire en régulant

la production des hormones intestinales telles que le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et le peptide YY (PYY) qui sont également impliquées dans l'homéostasie du glucose. En plus de la production de SCFA, les fibres alimentaires comme l'inuline permettent également de jouer un rôle prébiotique en favorisant le développement des Bifidobactéries et des Lactobacilles au détriment des bactéries opportunistes (Beam et al., 2021). Les polyphénols sont aussi des molécules capables de moduler le microbiote intestinal, en privilégiant les bactéries bénéfiques (Rodríguez-Daza et al., 2021). De nombreuses études ont montré que la consommation de polyphénols provenant, notamment de fruits et de vin rouges, permettait d'augmenter les bactéries des genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, tout en entraînant une diminution des bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli* et *Enterobacter cloacae* (Beam et al., 2021). Bien que les polyphénols ne soient pas considérés comme des prébiotiques, ils jouent un rôle relativement similaire. Certaines bactéries comme les *Lactobacillus*, chez qui les acides hydroxycinnamiques peuvent induire un stress, sont capables de les dégrader grâce à diverses enzymes comme la féruloyl estérase ou les réductases d'acides phénoliques afin de les détoxifier et de produire des métabolites bactériens comme les acides phénylpropionique, phlorétique, dihydroférulique ou dihydrocaféique. Ces derniers sont capables de passer au travers de la barrière intestinale par diffusion passive ou à l'aide de transporteurs afin d'exercer une activité anti-inflammatoire locale (Muñoz et al., 2017; Leonard et al., 2021; Rodríguez-Daza et al., 2021).

3. Voies de valorisation des co-produits de chicorée et d'endive

3.1. Les co-produits alimentaires

Les co-produits ne sont pas réellement définis juridiquement mais les sous-produits sont définis comme « Substance ou objet résultant d'un processus de production et qui n'est pas le produit final que ce processus vise à produire, mais dont l'utilisation ultérieure et directe est certaine ». Les co-produits sont présents depuis toujours et décrits depuis des décennies, comme dans cet ouvrage publié en 1892 « Résidus Industriels dans

l'Alimentation du Bétail ». Depuis, leur quantité ne fait qu'augmenter. En France, ils sont taxés depuis les années 70 s'ils ne sont pas valorisés et représentaient 12,1 millions de tonnes en 2017 (Chapoutot et al., 2018). À l'échelle mondiale, il est estimé que 40 à 50 % des co-produits alimentaires sont gaspillés (Conte and Del Nobile, 2023). Il est donc impératif de valoriser ces déchets ou co-produits, afin de limiter leurs impacts économiques et environnementaux. Les co-produits alimentaires sont principalement utilisés dans l'alimentation animale. Toutefois, ils peuvent également être valorisés en agriculture, notamment comme engrais ou compost, en tant que source d'énergie via la méthanisation ou la combustion, ou encore comme matières premières pour d'autres industries (Chapoutot et al., 2018).

Parmi les co-produits alimentaires, les plus abondants sont ceux provenant des fruits et légumes (Conte and Del Nobile, 2023). En effet, au cours du processus de production, plusieurs étapes, telles que la récolte, la transformation et la commercialisation, génèrent des co-produits. À partir des fruits, la production de co-produits la plus importante concerne les industries des jus et boissons, avec notamment les épiluchures, le marc et les tiges. Ensuite, viennent les co-produits issus de la production d'huiles et de tomates, comme les épiluchures, les graines ou la pulpe. D'autres secteurs, comme l'industrie laitière et la transformation de la viande, génèrent également d'importants volumes de co-produits (Chapoutot et al., 2018).

Il existe deux formes de valorisation distinctes. La première est la valorisation de masse, qui consiste à traiter de grandes quantités de co-produits à faible valeur ajoutée. Elle est généralement appliquée dans les secteurs de la fertilisation, de la production d'énergie et de l'alimentation animale. La seconde forme est la valorisation de niche, où les volumes de co-produits sont plus réduits, mais la valeur ajoutée est plus élevée grâce à l'utilisation de procédés biotechnologiques tels que l'hydrolyse enzymatique, l'extraction ou la purification. Cette approche concerne principalement les domaines de la nutrition, de la nutraceutique, de la cosmétique, de la pharmaceutique et des biomatériaux (Penven-Turpault et al., 2017).

3.2. Les voies de valorisation des co-produits alimentaires d'origine végétale

Différentes voies de valorisation des co-produits alimentaires végétaux existent, comme l'extraction, l'hydrolyse enzymatique ou la fermentation. L'extraction est souvent utilisée afin d'isoler des molécules bioactives. En effet, certains co-produits, notamment ceux issus des fruits et légumes, contiennent des composés bioactifs tels que les polyphénols, les terpènes ou encore certains peptides. Diverses méthodes d'extraction peuvent être utilisées. L'extraction peut être réalisée par traitement thermique en utilisant de l'eau à haute température, ainsi que des solvants acides, alcalins ou organiques. L'extraction peut aussi être effectuée à l'aide de procédés enzymatiques ou encore grâce à des procédés utilisant des ultrasons ou des micro-ondes. Souvent, ces méthodes sont combinées pour optimiser l'extraction (Mahato et al., 2019; Arzami et al., 2022). Par exemple, les polyphénols du jus d'argousier ont été extraits à l'aide de solvants organiques, tels que l'éthanol, assistés par ultrasons, afin d'être valorisés en tant qu'ingrédient antioxydant (Luntrararu et al., 2022).

Toujours dans le but de purifier des molécules d'intérêt, l'hydrolyse enzymatique peut être utilisée. Dans le but d'extraire les polyphénols de co-produits d'origine végétale, un prétraitement enzymatique peut s'avérer nécessaire. Pour cela, des enzymes comme la β -glucanase, la xylanase, la cellulase et la β -glucosidase sont utilisées afin de dégrader la paroi cellulaire, et d'en extraire plus facilement les molécules bioactives (Barcelos et al., 2020). L'utilisation d'enzymes comme les cellulase, protéases, xylanases et pectinases a permis d'améliorer le rendement d'extraction d'huile de raisin de 43,5 % (Rui et al., 2009). Les co-produits végétaux issus de l'extraction d'agrumes, considérés comme déchets, peuvent également être valorisés par hydrolyse enzymatique. Les pectinases et les cellulases sont fréquemment utilisées afin de produire des huiles essentielles bioactives (Barcelos et al., 2020). Le son et la coque de riz sont également valorisés par hydrolyse enzymatique afin d'utiliser les polyphénols qu'ils contiennent comme antioxydants. La cellulase a permis d'améliorer la libération des acides phénoliques et ainsi d'améliorer l'activité antioxydante (Wanyo et al., 2014). En plus des acides phénoliques, des peptides antioxydants provenant de riz par exemple peuvent être obtenus par hydrolyse enzymatique avec des protéases alimentaires telles que

l'alcalase, la neutrase, la flavourzyme et la papaïne. Les hydrolysats peuvent ensuite être utilisés comme additifs ou aliments fonctionnels (Dei Piu' et al., 2014; Ferri et al., 2017).

La fermentation est également une excellente voie de valorisation. En effet, elle est peu coûteuse, peu polluante, et applicable à de nombreux domaines comme les co-produits des industries papetière, du biodiesel, mais surtout de l'agro-alimentaire (Koutinas et al., 2014). La fermentation est une voie permettant d'améliorer les propriétés technologiques, sensorielles, nutritionnelles et fonctionnelles de nombreuses matrices par l'augmentation en minéraux, en vitamines, en phénols, et en molécules bioactives, mais également en améliorant leur digestibilité (Verni et al., 2019). Les méthodes de fermentation sont très nombreuses du fait de la quantité de souches bactériennes et fongiques utilisables. Une étude portant sur la fermentation des pelures d'oignons jaunes et rouges a d'ailleurs comparé l'effet de différentes souches. Les fermentations des oignons blancs ont permis d'obtenir le contenu le plus élevé en polyphénols avec la levure *Saccharomyces cerevisiae*, mais la souche de bactérie lactique *Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum*) a permis d'augmenter de 60 % la quantité d'aglycone de quercétine initialement présente dans l'oignon. Pour l'oignon rouge, la fermentation réalisée avec *L. plantarum* a permis d'augmenter le contenu en polyphénols et la levure *Zygosaccharomyces mrakii* a permis d'augmenter la teneur en aglycone de quercétine de 25 % (Ramires et al., 2023). La fermentation en milieu solide est également utilisée, notamment avec les champignons tel que *Aspergillus oryzae*, et permet d'améliorer la production d' α -amylase à partir de co-produit de soja et de blé (Melnichuk et al., 2020). Les drêches de brasseries ou le son de blé peuvent aussi être valorisées par cette voie. Après fermentation de type miso, des peptides connus pour leur arôme « beurré », appelés peptides kokumi sont générés. Ces peptides peuvent être ajoutés à certaines préparations amers comme celles contenant des endives, afin de contrebalancer leur amertume (Rodríguez Valerón et al., 2023). La fermentation permet donc de nombreuses applications comme la production d'enzymes, de polymères, de molécules bioactives et d'ingrédients à visé santé.

3.3. La valorisation des co-produits de chicorée et d'endive

Comme évoqué précédemment, la chicorée fait partie des plantes dont l'utilisation par l'industrie agroalimentaire génère de nombreux co-produits (**Figure 1 et Figure 3**). En effet, les 125 000 tonnes d'endives commercialisées entraîne chaque année plus 400 000 tonnes de racines après forçage, constituant un co-produit majeur (Van Arkel et al., 2022). Pour la chicorée industrielle, le marc de chicorée représente à lui seul 15 000 tonnes par an dans le département du Nord (Pradal et al., 2016; Latella et al., 2024).

Les co-produits issus de la chicorée et de l'endive sont nombreux et contiennent des molécules bioactives qui peuvent être extraites grâce à l'utilisation des procédés précédemment décrits. Par exemple, une méthode d'extraction assistée par ultrasons a été développée afin d'extraire les polyphénols du marc de chicorée. Les extractions réalisées par ultrasons ont permis d'obtenir les mêmes rendements que celles réalisées à l'aide de solvants organiques sous agitation, mais en un temps plus court et avec une dépense énergétique moindre (Pradal et al., 2016). Une autre étude a utilisé des feuilles d'endives externes pour en extraire les polyphénols antioxydants à l'aide d'une solution de méthanol et d'une résine polymérique non ionique (Llorach et al., 2004).

Les co-produits de chicorée sont surtout utilisés en alimentation animale, et de plus en plus intégrés à des formulations symbiotiques avec des souches de *Lactobacillus*, dans le but d'être fermentés par le microbiote intestinal. La farine de chicorée, riche en inuline, est ainsi supplémentée avec des probiotiques comme *Lactobacillus acidophilus*, *Limosilactobacillus reuteri* (*L. reuteri*), *Lactobacillus bulgaricus*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactobacillus delbruekii*, *Lactiplantibacillus plantarum*, etc. Cette supplémentation vise à améliorer la croissance des animaux d'élevage en modifiant favorablement le microbiote intestinal, que ce soit chez les mammifères comme les bovins ou chez les volailles (Singh et al., 2021; Gurram et al., 2022). Dans d'autres travaux, des racines de chicorée, après extraction de l'inuline, ont été soumises à un traitement enzymatique utilisant différentes enzymes (l'inulinase, la pectinase, la cellulase, la β -galactosidase, la xylanase et l'estérase de l'acide férulique). Ce traitement a permis d'augmenter leur activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ouvrant ainsi la voie à des applications dans le domaine de

la cosmétique (Häkkinen et al., 2022). L'inuline, un des principaux composés valorisables des racines de chicorée, est largement utilisée dans diverses industries. Grâce à ses propriétés texturante et sucrante, elle peut remplacer la matière grasse dans des produits alimentaires tels que les yaourts et les sauces, améliorant ainsi leur onctuosité tout en étant utilisée comme édulcorant (Shoaib et al., 2016). De plus, après une hydrolyse enzymatique, l'inuline peut être fermentée par des bactéries comme *Cupriavidus necator* afin de produire du polyhydroxybutyrate, un polymère biodégradable utilisé dans la fabrication de bioplastiques (Guzmán-Lagunes et al., 2024). Ainsi, les racines de chicorée considérées comme non conformes et celles obtenues après forçage peuvent être utilisées comme matières premières dans diverses industries.

4. La fermentation par les souches de *Lactobacillus* comme voie de valorisation

4.1. Généralités sur les *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus*, défini pour la première fois en 1901 par Beijerinck, est un groupe bactérien hétérogène largement répandu dans divers environnements, notamment végétaux, animaux et humains. Ce groupe appartient au phylum des *Firmicutes*, à la classe des Bacilli et il est composé de plus de 260 espèces. Ces bactéries sont des bacilles à Gram positifs, catalases négatives, anaérobies facultatives, non mobiles et non sporulentes (Goldstein et al., 2015; Zheng et al., 2020). L'ensemble des *Lactobacillus* possèdent le statut de présomption de sécurité qualifiée (QPS, de l'anglais *qualified presumption of safety*) accordé par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, de l'anglais *european food safety authority*) mais également le statut généralement reconnu comme sûr (GRAS, de l'anglais *generally recognized as safe*) donné par la *food and drug administration* (FDA). Ces statuts ont été accordés suite à de nombreuses études prouvant que ces espèces étaient sans danger pour la consommation humaine (Liu et al., 2018). Leur taxonomie a d'abord été établie sur la base de leurs caractéristiques phénotypiques comme leur température optimale de croissance, l'utilisation de sucres ainsi que leur production de métabolites. Ensuite, elle a été

complétée par leurs caractéristiques génotypiques, comme leur contenu en GC% ou encore la structure chimique de leur peptidoglycane (Zheng et al., 2020). Les *Lactobacillus* sont des bactéries lactiques caractérisées par des colonies blanches mucoïdes qui poussent sur de nombreux types de milieux. Le milieu *deMan, Rogosa, Sharpe* (MRS), a été développé pour leur croissance optimale (**Figure 11**) (Goldstein et al., 2015).



Figure 11 : Photographies de *Limosilactobacillus reuteri* sur une gélose MRS.

Les *Lactobacilles* sont retrouvés dans divers milieux tels que les sols, les végétaux et certaines matrices alimentaires. Chez l'Homme, les *Lactobacilles* sont présents dans plusieurs microbiotes, incluant le microbiote buccal avec des espèces comme *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*), *Lacticaseibacillus paracasei*, et le microbiote gastro-intestinal avec des espèces comme *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus antri*, *Limosilactobacillus gastricus*, *Lactobacillus kalixensis*, *Limosilactobacillus reuteri* et *Lactobacillus ultunensis*, mais également dans le microbiote vaginal avec *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, *Limosilactobacillus vaginalis*, et *Lactobacillus iners* (Tailliez, 2004; Goldstein et al., 2015). Les *Lactobacillus* jouent un rôle essentiel pour de nombreux animaux et pour l'Homme. En effet, ces bactéries sont des probiotiques, définies par l'organisation mondiale de la santé comme des micro-organismes vivants, qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent une bénéfique santé pour l'Homme (Duar et al., 2020). Ces bactéries jouent un rôle crucial dans l'équilibre du microbiote et dans la prévention de certaines infections, notamment les vaginites bactériennes (Tailliez, 2004; Yang et al., 2018). Les *Lactobacilles* inhibent le développement de bactéries indésirables ou pathogènes grâce à leur capacité à abaisser

le pH du milieu et à produire des substances antimicrobiennes comme l'acide lactique, ce qui les rend essentielles pour maintenir l'équilibre microbien (Antonio et al., 1999; Tailliez, 2004).

Les *Lactobacilles* sont des bactéries lactiques qui produisent de l'acide lactique par fermentation (**Figure 12**). Au cours de ce processus, elles métabolisent le glucose en pyruvate par la glycolyse.

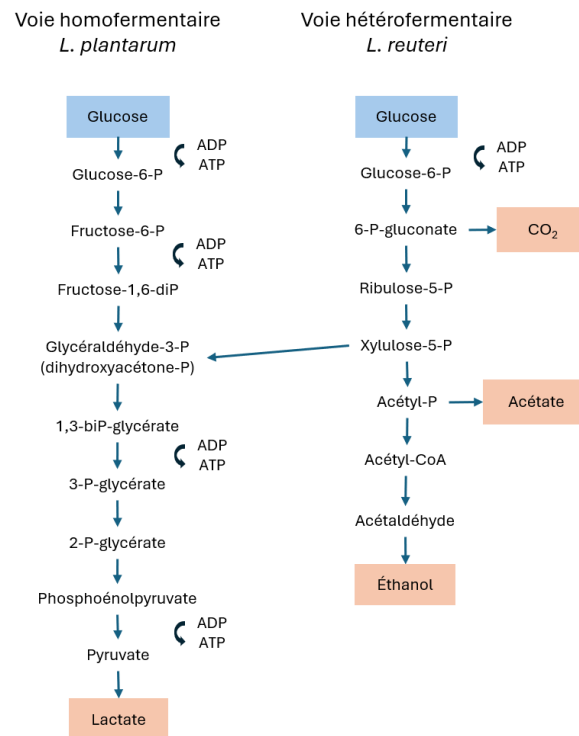


Figure 12 : Schéma des voies fermentaires des *Lactobacilles*.

Une partie des *Lactobacilles* sont homofermentaires, c'est-à-dire que le lactate est le seul produit issu de la métabolisation du glucose. C'est le cas de *L. plantarum*. Au contraire, *L. reuteri* est hétérofermentaire, c'est-à-dire qu'à partir du glucose, la bactérie produira différents substrats comme le lactate mais également du CO₂ et de l'acétate.

En fonction de leur métabolisme, les bactéries lactiques peuvent être homofermentaires, ne produisant que de l'acide lactique à partir de pyruvate, ou hétérofermentaire, générant en plus d'autres composés comme de l'acétate, l'éthanol, ou le CO₂. La fermentation lactique de certains substrats peut, en plus de produire certaines molécules d'intérêts, améliorer des propriétés nutritionnelles ou organoleptiques des aliments. Depuis des millénaires, la fermentation est utilisée afin de conserver les aliments et d'en développer

de nouveaux comme le pain, le vin, le fromage, la choucroute ou encore le vinaigre (Hill et al., 2018). Aujourd'hui, la fermentation lactique peut être utilisée afin d'améliorer les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles de certains aliments, notamment les fruits et légumes qui sont d'excellents substrats pour ces bactéries en raison de leur richesse en nutriments et en eau. L'utilisation des *Lactobacilles* ne se limite pas à l'industrie agro-alimentaire. En effet, l'acide lactique produit par ces bactéries peut être par la suite purifié et polymérisé afin de produire de l'acide polylactique (PLA, de l'anglais *polylactic acid*) qui est un très bon polymère pour des applications dans les emballages ou les plastiques biodégradables (Tailliez, 2004; Le Rouzic et al., 2022).

4.2. *Lactiplantibacillus plantarum* VS *Limosilactobacillus reuteri*

Il a été prouvé que l'administration orale de *L. plantarum* permettait de prévenir et de traiter les troubles digestifs comme la diarrhée, le syndrome du côlon irritable, et les maladies inflammatoires de l'intestin. Il peut également être utilisé dans la prévention et le traitement de pathologies associées au syndrome métabolique et à l'obésité, telles que l'hypercholestérolémie et le diabète de type 2. En plus de son effet probiotique, *L. plantarum* a montré une activité antimicrobienne contre diverses espèces pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les souches de *L. plantarum* produisant des bactériocines appelées plantaricines sont généralement isolées à partir de viandes, de poissons, de fruits, de légumes ou de lait. Ces différentes bactériocines peuvent avoir diverses applications dans les domaines vétérinaire, médical et alimentaire (Seddik et al., 2017; Liu et al., 2018).

Une des particularités de *L. plantarum* est sa capacité à croître dans de nombreux environnements. Différentes souches ont été séquencées et leur génome mesure environ 3,3 Mb. Cette taille est notamment due à la présence de nombreuses régions qualifiées de « régions d'adaptation au mode de vie ». Ces dernières sont responsables de fonctions comme les transports intra et extracellulaires et l'utilisation de sucres. *L. iners* est l'un des *Lactobacilles* possédant un des plus petits génomes car il n'a été retrouvé que dans le biote vaginal. Cela suggère, que plus le génome est de taille importante, plus l'adaptabilité de la souche est importante (Seddik et al., 2017).

L'adaptabilité de *L. plantarum* lui permet d'être utilisé pour fermenter divers substrats. C'est l'espèce la plus couramment utilisée pour fermenter des produits d'origine végétale, notamment les fruits et légumes riches en polyphénols. Les *Lactobacillus* et plus particulièrement *L. plantarum* sert de modèle pour comprendre comment les composés phénoliques sont métabolisés (**Figure 13**) (Muñoz et al., 2017).

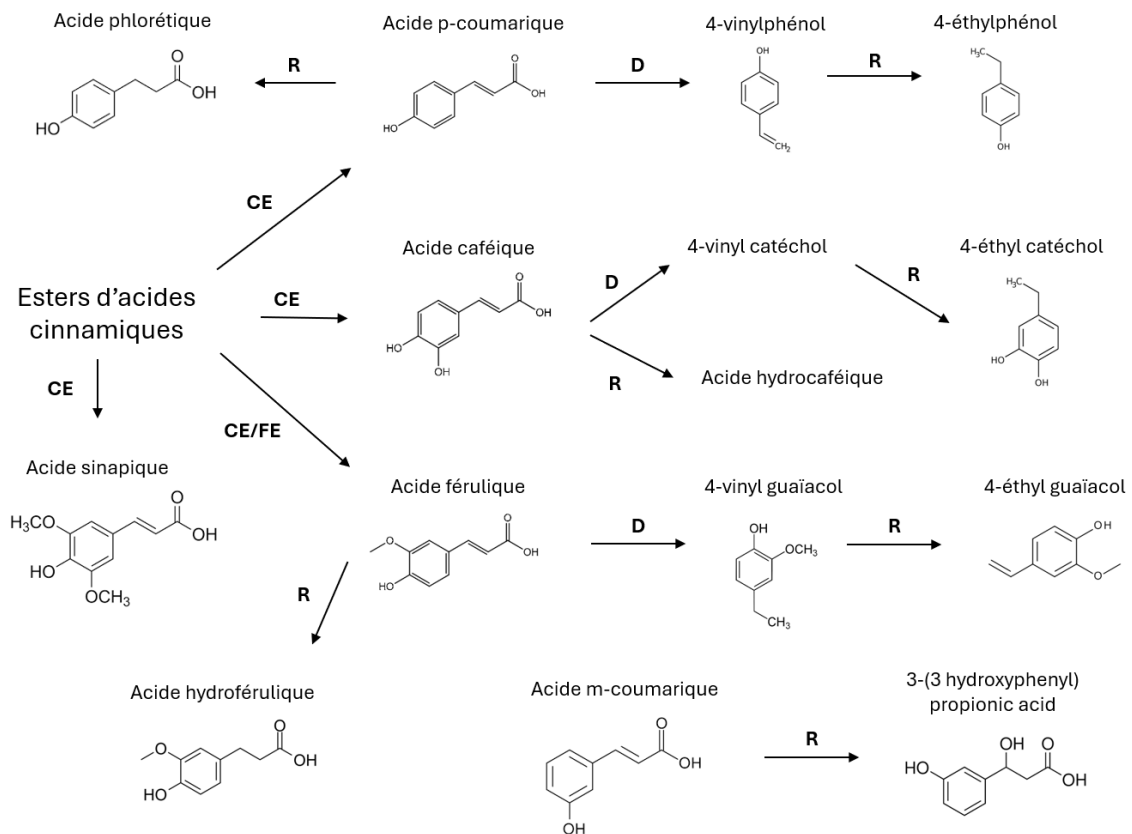


Figure 13 : Transformations des esters d'acides cinnamiques par les enzymes de *L. plantarum* et *L. reuteri* (Rodríguez et al., 2008; Muñoz et al., 2017).

CE : cinnamoyl estérase, FE : feruloyl estérase, D : décarboxylases, R : réductases. Les esters d'acides cinnamiques sont transformés par des estérases en acides hydroxycinnamiques puis décarboxylés en dérivés vinylés puis réduits en dérivés éthyliques.

En effet, *L. plantarum* possède des enzymes capables de dégrader les polyphénols, comme des estérases, des décarboxylases et des réductases d'acides phénoliques. L'estérase d'ester cinnamique appelé cinnamoyl estérase (CE) permet la libération des acides hydroxycinnamiques liés aux parois végétales (Muñoz et al., 2017). Les décarboxylases d'acides phénoliques de *L. plantarum*, appelées Pad décarboxylases, sont spécifiques aux acides hydroxycinnamiques et transforment les acides

p-coumarique, férulique et caféique respectivement en 4-vinyl phénol, 4-vinyl guaïacol et 4-vinyl catéchol. Ces dérivés peuvent être utilisés comme additifs alimentaires. Certaines réductases sont capables de réduire ces acides vinylés en dérivés éthyliques, qui sont des composants aromatiques. Ces enzymes peuvent être induites chez *L. plantarum* par la présence d'acides phénoliques en grande quantité en raison de leur toxicité (Barthelmebs et al., 2000; Rodríguez et al., 2009; Fritsch et al., 2017). De nombreuses études montrent que la fermentation de fruits par *L. plantarum* permet d'augmenter le contenu en polyphénols et leurs bienfaits (Ruiz Rodríguez et al., 2021).

L. reuteri quant à lui est présent chez de nombreux vertébrés à sang chaud, principalement dans le tractus gastro-intestinal, mais il est également retrouvé dans le microbiote buccal, vaginal et dans le lait maternel (Pallin et al., 2016; Shi et al., 2022). Cette espèce, largement présente dans le tractus digestif, joue un rôle clé dans divers processus physiopathologiques, comme l'hypercholestérolémie, les coliques infantiles, la diarrhée, la constipation, les maladies inflammatoires de l'intestin, le cancer colorectal, ainsi que dans la modulation des réponses immunitaires excessives et du stress oxydatif. Ces bienfaits sont étroitement liés à ses propriétés probiotiques et à son activité antimicrobienne. En effet, *L. reuteri* favorise la croissance de certains *Lactobacilles* et de Bifidobactéries, tout en inhibant des pathogènes telles que certaines souches d'*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, et de nombreuses entérobactéries. Cette inhibition résulte de la compétition pour les nutriments, de la baisse du pH, et de la production de certaines molécules antimicrobiennes comme l'acide acétique, l'éthanol et la réutérine (Peng et al., 2023).

Les effets probiotiques de *L. reuteri* sont également attribuables à sa capacité à utiliser de nombreux substrats. Ses voies métaboliques principales comprennent des enzymes fonctionnelles impliquées dans la glycolyse et la voie des pentoses phosphates, qui sont capables de dégrader des fibres alimentaires comme l'inuline (Stewart et al., 2009; Shi et al., 2022). D'autres substrats, comme le lait de coco, permettent également la croissance de *L. reuteri* et ont ainsi été utilisés pour produire des boissons fonctionnelles stables microbiologiquement (Mauro and Garcia, 2019). En plus des enzymes permettant de dégrader les glucides et les fibres alimentaires, *L. reuteri* produit des enzymes, telles que les estérases, les phénoloxydases, les feruloyl estérases, et les décarboxylases d'acides

phénoliques, qui transforment les polyphénols en composés biodisponibles et bioactifs. (Hole et al., 2012; Aguirre Santos et al., 2018).

L. plantarum et *L. reuteri* sont deux espèces de *Lactobacillus* aux propriétés probiotiques intéressantes. Ces deux espèces possèdent des enzymes spécifiques, induites en présence de leurs substrats, et dont l'activité conduit à l'augmentation de la quantité d'acides phénoliques, notamment les acides hydroxycinnamiques libres aux propriétés bénéfiques pour la santé (Rodríguez et al., 2009; Hole et al., 2012).

4.3. La valorisation des co-produits végétaux par les *Lactobacilles*

Le principal composé produit durant la fermentation par les lactobacilles est l'acide lactique. Cependant, d'autres composés tels que des acides organiques, des SCFA, des peptides, et surtout des phénols sont également générés. Ces composés peuvent présenter des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes ou encore prébiotiques, et peuvent également être utilisés pour la production de PLA. Leur valorisation concerne les domaines de l'alimentation animale, de la cosmétique, de l'agroalimentaire et des ingrédients santé (Le Rouzic et al., 2022). Le curcuma est un bon exemple de matrice dont l'activité anti-inflammatoire est augmentée grâce à la fermentation par *Lactobacillus johnsonii*. Cette activité a été démontrée chez des souris atteintes de dermatite atopique, révélant son potentiel en tant qu'aliment fonctionnel (Kim et al., 2011). Les fruits rouges sont connus pour leur excellente activité antioxydante, et la fermentation de jus de mûres par les trois souches de *Lactobacillus* suivantes : *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lacticaseibacillus paracasei* en coculture a permis, tout en préservant la couleur, d'accroître cette activité (Kwaw et al., 2018). *L. plantarum* est l'espèce la plus utilisée pour la fermentation de matrice végétale, c'est cette espèce qui a été utilisée pour fermenter la ciboulette chinoise (*Allium tuberosum*) afin de produire un additif alimentaire contenant des flavonols possédant une activité antimicrobienne contre les pathogènes aviaires (Kothari et al., 2020). De plus, une partie des espèces du genre *Lactobacillus* sont homofermentaires et ne produisent que de l'acide lactique à partir du glucose, qui est le précurseur de PLA. Une étude a montré que les algues sont d'excellents substrats pour la production de PLA. Les produits de fermentation par les *Lactobacilles* peuvent également être utilisés en

alimentation animale, car ils permettent de réduire la production de gaz et d'améliorer la qualité de l'ensilage (Le Rouzic et al., 2022). La fermentation de matrices végétales a permis la production ou l'amélioration de différents aliments. Ainsi, les pains dont les matrices, telles que la farine de blé, avaient été préalablement fermentées par des souches de lactobacilles, présentaient des teneurs supérieures en acides aminés, en protéines et en fibres, ainsi qu'une digestibilité et une saveur améliorées, comparés à ceux issus de matrices non fermentées (Pontonio et al., 2019). Le kombucha est une boisson à base de feuille de thé vert fermenté par le champignon Kombu. Quelques études ont évalué l'effet du remplacement du Kombu par les souches de *L. casei* et *L. plantarum*. Ce remplacement a permis d'augmenter la production d'acide glucuronique corrélée à l'amélioration des activités antimicrobienne et antioxydante (Le Rouzic et al., 2022). La fermentation par les *Lactobacilles* est une voie de valorisation adaptable à de nombreuses matrices et est une source prometteuse de nouveaux ingrédients santé.

4.4. La fermentation des chicorées par les *Lactobacillus*

La fermentation de la chicorée peut être utilisée dans divers domaines comme la production de PLA (**Figure 14**). En effet, la racine de chicorée permet de produire de l'acide D-lactique par une méthode combinant la saccharification et la fermentation par les *Lactobacilles*. La saccharification permet de dégrader l'inuline grâce à des inulinases, et les sucres ainsi libérés servent ensuite de substrat aux *Lactobacilles* pour produire l'acide lactique. Pour ce processus, des inulinases sont ajoutées au milieu de fermentation avant l'incubation (Xu et al., 2016). Dans une démarche économique, de nombreux travaux de recherche s'intéressent à des souches de *Lactobacilles* capables de produire naturellement des inulinases comme *L. paracasei*, *L. bulgaricus*, ou *L. plantarum* (Petrova et al., 2015; Zheng et al., 2018; Ramírez-Pérez et al., 2022). Une autre étude a montré que l'ajout d'ions Mn^{2+} au milieu de fermentation, permettait d'accélérer l'hydrolyse de l'inuline par *L. paracasei*, améliorant ainsi le rendement de la production d'acide lactique (Petrov et al., 2017).

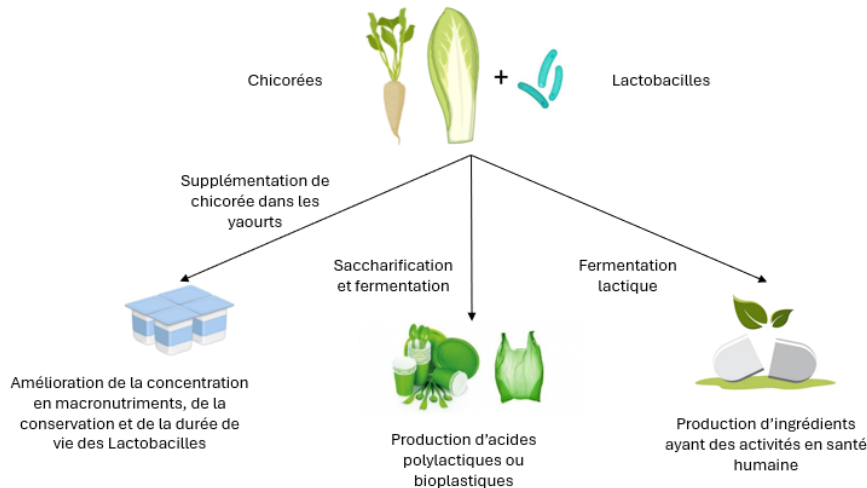


Figure 14 : Diverses utilisations de la chicorée fermentée par les Lactobacilles.

Une des voies de valorisation de la chicorée est la fermentation. Cette dernière peut se faire lors de la supplémentation de chicorée au sein des yaourts contenant des souches de *Lactobacilles* dans le but d'obtenir des molécules bioactives et organoleptiques. La fermentation de la chicorée permet également la production de PLA pouvant être utilisé comme bioplastique. Enfin la fermentation de cette matrice peut également être réalisée dans le but de développer des ingrédients santé ayant diverses activités biologiques.

Outre son utilisation en alimentation animale et pour la production de bioplastiques, la poudre de racine de chicorée est également employée en alimentation humaine. Elle est fréquemment ajoutée à des yaourts contenant des souches de *Lactobacilles* pour améliorer la production d'acides gras volatiles, de protéines et de peptides bioactifs. La chicorée permet également d'augmenter la durée de vie et de stockage des bactéries lactiques (Abd El-sattar et al., 2017). De plus, les qualités organoleptiques des yaourts, telles que la couleur, la saveur et l'arôme ne sont pas affectées, tandis que les activités biologiques de la chicorée sont conservées, ce qui permet de considérer ces yaourts comme des aliments santé (Jeong et al., 2017; Kim et al., 2017).

Bien que la chicorée soit principalement utilisée pour sa haute teneur en inuline, elle contient d'autres métabolites spécialisés aux propriétés biologiques intéressantes pour une utilisation en santé humaine. Une étude s'est ainsi intéressée à la fermentation de co-produits de chicorée, et plus précisément des feuilles d'endives rouges, par *Lactiplantibacillus plantarum* ou *L. Lentilactobacillus hilgardii*. Cette fermentation a permis l'augmentation de l'activité antioxydante par la libération de composés phénoliques (Kagkli et al., 2016).

Objectifs de la thèse

Le principal objectif de la collaboration entre l'UMRt 1158 BioEcoAgro et VF Bioscience au travers de ces travaux de thèse est de développer un ingrédient possédant des propriétés bénéfiques pour la santé humaine, tout en valorisant les co-produits de chicorée et d'endive en leur conférant une valeur ajoutée. Pour ce faire, ces co-produits ont été fermentés avec différentes souches de *Lactobacilles*, dans le but d'enrichir leur contenu en molécules bioactives et, ainsi, d'accroître leurs activités biologiques. Les activités biologiques des surnageants issus de ces fermentations ont ensuite été évaluées à l'aide de différents tests biochimiques et cellulaires.

Un autre objectif de ces travaux était d'évaluer *in vitro* l'impact de la digestion gastro-intestinale et de l'absorption intestinale sur les bioactivités des surnageants de fermentation. Cet objectif a été réalisé à l'aide du modèle de digestion *in vitro* simulant les trois premiers compartiments du tractus digestif, et d'un modèle de barrière intestinale utilisant une coculture d'entérocytes et de cellules productrices de mucus, cultivées sur insert.

Enfin, un dernier objectif consistait à caractériser ces échantillons par une approche métabolomique, afin d'identifier les molécules responsables des activités observées à la fois dans les surnageants de fermentation, les digestats et les milieux après passage de la barrière intestinale. La démarche expérimentale globale est illustrée schématiquement dans la **Figure 15**.

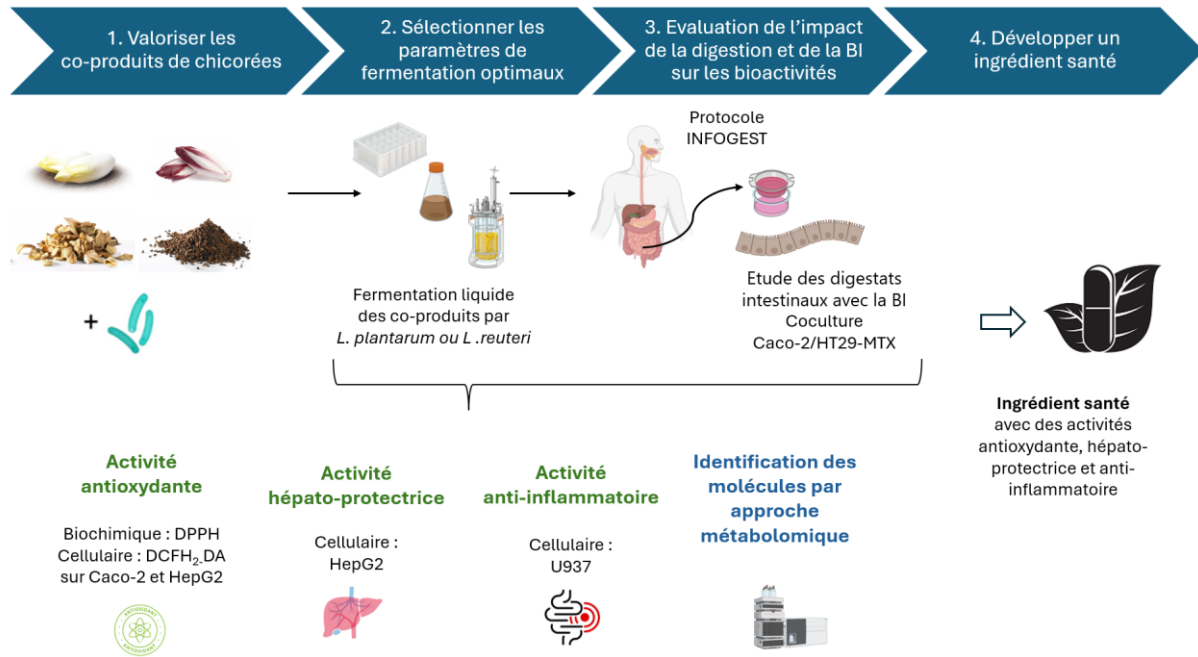


Figure 15 : Démarche expérimentale adoptée pour mener à bien les objectifs de l'étude.

Les co-produits d'endive et de chicorée ont dans un premier temps été fermentés par différentes souches de *Lactobacilles* afin de sélectionner les couples souche/co-produits et d'optimiser les paramètres de fermentation ainsi que la croissance des souches. Ensuite, les surnageants de fermentation ont été digérés *in vitro*. La phase intestinale obtenue a été mise au contact de la coculture Caco-2/HT29-MTX, simulant la barrière intestinale. Les activités biologiques des surnageants issus de la fermentation, de la digestion et des milieux récoltés dans le compartiment basolatéral de la coculture ont ensuite été mesurées. L'activité antioxydante a été évaluée sur des cellules HepG2, tandis que les activités anti-inflammatoire et hépato-protectrice ont été mesurées respectivement sur les lignées cellulaires U937 et HepG2. Enfin, une étude métabolomique a été effectuée par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (ESI-Q-TOF MS). BI : barrière intestinale.

Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Co-produits de chicorée et d'endive

Dans ce projet, quatre co-produits ont été utilisés. Deux co-produits provenant de la filière endive ont été fournis par l'APEF (Arras, France), les épluchures d'endives blanches et les épluchures de Carmines®, résultant d'un croisement entre l'endive blanche et l'endive rouge. Pour les co-produits de la filière chicorée, des fines de cossettes non torréfiées et du marc de chicorée ont été fournis par la société Leroux (Orchies, France).

1.2. Souches de *Lactobacillus* provenant de la collection de VF Bioscience

La collection de bactéries lactiques de VF Bioscience est constituée de plus de 500 souches, dont 6 sont des *L. plantarum* qui ont été choisies pour ce projet (**Table 3**). Ces souches ont été sélectionnées à partir de résultats obtenus lors d'un travail de master. Ces souches ont été isolées à partir de produits laitiers issus de 3 régions de Mongolie, les chaînes d'Altaï, la région d'Hangai et le désert de Gobi.

Table 3 : Origine et nom des souches de *Lactobacillus* utilisées durant la thèse.

Espèce	Origine	Nom
<i>L. plantarum</i>	VF Bioscience	31c
<i>L. plantarum</i>	VF Bioscience	35a
<i>L. plantarum</i>	VF Bioscience	37a
<i>L. plantarum</i>	VF Bioscience	46a
<i>L. plantarum</i>	VF Bioscience	47b
<i>L. plantarum</i>	VF Bioscience	55a
<i>L. reuteri</i>	Macération des racines de champs d'endives	RC15
<i>L. reuteri</i>	Macération des racines de champs d'endives	RC16
<i>L. reuteri</i>	Macération des racines de champs d'endives	RC18

1.3. Isolement du biote de l'endive

Des isollements du biote externe et interne de l'endive et des macérations ont été effectués à partir des endives fournies par l'APEF.

1.3.1. Co-produits de l'endive

Les co-produits utilisés pour l'isolement de souches d'intérêts (**Figure 16**) sont des endives telles qu'elles sont commercialisées (E), des racines de chicorée récoltées en champs (RC) de la variété *Baccara* et des racines après forçage de la variété *Darling* (RF). Les co-produits ont été récoltés et traités le 16 novembre 2021 à l'APEF. Préalablement aux isollements, les co-produits ont été grossièrement lavés, en particulier les racines à l'eau courante afin d'éliminer au maximum la terre contenant des micro-organismes non présents dans les racines et les endives.



Figure 16 : Photographies des co-produits utilisés pour l'isolement du biote de l'endive.

EN : endive, RF : racine après forçage, RC : racine en champs.

1.3.2. Milieux de culture

Pour cette étude, quatre milieux de culture ont été utilisés (**Table 4**). Le milieu *Potato Dextrose Agar* (PDA), permettant la croissance des levures et des champignons, le milieu *Gélose Nutritive* (GN), qui est un milieu riche, contenant des peptones et des extraits de viandes, non sélectif, permettant la croissance de nombreuses bactéries et de certains champignons. Pour le biote lactique, deux milieux ont été utilisés, le milieu MRS spécifique à la croissance des *Lactobacillus* et le milieu M17 qui est dédié aux

lactocoques et aux streptocoques. Les milieux gélosés ont été préparés et autoclavés à 121 °C pendant 20 min. Pour la croissance, les milieux PDA et GN ont été incubés à 30 °C en condition aérobie et les milieux MRS et M17 à 37 °C en condition anaérobie.

Table 4 : Composition des milieux utilisés pour l'isolement du biote de l'endive.

Composition	Concentration (g.L-1)
Milieu GN (Gélose Nutritive) – pH 7	
Peptone	5
NaCl	5
Extrait de levure	2.5
Extrait de viande	1
Agar (si solide)	15
Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) – pH 5.6	
Glucose	20
Extrait de pomme de terre	4
Agar (si solide)	15
Milieu M17 – pH 7	
Beta-glycérophosphate de sodium	19
Peptone de soja	5
Extrait de viande	5
Lactose	5
Tryptone	2.5
Peptone de viande	2.5
Extrait de levure	2.5
Acide ascorbique	0.5
Sulfate de magnésium	0.25
Agar (si solide)	15
Milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) – pH 6.2	
Glucose	20
Peptone	10
Extrait de viande	8
Acétate de sodium trihydraté	5
Extrait de levure	4
K ₂ HPO ₄	2
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium heptahydraté	0.2
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0.05
Tween 80	1 mL.L-1
Agar (si solide)	15

1.3.3. Isolement du biote externe

Pour l'isolement du biote externe, 30 g des trois co-produits, préalablement rincés à l'eau courante, ont été incubés dans 65 mL d'eau physiologique (0,85 % (p/v) NaCl) puis agités

pendant 2 min. La solution mère correspondant à l'eau physiologique résultante a été diluée successivement jusque 10^{-8} et différentes dilutions (solution non diluée, solutions diluées à 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} et 10^{-8}) ont été étalées sur les quatre milieux de culture. Les géloses ont ensuite été incubées dans les conditions précisées préalablement.

1.3.4. Isolement du biote endophyte

Pour l'isolement du biote endophyte, 30 g de co-produits ont été rincés à l'eau courante. Afin d'éliminer le biote externe présente, les co-produits ont été ensuite lavés avec une solution d'éthanol à 70 % (v/v) pendant 3 min. Après un rinçage de 3 min à l'eau physiologique stérile, les co-produits ont à nouveau été baignés dans l'éthanol pendant 30 secondes. Ils ont finalement été rincés 3 fois avec de l'eau physiologique stérile. Les co-produits ont ensuite été découpés en fines lamelles puis déposés sur les quatre géloses différentes qui ont ensuite été incubées dans les conditions précédemment décrites.

1.3.5. Macération des co-produits

Des macérations ont également été réalisées afin d'isoler spécifiquement des bactéries lactiques à partir des co-produits de racines en champs et après forçage. Pour cela, 45 g de co-produits lavés et découpés, ont été incubés dans du milieu MRS pendant 72 h à 37 °C. La macération résultante est ensuite diluée successivement jusque 10^{-8} et différentes dilutions (solution non diluée, solutions diluées à 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} et 10^{-8}) sont étalées sur gélose MRS est incubés à 37 °C en condition anaérobie.

Les différentes cultures ont été suivies pendant une semaine. Pour chaque gélose, les colonies présentant des phénotypes différents ont été isolées et repiquées sur les milieux de culture correspondants. Ce processus a été répété au moins 3 fois afin d'obtenir des souches pures. Une fois que la pureté a été atteinte, les souches ont été repiquées dans une culture liquide suivi d'un conditionnement en cryotubes dans une solution de glycérol à 25 % (v/v). Les cryotubes ont ensuite été stockés à -20 °C et à -80 °C.

1.3.6. Identification des souches

Les souches isolées des co-produits d'endive ont été identifiées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-MS. Pour cela, une ou plusieurs colonies (sur gélose) sont déposées sur chaque spot d'une plaque d'analyse suivi de l'ajout d'1 µL de matrice. Cette matrice est réalisée en diluant 10 mg d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique dans 500 µL d'acétonitrile, 475 µL d'eau et 25 µL d'acide trifluoroacétique. La plaque est ensuite analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF à l'aide d'un AutoflexSpeed (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne). Le logiciel Flexcontrol 3.4 a été utilisé. L'étalonnage du spectromètre de masse a été effectué avec le standard de test bactérien de Bruker. Pour chaque échantillon chargé, les signaux MS ont été acquis en mode linéaire positif dans la plage de 2 000 à 20 000 Da en additionnant 480 spectres de tir laser en utilisant la méthode automatique du fabricant MBT_FC.par (les valeurs de tension des sources d'ions #1 et #2 étaient respectivement réglées à 19,5 et 18,30 keV; tension de lentille = 6,9 keV; extraction pulsée = 280 nsec; intensité laser entre 40 et 60 %). Les spectres de masse ont été traités à l'aide du logiciel BioTyper (version 3.0; Bruker Daltonics) avec la base de données BDAL 11897 MSPs. L'identification confiante du genre et probable de l'espèce des micro-organismes est obtenue pour un log(score) BioTyper entre 2,0 et 2,3, tandis que seule l'identification confiante du genre est obtenue pour un log(score) BioTyper entre 1,7 et 2,0.

De plus, 8 souches dont les colonies présentent un phénotype proche de bactéries lactiques ont également été identifiées par séquençage de l'ADN 16S. Pour cela, une extraction d'ADN a été réalisée à l'aide d'un kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Etats-Unis), et la pureté de l'ADN a été contrôlée. L'identification a ensuite été effectuée par la société GenoScreen (Lille, France).

2. Méthodes

2.1. Culture des *Lactobacillus* sur des extraits d'endive ou de chicorée

2.1.1. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est constitué d'une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, de l'anglais phosphate-buffered saline) (8 g.L⁻¹ de NaCl, 1,44 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,24 g.L⁻¹ de KH₂PO₄ et 0,2 g.L⁻¹ de KCl) et 25 ou 50 g.L⁻¹ de co-produits (**Table 5**). Ces concentrations ont été choisies en fonction de leur praticité de manipulations. Le but d'utiliser un milieu aussi simple a été une exigence de la société VF Bioscience qui souhaitait déterminer si les bactéries lactiques étaient capables d'utiliser les co-produits comme seule source nutritive. Les co-produits secs, préalablement séchés à l'étuve à 60 °C, ont été broyés au blender (Perfectmix +, Tefal, Rumilly, France), et à l'aide d'un ULTRA-TURRAX® (T18® digital ULTRA-TURRAX®, IKA, Staufen, Allemagne) après l'ajout de PBS. Le milieu a ensuite été autoclavé 20 minutes à 121 °C et ajusté à pH 5 avant la fermentation.

Table 5 : Concentration des co-produits dans le PBS et abréviations utilisées

Co-produit	Abréviation	Concentration dans PBS (g.L ⁻¹)
Épluchure d'endives	EEBU	25
Épluchure de Carmines®	ECBU	25
Marc de chicorée	MCBU	50
Fines de cossettes non torréfiées	CNTBU	50

2.1.2. Sélection des co-produits : culture en deepwell

Pour la sélection des co-produits, les quatre de la filière endive et chicorée ont été fermentés par les six souches de *Lactiplantibacillus plantarum* (31c, 35a, 37a, 46a, 47b et 55a) de la collection de VF Bioscience et les 3 souches de *Limosilactobacillus reuteri* (RC15, RC16 et RC18) obtenus à partir de l'isolement du biote de l'endive.

Les cultures des différentes souches sur les co-produits ont été réalisées en Deepwells, avec un volume de culture de 5 mL. Pour cela, 4,5 mL du milieu de culture à pH 5 ont été

déposés dans chaque puits. Les précultures bactériennes ont préalablement été centrifugées 10 minutes à 12 700 x g, puis rincées à l'eau physiologique. Le culot a ensuite été repris avec 3 mL de PBS, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (PV4 Visible spectrophotometer, VWR, Radnor, États-Unis) puis les deepwells ont étéensemencés à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,3 pour chaque souche de *Lactobacillus* et leur volume complété à 500 μL avec du PBS. Les deepwells ont ensuite été incubés 72 h à 37 °C en condition anaérobie dans une étuve (Memmert, Schwabach, Allemagne). Des macérations contrôles ont également été réalisées. La première est constituée du milieu de culture sans souche afin de vérifier l'absence de croissance et de pouvoir comparer les activités avant et après culture. Le second contrôle est composé de la préculture à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,3 dans du PBS sans co-produit, le but étant de vérifier que l'activité résultante n'est pas due uniquement à la souche. Après les 72 h de culture, la croissance a été évaluée par la mesure de la variation de pH ainsi que par un dénombrement sur gélose MRS. Le contenu des deepwells a ensuite été centrifugé 10 minutes à 12 700 x g et le surnageant est conservé à -20 °C.

2.1.3. Sélection des souches : culture en fiole d'Erlenmeyer

Afin de les sélectionner, les 9 souches (31c, 35a, 37a, 46a, 47b, 55a, RC15, RC16 et RC18) ont fermentées les épluchures d'endives. Ces fermentations ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles adoptées pour les cultures en deepwells mais dans un volume final de 20 mL, c'est-à-dire avec 18 mL de milieu de culture à pH 5, et 2 mL de préculture préalablement rincée au PBS etensemencés à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 1,5. Les erlenmeyers ont ensuite été flushés à l'azote afin d'éliminer l'oxygène pour passer en condition anaérobie. Ces derniers ont été placés dans un incubateur (Multitron standard, INFORS HT, Bottmingen, Suisse) à 37 °C sous agitation (65 rpm) pendant 24 h. Comme pour les cultures en deepwell, des macérations contrôles ont été effectuées afin de comparer les activités en présence ou non des souches de *Lactobacillus*. L'évaluation de la croissance a été effectuée par mesure de la variation de pH et par un dénombrement sur gélose MRS, et les surnageants de culture ont été conservés à -20 °C pour les différents tests de bioactivités et la caractérisation par approche métabolomique.

2.1.4. Culture en bioréacteurs

Les fermentations d'épluchures d'endives en bioréacteur ont été effectuées avec les souches 31c, 46a et RC16. Pour cela, 300 mL de milieu de culture, composé de 25 g.L⁻¹ d'épluchures d'endives broyées au blender et à l'ULTRA-TURRAX® en PBS sont introduits dans le bioréacteur d'un volume maximum de 500 mL (MiniBio 500, myControl, Applikon Biotechnology, Delft, Pays-Bas) (**Figure 17**). Ces derniers ont ensuite été autoclavés 20 minutes à 121 °C. Les souches ont été préparées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, et 30 mL de chaque préculture ont été inoculés à une DO_{600 nm} de 15 afin d'obtenir une densité optique (DO) finale dans le milieu de 1,5. Durant 24 h, le pH a été maintenu à 5 grâce à des solutions de NaOH à 5 M et de H₃PO₄ à 1 M, l'agitation à 300 rpm et la température à 37 °C. Afin de réaliser les cultures en condition anaérobie, de l'azote a été injecté dans le bioréacteur de manière stérile, une sonde de mesure de l'oxygène dissous (PO₂) a été utilisée afin de vérifier que les bioréacteurs restent en condition anaérobie pendant la culture. Différents prélèvements ont été effectués à 0 h, 6 h, 19 h et 24 h, afin d'évaluer la croissance par dénombrement sur gélose MRS, les surnageants ont été conservés à -20 °C.

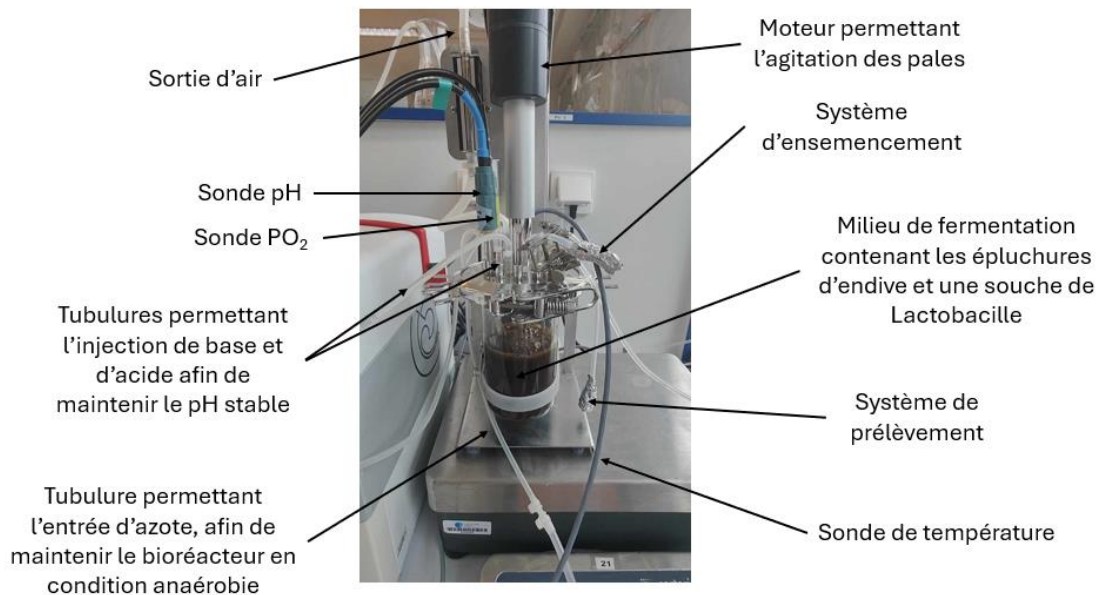


Figure 17 : Photographie annotée d'un bioréacteur en fonctionnement.

2.1.5. Amélioration des paramètres de culture

Les cultures ont été réalisées dans des fioles d'Erlenmeyer, avec un volume final de 20 mL, en suivant les conditions décrites précédemment. Les milieux de culture ont été préparés à des concentrations de 15, 25 et 35 g.L⁻¹, et les inocula bactériens ajustés à des DO_{600 nm} de 0,3 ; 1,5 ; et 3 (correspondants à 1 X, 5 X et 10 X). Des temps de culture de 0, 12, 24, 36, 48 et 72 h ont également été testés. Pour chaque condition expérimentale, des macérations témoins, sans ajout de souche bactérienne, ont été réalisées. La croissance bactérienne a été suivie par mesure de la variation de pH et par dénombrement sur gélose MRS. Les surnageants ont été stockés à -20 °C.

2.1.6. Amélioration de la croissance des *Lactobacillus*

2.1.6.1. Détermination des auxotrophies en acides aminés et en vitamines des trois souches de *Lactobacillus* sélectionnées

L'auxotrophie pour 20 acides aminés et 11 vitamines (**Table 6**) a été évaluée sur trois souches de *Lactobacillus* : 31c, 46a et RC16.

Table 6 : Acides aminés et vitamines testés pour déterminer les auxotrophies des souches de *Lactobacillus*.

Acides aminés	Vitamines
Glycine (Gly)	Biotine (B8)
Serine (Ser)	Acide pantothénique (B5)
Thréonine (Thr)	Niacine (B3)
Asparagine (Asn)	Acide folique (B9)
Glutamine (Gln)	Cobalamine (B12)
Acide glutamique (Glu)	Vitamine (K)
Acide aspartique (Asp)	Acide nicotinique (B3)
Lysine (Lys)	Pyridoxine (B6)
Arginine (Arg)	Acide aminobenzoïque (B10)
Histidine (His)	Thiamine (B1)
Cystéine (Cys)	Riboflavine (B2)
Tryptophane (Trp)	
Phénylalanine (Phe)	
Tyrosine (Tyr)	
Alanine (Ala)	
Valine (Val)	
Leucine (Leu)	
Isoleucine (Ile)	
Proline (Pro)	

Un milieu de base (MB) a été préparé : 3 g.L⁻¹ de phosphate monopotassique, 3 g.L⁻¹ de phosphate dipotassique, 6 g.L⁻¹ d'acétate de sodium, 1 g.L⁻¹ de citrate d'ammonium, 0,05 g.L⁻¹ de sulfate de manganèse, 1 g.L⁻¹ de Tween 80, 1 g.L⁻¹ de sulfate de magnésium et 7,5 g.L⁻¹ d'agar. Ce milieu a été autoclavé pendant 20 minutes à 121°C. Des solutions de glucose (10 g.L⁻¹), de sulfate de fer (20 g.L⁻¹, ajusté à pH 2), d'acides aminés (10 g.L⁻¹) et de vitamines (100 g.L⁻¹) ont été filtrées sur une membrane de 0,2 µm avant d'être ajoutées au milieu autoclavé. La croissance des souches sur ce milieu complet a d'abord été vérifiée avant de procéder aux tests d'auxotrophies, dans lesquels le milieu de base était préparé en omettant un acide aminé ou une vitamine. Des précultures ont été préparées avec un

inoculum de 10 % (v/v) et incubées pendant 24 h à 37°C. Après incubation, les cultures ont été centrifugées durant 10 minutes à 12 700 x g et lavées avec du PBS. L'absorbance a ensuite été mesurée à 600 nm avant l'inoculation. Les boîtes de Pétri ont ensuite étéensemencées en duplicata par inondation pour obtenir une concentration finale de 2.10^5 UFC.mL⁻¹. Les géloses ont été incubées à 37 °C en condition anaérobie, et la croissance a été observée après 48 h d'incubation afin de déterminer si les souches étaient capables de se développer en l'absence d'un acide aminé ou d'une vitamine spécifique.

2.1.6.2. *Amélioration de la croissance des Lactobacillus en milieu simple complétementé*

Pour optimiser le milieu de culture et améliorer la croissance des *Lactobacillus*, des suivis de croissance ont été réalisés en milieu MB contenant uniquement des sources de carbone et d'azote minéral. La croissance des souches 31c, 46a et RC16 a été comparée en fonction de l'ajout d'extrait de levure à 2 et 4 g.L⁻¹, ainsi qu'en fonction de la préculture utilisée, MB ou MRS. Pour cela, des erlenmeyers contenant 18 mL de milieu et 2 mL de préculture réalisée en milieu MB ou en milieu MRS (avec une DO_{600nm} de 0,15) ont été inoculés. Les cultures ont été incubées pendant 24 h à 37 °C en condition anaérobie et sous agitation à 95 rpm. Des témoins en milieu MRS ont également été réalisés pour comparer les résultats avec les milieux supplémentés. La croissance a été suivie par des mesures de la DO_{600 nm} à 0, 4, 8, et 24 h, tandis que les mesures de pH ont été réalisées après 24 h.

2.1.6.3. *Amélioration de la croissance des Lactobacillus par complémentation du milieu de fermentation composé d'épluchures d'endives*

Les fermentations d'épluchures d'endives à 25 g.L⁻¹ par les souches 31c, 46a et RC16, ont été effectuées avec un inoculum à une DO_{600 nm} de 0,3, en erlenmeyer pour une durée de 24 h, en condition anaérobie et sous agitation. Les précultures ont été réalisées en milieu MRS et le milieu de fermentation a été supplémenté en extrait de levure à 2 et 4 g.L⁻¹. Cependant, le milieu utilisé pour ces cultures ne contenait pas de glucose, obligeant les souches à utiliser les épluchures d'endives comme source principale de carbone. La

croissance des souches a été évaluée par des dénombrements sur gélose MRS à 0, 8 et 24 heures.

2.1.7. Mesure de l'activité antioxydante par la méthode DPPH

Ce test colorimétrique DPPH (Sigma Aldrich, Saint-Louis, États-Unis) a été réalisé en microplaque à l'aide d'une gamme (0 ; 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 et 1000 μM) de 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique (Trolox) (Sigma Aldrich, Saint-Louis, États-Unis) connue pour son activité antioxydante. Dans cette microplaque, 10 μL de Trolox ou des échantillons ont été déposés et 190 μL d'une solution de DPPH à 4 g.L^{-1} ayant une absorbance de $0,8 \pm 0,1$ à 517 nm ont été ajoutés. La plaque a ensuite été incubée 6 minutes à l'obscurité et à température ambiante, puis lue à 517 nm (Beaudor et al., 2023). L'ensemble des dilutions de cette expérience ont été réalisées en éthanol pur. Afin de palier à la coloration des échantillons, un contre dosage constitué d'échantillon et d'éthanol a été lu à 517 nm et soustrait à la valeur obtenue avec la DPPH. L'effet antioxydant a été calculé en équivalent Trolox en fonction de la droite de calibration obtenue à partir de la gamme étalon de Trolox.

2.1.8. Conditions de culture des lignées cellulaires

L'ensemble des expériences réalisées sur cellules ont été menées en utilisant des lignées cellulaires hépatiques et intestinales humaines, ainsi que des macrophages humains : des cellules de carcinome hépatocyttaire humain caucasien HepG2, des cellules de carcinome colorectal humain Caco-2 et des cellules monocytoïdes humaines (numéros d'accession ECACC : 85011430, 86010202 et 85011440, respectivement) achetées chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Les cellules ont été cultivées dans des flasques de 75 cm^2 (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne) à 37 °C avec 5 % de CO_2 , en utilisant un milieu de culture Dulbecco modifié (DMEM) (PAN Biotech, Aidenbach, Allemagne) pour les HepG2 et Caco-2, et en Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) (Dominique Dutscher, Bruxelles, Belgique) pour les U937, supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum bovin fœtal inactivé par la chaleur (SVF), 100 U.mL^{-1} de pénicilline et streptomycine, ainsi que 2 mM de L-glutamine, formant ainsi le milieu de culture complet (Pouille et al., 2022).

Les cellules Caco-2, HepG2 et U937 sont passées respectivement une, deux ou trois fois par semaine.

2.1.9. Analyse de la cytotoxicité

La viabilité cellulaire a été évaluée dans chaque lignée cellulaire afin de s'assurer que la cytotoxicité des échantillons n'interfère pas avec les tests. Le test de cytotoxicité a été réalisé dans des plaques de 96 puits, avec des cellules Caco-2, HepG2 ou U937ensemencées à des densités respectives de 8 000, 60 000 et 150 000 cellules par puit. Elles ont été incubées à 37 °C entre 24 h et 5 jours avant les tests. Après incubation, le milieu a été retiré, les cellules ont été lavées, et 100 µL d'échantillons ont été ajoutés à chaque puits. Les plaques ont été incubées pendant une période définie à 37 °C. Après incubation, les échantillons ont été retirés et 100 µL de solution Cell Counting Kit-8 (CCK8) à une concentration de 5 % ont été ajoutés à chaque puits, suivi d'une incubation de 1 h 30 à 37 °C. L'absorbance a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques SpectraMax® iD3 (Molecular Devices, San José, CA, États-Unis), et la viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage par rapport à la condition témoin contenant uniquement du DMEM.

2.1.10. Mesure de l'activité antioxydante par la méthode au DCFH₂-DA

La capacité antioxydante des échantillons a été testée sur des cellules hépatiques HepG2 et intestinales Caco-2 (**Figure 18**), ensemencées à respectivement 60 000 et 8 000 cellules par puits dans des plaques noires à 96 puits.

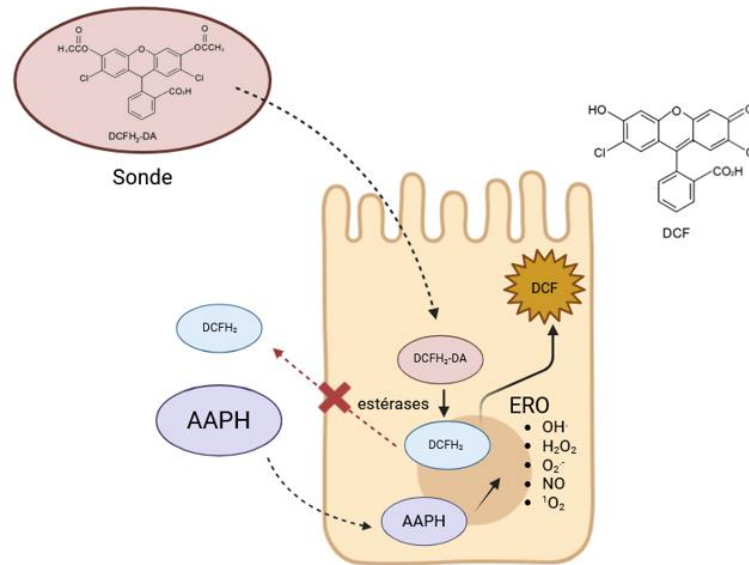


Figure 18 : Mécanisme intracellulaire de l'oxydation induite par l'AAPH sur la $DCFH_2-DA$.

La sonde est internalisée par les cellules et transformée par les estérases en $DCFH_2$. La présence d'ERO induit par l'AAPH convertit la $DCFH_2$ en DCF qui émet une fluorescence permettant ainsi de les quantifier. AAPH : 2,2'-azobis-2-méthyl-propanimidamide, dihydrochloride, ERO : espèces réactives de l'oxygène, sonde : $DCFH_2-DA$.

Après la période d'incubation nécessaire, le milieu a été éliminé des puits, et 100 μL de $DCFH_2-DA$ (Biotium, Fremont, États-Unis) à 25 μM ont été déposés dans chaque puits. La plaque a ensuite été incubée pendant 30 minutes à 37 °C à l'abri de la lumière. Le $DCFH_2-DA$ a été ensuite retiré, et les cellules ont été lavées avec du tampon Hank's Balanced Salt Solution Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Biowest, Nuillé, France) afin d'éliminer l'excès de sonde qui pourrait biaiser les résultats. Ensuite, 50 μL de quercétine (TargetMol, Wellesley, États-Unis) à 200 μM , utilisée comme contrôle positif ou d'échantillon à la concentration choisie ont été ajoutés. Avant la lecture des plaques, 50 μL de 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) (AAPH) (Sigma Aldrich, Saint-Louis, États-Unis) à 1,2 mM ou du HBSS pour les puits témoins, ont été ajoutés dans chaque puits. Les résultats ont été exprimés en comparaison au contrôle. La fluorescence (excitation à 485 nm et émission à 535 nm) a ensuite été mesurée, et la production d'ERO a été exprimée en fonction du témoin (**Figure 19**).

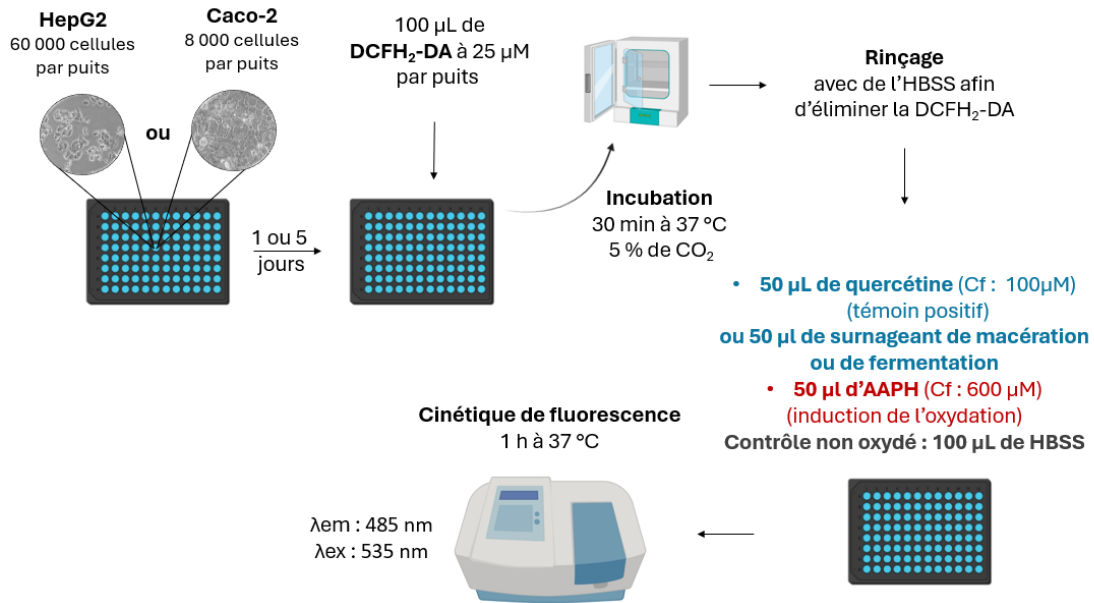


Figure 19 : Protocole permettant de déterminer l'activité antioxydante cellulaire.

L'activité antioxydante cellulaire peut être mesurée sur différentes cellules comme les HepG2 ou les Caco-2. La DCFH₂-DA, qui est une sonde, mise au contact des cellules durant 30 minutes afin d'être internalisée. Après cette incubation, les cellules sont rincées afin d'éliminer les molécules de DCFH₂-DA non internalisée. Les cellules sont ensuite mises au contact de 50 µL de quercétine ou d'échantillons, 50 µL d'AAPH sont ensuite ajoutés afin d'oxyder les cellules. Un contrôle non oxydé est également réalisé sans AAPH. Une cinétique de fluorescence est effectuée pendant une heure à 37 °C. Les résultats sont exploités en prenant la pente de l'échantillon par rapport à la pente de la condition contrôle. AAPH : 2,2'-azobis-2-méthyl-propanimidamide, dihydrochloride, Cf : concentration finale.

2.1.11. Détermination de l'activité hépato-protectrice

Un test d'activité hépato-protectrice a été développé sur des cellules HepG2 pour évaluer la capacité des surnageants de culture à protéger ces cellules contre un stress induit par l'éthanol. Dans un premier temps, ce test a été mis au point et la concentration cytotoxique optimale d'éthanol de 1,9 mM a été retenue afin d'induire un stress cellulaire sans provoquer de mortalité. Des molécules antioxydantes telles que la vitamine C, le Trolox et la quercétine ont été testées pour déterminer leur cytotoxicité et leur capacité à améliorer la viabilité des cellules exposées à l'éthanol. La quercétine a finalement été choisie comme témoin positif. Les cellules HepG2 ont été ensemencées la veille du test à une concentration de 60 000 cellules par puits. Après 24 h, le milieu a été remplacé, et 50 µL d'échantillons ou de quercétine (Cf : 100 µM) ainsi que 50 µL d'éthanol (Cf : 1,9 mM) ont été ajoutés aux puits. La microplaque a été incubée 2 h à 37 °C. Après incubation, afin d'évaluer la viabilité cellulaire, les puits ont été lavés avec 100 µL de PBS, puis 100 µL de

réactif CCK8 à 5 % ont été ajoutés. La lecture de l'absorbance a été effectuée à 450 et 650 nm après 1 h 30 d'incubation à 37 °C (**Figure 20**).

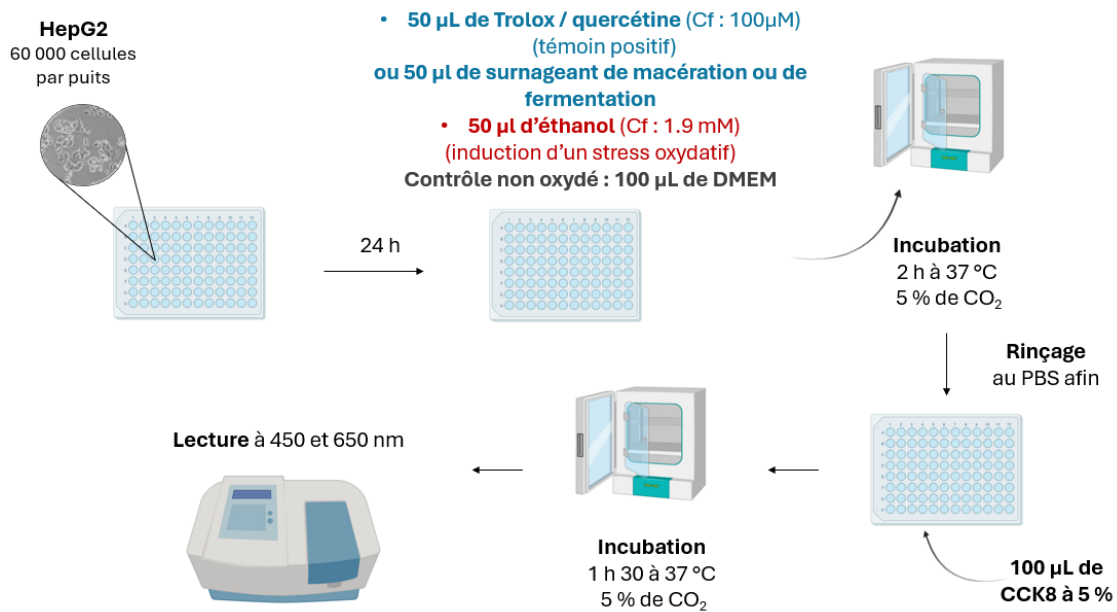


Figure 20 : Protocole permettant de déterminer l'activité hépato-protectrice sur les cellules HepG2.

L'activité hépato-protectrice est évaluée en mettant de l'éthanol (Cf : 1,9 mM) au contact des cellules HepG2 afin d'induire un stress oxydatif. Une quantité de 50 µL de quercétine ou d'échantillon sont ajoutés, puis les cellules sont incubées pendant 2 heures à 37 °C. Les cellules sont ensuite rincées au PBS et 100 µL de CCK8 sont ajoutés afin de mesurer la viabilité cellulaire qui sera lue à 450 nm après 1 h 30 d'incubation à 37 °C. Cf : concentration finale.

2.1.12. Détermination de l'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée en utilisant des cellules U937, qui ont été différenciées en macrophages à l'aide de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) à une concentration de 610 µg.L⁻¹ pendant 2 jours. Le milieu de culture a été remplacé tous les 2 jours et les cellules ont été lavées au PBS pour éliminer l'excédent de PMA. Le test d'activité a été réalisé une semaine après la différenciation des cellules en macrophages. Les cellules différenciées sont récoltées, centrifugées à 327 x g pendant 5 minutes, et comptées à l'aide d'un compteur LUNA. Une suspension cellulaire de 2 millions de cellules par puits a ensuite été préparée et déposée dans des plaques de 12 puits, puis incubée pendant 30 minutes à 37 °C. Après incubation, 250 µL de LPS (Sigma, St Louis, États-Unis) à 200 µg.mL⁻¹ ont été ajoutés dans les puits, à l'exception du puits témoin qui ne contenait que du DMEM. Ensuite, 250 µL de dexaméthasone (à 80 µM) ou d'échantillons à la concentration choisie ont été ajoutés dans les autres puits.

Les plaques ont ensuite été incubées pendant 4 h à 37 °C. Le contenu des puits a ensuite été récupéré, centrifugé durant 10 minutes à 8 000 g à 4 °C, puis les surnageants ont été congelés à -20 °C pour l'analyse des niveaux de TNF- α et des interleukines 8 et 10 par méthode ELISA (**Figure 21**).

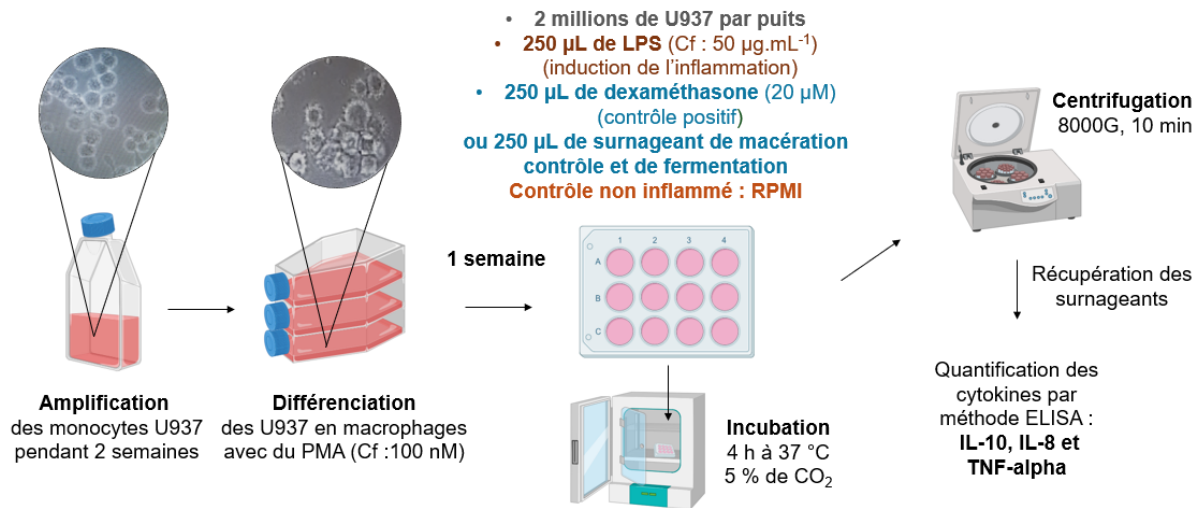


Figure 21 : Protocole permettant de déterminer l'activité anti-inflammatoire sur les cellules U937.

Les cellules U937 sont tout d'abord amplifiées pendant deux semaines, puis différenciées en macrophages à l'aide d'une solution de PMA à 100 nM en flasque. Après une semaine de différenciation, les macrophages sont mis en plaque à une concentration de deux millions de cellules par puits. Afin d'inflammer les cellules, 250 μ L de LPS (Cf : 50 μ g.mL⁻¹) sont ajoutés dans chaque puits. La dexaméthasone à 20 μ M, ainsi que les surnageants de macération et de fermentation sont ajoutés. Un contrôle non inflammé est également réalisé avec du RPMI. Les plaques sont ensuite incubées 4 h à 37 °C sous 5 % de CO₂, et les surnageants cellulaires sont ensuite récupérés afin de réaliser la quantification des cytokines par méthode ELISA. LPS : lipopolysaccharide, Cf : concentration finale, ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, IL : interleukines, TNF- α : Tumor Necrosis Factor α .

2.2. Devenir des surnageants de fermentation dans le tractus gastro-intestinal

2.2.1. Digestion gastro-intestinale simulée *in vitro*

Afin d'étudier le devenir des bioactivités des surnageants de culture dans le tractus digestif, une digestion gastro-intestinale simulée (DGIS) *in vitro* a été réalisée selon le protocole de digestion statique harmonisé par INFOGEST (Brodkorb et al., 2019), reproduisant les conditions de la bouche, de l'estomac et de l'intestin. Ce protocole a été appliqué à l'ensemble des cultures effectuées en bioréacteur (**Figure 22**). Les

surnageants de culture ont été concentrés à 250 g.L^{-1} , pendant la nuit à $30 \text{ }^\circ\text{C}$, à l'aide d'un évaporateur centrifuge (miVac Quatro Concentrator, Genevac, Ipswich, Royaume-Uni). Une fois concentrés, 2 mL des surnageants ont été introduits dans un bioréacteur maintenu à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ sous agitation magnétique. Pour la phase salivaire, 1,6 mL de fluide salivaire, 10 μL de CaCl_2 et 190 μL d'eau ont été ajoutés au réacteur, suivi d'un ajustement du pH à 7 à l'aide de NaOH et d'HCl. Ensuite, 200 μL d'amylase (Sigma, St Louis, États-Unis) à 75 U.mL^{-1} ont été incorporés, puis le pH ajusté à 7. Après 2 à 5 minutes de cette phase, 3,2 mL de fluide gastrique, 2 μL de CaCl_2 et 398 μL ont été ajoutés. Le pH est abaissé à 3, puis 200 μL de lipase (Sigma, St Louis, États-Unis) à 60 U.mL^{-1} et de pepsine (Sigma, St Louis, États-Unis) à $2\,000 \text{ U.mL}^{-1}$ ont été ajoutés, avec un ajustement final du pH à 3. Après 2 h de digestion gastrique, 1 mL de contenu a été prélevé du bioréacteur afin d'évaluer l'impact de cette phase sur le profil peptidique par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et Chromatographie liquide à haute performance couplé à la spectrométrie de masse (HPLC-MS, de l'anglais High-Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry). La phase intestinale a débuté avec l'ajout de 2,975 mL de fluide intestinal, 14 μL de CaCl_2 et 2,261 mL d'eau, suivi d'un ajustement du pH à 7. Ensuite, 1,75 mL de pancréatine (Sigma, St Louis, États-Unis) à 100 U.mL^{-1} (activité de la trypsine) ont été ajoutés, et le pH réajusté à 7. Après 2 h de digestion intestinale, la phase intestinale a été chauffée à $95 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 10 minutes afin d'inactiver les enzymes digestives. Des aliquots de digestats ont ensuite été réalisés et conservés à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Une digestion dite « blanche » a également été effectuée : dans cette condition contrôle, les 2 mL de surnageant de culture ont été remplacés par 2 mL d'eau, afin de vérifier que les activités biologiques observées ne proviennent pas seulement de l'hydrolyse des enzymes digestives.

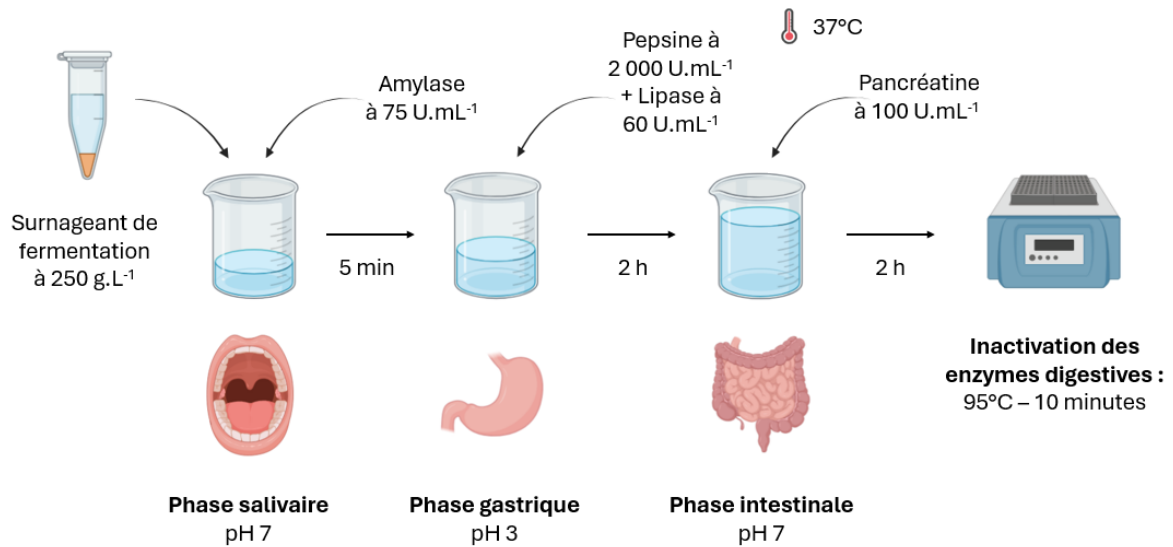


Figure 22 : Schéma de la digestion gastro-intestinale simulée in vitro des surnageants de fermentation.

Les surnageants de fermentation concentrés à 250 g.L^{-1} sont introduits dans un bioréacteur maintenu à 37°C où l'amylase à 75 U.mL^{-1} est ajoutée au fluide salivaire et le pH est ajusté à 7. Après 5 minutes, la phase gastrique est déclenchée par l'ajout de la pepsine à $2\,000 \text{ U.mL}^{-1}$ et de la lipase à 60 U.mL^{-1} ainsi que l'ajustement du pH à 3. Après deux heures de phase gastrique, le fluide intestinal ainsi que la pancréatine à 100 U.mL^{-1} sont ajoutés, le pH est de nouveau ajusté à 7. Une fois la phase intestinale effectuée, le contenu des bioréacteurs est récupéré et chauffé à 95°C pendant 10 minutes afin d'inactiver la pancréatine.

2.2.2. Interactions des digestats avec un modèle de barrière intestinale

Afin de déterminer les effets des digestats de surnageants de fermentation sur la barrière intestinale, un modèle de coculture de cellules différenciées (Caco-2/HT29-MTX) a été utilisé, reproduisant les propriétés de la barrière intestinale humaine. Cette coculture a étéensemencée sur des inserts de $3 \mu\text{m}$ de porosité, avec un total de 20 000 cellules par insert, selon un ratio de 90% Caco-2 et 10% HT29-MTX. Un volume de 1 mL de suspension cellulaire a été déposé dans la partie apicale de chaque insert, tandis que 2 mL de milieu de culture DMEM ont été placés dans le compartiment basolatéral (Fleury et al., 2022).

2.2.2.1. Vérification de l'intégrité de la barrière intestinale

Pour évaluer l'intégrité de la coculture Caco-2/HT29-MTX, la résistance électrique transépithéliale (TEER) a été mesurée à l'aide d'un ohmmètre (Epithelial Volt-Ohm Meter, Millicell®, Burlington, États-Unis). Les mesures de TEER ont été effectuées tous les 2 jours après une semaine d'incubation. Le jour de l'expérimentation, la TEER a été mesurée

avant et pendant le contact des échantillons avec la coculture. La TEER, dépendante du milieu de culture, a été utilisée comme indicateur d'intégrité de la barrière, et une valeur supérieure à $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ indique une barrière fonctionnelle (Ude et al., 2017), tandis qu'une valeur trop élevée pourrait révéler la formation de multicouches cellulaires (Fleury et al., 2022).

2.2.2.2. Incubation des échantillons avec le modèle de barrière intestinale

Trois semaines après l'ensemencement, les puits présentant une barrière intacte ($\text{TEER} > 500 \Omega \cdot \text{cm}^2$) ont été sélectionnés pour l'étude du passage de la barrière (**Figure 23**). Le milieu de culture a été retiré, puis 2 mL de tampon Hepes-Buffered Hank's Balanced Salt Solution (HBBS), composé de HBSS complété avec $4,76 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique (HEPES), ont été ajoutés dans le compartiment basolatéral et 1 mL dans le compartiment en apical. Les inserts ont ensuite été incubés à 37°C pendant 30 minutes. Après cette incubation, le compartiment apical a été vidé, et 1 mL de digestat dilué au $\frac{1}{2}$ a été déposé. Les plaques ont été incubées pendant 2 h à 37°C , et des mesures de TEER ont été prises à 15, 30, 60 et 120 minutes pour suivre les éventuels changements de perméabilité. Enfin, les milieux apicaux et basolatéraux ont été prélevés et stockés à -20°C pour des analyses ultérieures.

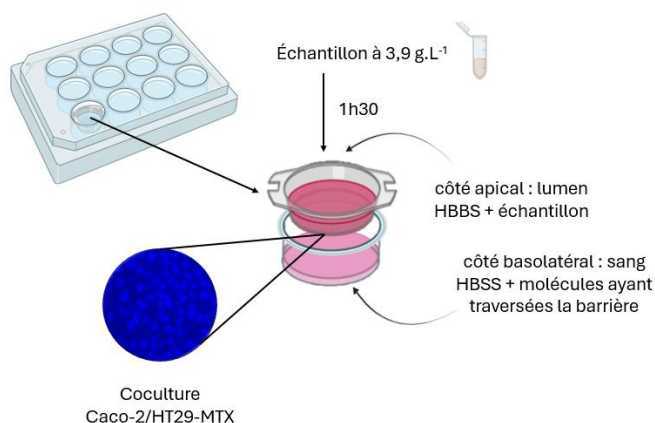


Figure 23 : Schéma illustrant le modèle de barrière intestinale réalisé à l'aide de la coculture Caco-2/HT29-MTX.

Afin d'évaluer le passage des molécules au travers de la barrière intestinale, les surnageants de digestion sont mis au contact de la coculture Caco-2/HT29-MTX à une concentration de $3,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ pendant 1 h 30. Après incubation, le contenu du compartiment basolatéral est récupéré afin d'effectuer les tests de bioactivités ainsi que la caractérisation métabolomique.

2.2.2.3. Évaluation de la perméabilité apparente (P_{app}) par Lucifer Yellow

La perméabilité paracellulaire de la barrière intestinale a été évaluée en utilisant la molécule fluorescente *Lucifer Yellow* (Biotium Fremont, États-Unis), détectée par spectrophotométrie de fluorescence. Cette molécule traverse la barrière via les jonctions serrées, permettant ainsi d'évaluer la perméabilité après contact avec les échantillons. Pour cela, 1 mL de *Lucifer Yellow* à une concentration de 100 μM a été ajouté dans le compartiment apical, et 2 mL de tampon HBSS dans le compartiment basolatéral. Les inserts ont été incubés à 37 °C, et des échantillons ont été prélevés à 0, 15, 30, 60 et 80 minutes, puis déposés dans une microplaque noire pour la mesure de fluorescence (λ_{ex} : 485 nm, λ_{em} : 530 nm). Une gamme standard de *Lucifer Yellow* allant de 0 à 12,5 μM a été réalisée en parallèle. La perméabilité apparente (P_{app}) a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$P_{app} (\text{cm.s}^{-1}) = dQ/dt \times 1/(A \times C_0)$$

dQ/dt est le taux de passage (pente de la régression linéaire de la concentration de Lucifer Yellow en fonction du temps dans le compartiment basolatéral), A est la surface de l'insert (0,9 cm^2), C_0 est la concentration initiale de Lucifer Yellow (100 μM). Un insert est considéré comme intègre si sa perméabilité apparente est inférieure à $10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$, d'après Tenenbaum et al., (2024).

2.2.2.4. Évaluation de la confluence et de la présence éventuelle de multicouches cellulaires

Pour évaluer la confluence et la présence éventuelle de multicouches cellulaires, la coloration au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (Fluoroshield with DAPI, Sigma Aldrich, Saint-Louis, États-Unis) a été utilisée. Le DAPI est un fluorochrome qui se fixe à l'ADN double brin et permet de visualiser le noyau des cellules, facilitant ainsi l'identification de multicouches lorsque les noyaux ne sont pas situés sur un même plan. Pour cette manipulation, des inserts spécifiques ont été préparés. Après avoir éliminé les milieux apical et basolatéral, l'insert a été rincé avec du PBS froid, puis découpé. Une goutte de colorant DAPI a été déposée sur une lame, suivi du dépôt de l'insert (cellules orientées vers le haut) sur la goutte. Une lamelle a ensuite été placée sur l'insert pour l'observation au microscope à fluorescence (Dussert, 2020).

2.3. Caractérisation biochimique des échantillons par chromatographie et spectrométrie de masse

2.3.1. Caractérisation des polyphénols par HPLC

L'analyse des polyphénols présents dans les surnageants de fermentation a été réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) à l'aide d'un système HPLC Prominence (Shimadzu, Duisburg, Allemagne). Ce système est équipé d'une pompe quaternaire (LC-20AD), d'une colonne Kinetex PFP (100 × 4,6 mm, 2,6 µm, Phenomenex, Macclesfield, Royaume-Uni) et d'un détecteur à barrette de diodes (PDA) UV-visible (SPD-20A). Pour chaque analyse, 10 µL de surnageant de fermentation ont été injectés dans le système HPLC. La phase mobile était composée d'un gradient d'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B), avec 0,1 % d'acide orthophosphorique. Un débit de 1,1 mL.min⁻¹ et à une température de 45 °C ont été maintenus. Le gradient de solvant B a augmenté de 5 à 20 % en 6 minutes, puis a été maintenu pendant 1 minute. Il a de nouveau été augmenté à 25 % après 8 minutes. Par la suite, il a atteint 70 % à 12 minutes et a été maintenu pendant 1 minute. Ensuite, il est redescendu à 5 % à 14 minutes pour finalement être maintenu durant 7 minutes. Afin d'identifier les composés phénoliques des différents coproduits fermentés et non fermentés, les standards suivants ont été utilisés : l'acide 3,4-dicaféoylquinique, l'acide 3,5-dicaféoylquinique, l'acide caféique, l'acide chicorique, l'acide chlorogénique, l'acide néochlorogénique, l'acide caftarique et l'acide 4-O-caféoylquinique. Des gammes de concentrations comprises entre 2 et 50 µg·mL⁻¹ ont été établies pour l'ensemble des acides phénoliques, à l'exception des acides chicorique et caftarique, pour lesquels les gammes étaient comprises entre 10 et 200 µg·mL⁻¹.

2.3.2. Caractérisation des échantillons par approche métabolomique

Les surnageants de culture, produits à la fois en erlenmeyer et en bioréacteur, ainsi que les échantillons obtenus après DGIS et passage de la barrière intestinale, ont été caractérisés par spectrométrie de masse. Pour ce faire, les échantillons ont été dilués au ¼ et 5 µL ont été injectés dans une colonne Kinetex® F5 Core-Shell (1,7 µm, 100 x 2,1 mm, 100 Å) connectée à un système chromatographique UHPLC Dionex Ultimate 3000

(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, États-Unis). Le système était couplé à un détecteur à barrette de diodes et à un détecteur de masse (ESI-Q-TOF-MS Impact II, Bruker Daltonics, Champs-sur-Marne, France). Les analyses ont été effectuées en mode d'ionisation positif et négatif. La phase mobile utilisée pour l'analyse était constituée d'un gradient d'eau acidifiée (0,1 % d'acide formique) (solvant A) et de MeOH acidifié (0,1 % d'acide formique) (solvant B) avec un débit constant de 0,4 mL.min⁻¹. Le gradient de solvant B était de 20 % les deux premières minutes, puis il a atteint 80 % après 15 minutes et a été maintenu durant 3 minutes. Par la suite, le solvant B a atteint 100 % à 23 minutes et a été maintenu pendant 2 minutes. Enfin, le solvant B a diminué pour atteindre 20 % après 27 minutes, et ce pour les 3 dernières minutes. L'exploitation des données a été réalisée à l'aide des logiciels MetaboScape et DataAnalysis.

Le logiciel MetaboScape est un outil complet de traitement des données de spectrométrie de masse, développé par la société Bruker. Ce logiciel permet la création de buket tables représentant toutes les masses mono-isotopiques présentes dans l'échantillon à partir des données brutes, en s'appuyant sur plus de 50 paramètres optimisés pour la recherche de molécules de petites masses molaires. Une fois cette étape réalisée, une interrogation de bases de données spectrales (MassBank, GNPS, BERKELEY-LAB, Plant Metabolites, Mona in silico et expérimental, Pharmaceuticals, NPASS, Antibase et Norine) ou de masses moléculaires est effectuée. En cas d'absence de correspondance dans ces bases de données, le logiciel permet aussi d'attribuer une formule brute à chaque masse mono isotopique en se basant sur l'empreinte spectrale et le calcul strict de la masse mono isotopique. Le logiciel DataAnalysis (Bruker) permet, par la suite, d'extraire les profils UV, les chromatogrammes du pic de base, ainsi que les spectres MS/MS, afin de vérifier que la structure des molécules correspondantes dans les bases de données est bien en accord avec le spectre de fragmentation.

2.4. Analyses en composantes principales et factorielle multiple

Une analyse en composantes principales (ACP) ainsi qu'une analyse factorielle multiple (AFM) ont été réalisées afin de déterminer les co-produits et les souches de *Lactobacillus* à conserver pour le projet. Afin de cribler les co-produits de chicorée et d'endive, les paramètres suivants ont été pris en compte : l'évaluation de la croissance par

acidification, l'évaluation de la croissance par dénombrement, l'activité hépato-protectrice évaluée sur les cellules HepG2, l'activité antioxydante mesurée par la méthode DPPH, et le contenu en acides phénoliques obtenus par HPLC. Pour l'ACP permettant de cribler des souches de *Lactobacillus*, les paramètres pris en compte sont les suivants : l'évaluation de la croissance par acidification, l'évaluation de la croissance par dénombrement, l'activité antioxydante évaluée sur les cellules HepG2 et Caco-2, l'activité hépato-protectrice mesurée sur les cellules HepG2, ainsi que le contenu en acides phénoliques obtenus par HPLC. Les ACP et AFM ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R core team, 2016, Vienne, Autriche), en utilisant le package R Commander (Fox, 2005) et son plug-in FactoMineR (Lê et al., 2008).

2.5. Statistiques

Au moins trois réplicats biologiques ont été réalisés pour l'ensemble des fermentations. Concernant les activités antioxydantes, deux réplicats biologiques et trois réplicats techniques ont été réalisés pour chaque réplicat biologique de fermentation. Pour l'activité anti-inflammatoire, deux réplicats biologiques ont été effectués. En ce qui concerne les digestions, trois réplicats biologiques ont été effectués. Les passages de barrière ont été réalisés avec trois réplicats biologiques, chacun étant analysé à l'aide de trois réplicats techniques. Ces réplicats biologiques provenaient des fermentations menées en bioréacteurs. Les trois réplicats techniques issus des compartiments basolatéraux ont ensuite été regroupés pour les analyses biologiques et métabolomiques. Concernant les études métabolomiques, trois réplicats biologiques et trois réplicats techniques ont été effectués pour chaque réplicat biologique de fermentation, de digestion et des compartiments basolatéraux des cocultures Caco-2/HT29-MTX.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9.0.2. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm écarts-types. Un test de normalité a d'abord été effectué afin d'évaluer la distribution des données. Si les données suivaient une distribution normale, alors un test d'ANOVA à un facteur (One-way ANOVA) a été réalisé, suivi d'un test post-hoc de Tukey ou de Dunnett, selon les comparaisons à effectuer. En revanche, si les données ne suivaient pas une distribution normale,

le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été appliqué, suivi d'un test de Dunn pour les comparaisons multiples. Tous les tests statistiques ont été réalisés avec un seuil de significativité fixé à $p < 0,05$.

Résultats

1. Isolement du biote de l'endive

L'isolement des souches à partir des co-produits d'endive a permis d'obtenir un total de 36 souches. Ces dernières ont d'abord été isolées par observation macroscopique, et leur identification a été réalisée par profilage via la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-MS. Par la suite, une deuxième identification des bactéries lactiques a été effectuée à l'aide du séquençage du gène codant pour l'ARN 16S, ce dernier a été effectué par la société GenoScreen. Grâce à ces analyses, le genre et l'espèce de 16 souches ont été identifiés de manière fiable, tandis que seul le genre a pu être déterminé de façon certaine pour 10 souches supplémentaires. Pour les 10 espèces fongiques cultivées sur milieu PDA, l'identification n'a pas encore été réalisée.

Les feuilles d'endives sont les produits ayant permis d'isoler le plus petit nombre de souches, avec un total de sept (**Table 7, EN1 à EN7**), dont quatre provenant du biote externe et trois du biote endophyte. Cinq souches ont été isolées sur le milieu GN et deux sur le milieu M17. L'identification des souches par profilage MALDI-TOF-MS, couplée à la comparaison bio-informatique des spectres de masse expérimentaux avec ceux de la base de données MBT, a conduit à identifier le genre et l'espèce de trois souches : *Raoultella terrigena*, *Streptococcus mitis* et *Staphylococcus hominis*, ainsi que le genre uniquement pour deux souches : *Pantoea agglomerans* et *Micrococcus luteus*.

Table 7 : Collection issue des co-produits d'endive (var. Darling et Baccara).

Souche	Source	Milieu	Identification	Origine
EN1	Biote externe	GN	<i>Raoultella terrigena</i>	Feuilles d'endive
EN2	Biote externe	GN	<i>Streptococcus mitis</i>	
EN3	Biote externe	GN	<i>Pantoea agglomerans</i>	
EN4	Biote endophyte	GN	X	
EN5	Biote endophyte	GN	<i>Staphylococcus hominis</i>	
EN6	Biote externe	M17	<i>Micrococcus luteus</i>	
EN7	Biote endophyte	M17	X	
RF1	Biote externe	GN	<i>Lelliottia amnigena</i>	Racine d'endive après forçage
RF2	Biote externe	GN	<i>Pseudomonas sp.</i>	
RF3	Biote externe	GN	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	
RF4	Biote endophyte	GN	<i>Bacillus mycoides/cereus</i>	
RF5	Biote endophyte	GN	<i>Priestia megaterium</i>	
RF6	Biote externe	M17	<i>Citrobacter gillenii</i>	
RF7	Biote endophyte	M17	<i>Bacillus licheniformis</i>	
RF8	Biote externe	GN	<i>Pantoea agglomerans</i>	
RF9	Biote externe	PDA	X	
RF10	Biote externe	PDA	X	
RF11	Biote externe	PDA	X	
RC1	Biote externe	GN	<i>Bacillus cereus/mycoides</i>	Racine d'endive en champs
RC2	Biote externe	GN	<i>Bacillus mycoides</i>	
RC3	Biote externe	GN	<i>Rahnella aquatilis</i>	
RC4	Biote externe	GN	<i>Pseudomonas koreensis</i>	
RC5	Biote endophyte	GN	X	
RC6	Biote endophyte	M17	<i>Citrobacter sp.</i>	
RC7	Biote endophyte	M17	<i>Bacillus licheniformis/sonorensis</i>	
RC8	Biote externe	GN	<i>Pantoea agglomerans</i>	
RC9	Biote externe	GN	<i>Pseudomonas sp.</i>	
RC10	Biote externe	PDA	X	
RC11	Biote externe	PDA	X	
RC12	Biote endophyte	PDA	X	
RC13	Biote endophyte	M17	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	
RC14	Macération	MRS	<i>Weissella cibaria</i>	
RC15	Macération	MRS	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	
RC16	Macération	MRS	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	
RC17	Macération	MRS	X	
RC18	Macération	MRS	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	

En vert : identification certaine (genre + espèce), en orange : identification du genre mais pas de l'espèce.
X : identification échouée ou non réalisée.

À partir de la racine d'endive après forçage, 11 souches ont été isolées, dont 8 provenant du biote externe et 3 du biote endophyte (**Table 7, RF1 à RF11**). Six souches ont été isolées sur le milieu GN, 2 sur le milieu M17 et 3 sur le milieu PDA. Parmi les 11 souches, 5 ont pu être définitivement identifiées comme : *Lelliottia amnigena*, *Pectobacterium carotovorum*, *Citrobacter gillenii*, *Bacillus licheniformis* et *Pantoea agglomerans*.

Le plus grand nombre de souches a été retrouvé sur la racine d'endive en champs, avec un total de 18 souches (**Table 7, RC1 à RC18**) : 8 proviennent du biote externe, 5 du biote endophyte et 5 de la macération en milieu MRS. De plus, 7 souches ont été isolées sur le milieu GN, 3 sur le milieu M17, 5 sur le milieu MRS et 3 sur le milieu PDA. Parmi les 18 souches, l'identification par profilage MALDI-TOF-MS a conduit à identifier de manière hautement probable, 8 souches : *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas koreensis*, *Pantoea agglomerans*, *Leclercia adecarboxylata*, *Weissella cibaria*, et 3 souches de *Limosilactobacillus reuteri*.

L'objectif qui était d'obtenir des Lactobacilles a été atteint. En effet, parmi les 8 souches de bactéries lactiques obtenues, 3 ont été identifiées comme étant des Lactobacilles et plus précisément des *Limosilactobacillus reuteri*.

2. Criblage des co-produits de chicorée et d'endive par fermentation des souches de *Lactobacillus*

Afin de réaliser ce criblage, 9 souches ont été sélectionnées, dont 6 de *L. plantarum* (31c, 35a, 37a, 46a, 47b et 55a) provenant de la collection de VF Bioscience. Cette espèce a été choisie après des recherches bibliographiques ainsi que des travaux préliminaires à la thèse, qui ont montré leur capacité à fermenter les co-produits de chicorée et d'endive et à produire des composés ayant des activités antioxydantes. Les 3 souches de *L. reuteri* (RC15, RC16 et RC18) isolées à partir de la macération des racines en champs en MRS ont également été criblées.

2.1. Évaluation de la croissance des souches sélectionnées sur les co-produits de chicorée et d'endives

2.1.1. Évaluation de la croissance par acidification

Toutes les fermentations réalisées en Deepwell ont été inoculées à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,3. Après 72 h à 37 °C, la croissance a été évaluée. L'une des méthodes potentiellement utilisables est la mesure de pH, car les souches produisent de l'acide lactique au cours de la fermentation. Les niveaux d'acidification ont été comparés aux macérations

contrôles, ne contenant pas de souche. Les résultats de ces fermentations ont montré (**Figure 24**) que les souches *L. plantarum* et *L. reuteri* ont réussi à croître pour l'ensemble des fermentations. Parmi les co-produits (**Table 5**), le milieu ECBU a conduit à la plus forte acidification, avec un ΔpH approchant -2 par rapport aux macérations contrôles. À l'inverse, les fermentations en milieu EEBU ont entraîné la plus faible acidification, avec un ΔpH de -0,5 par rapport au témoin.

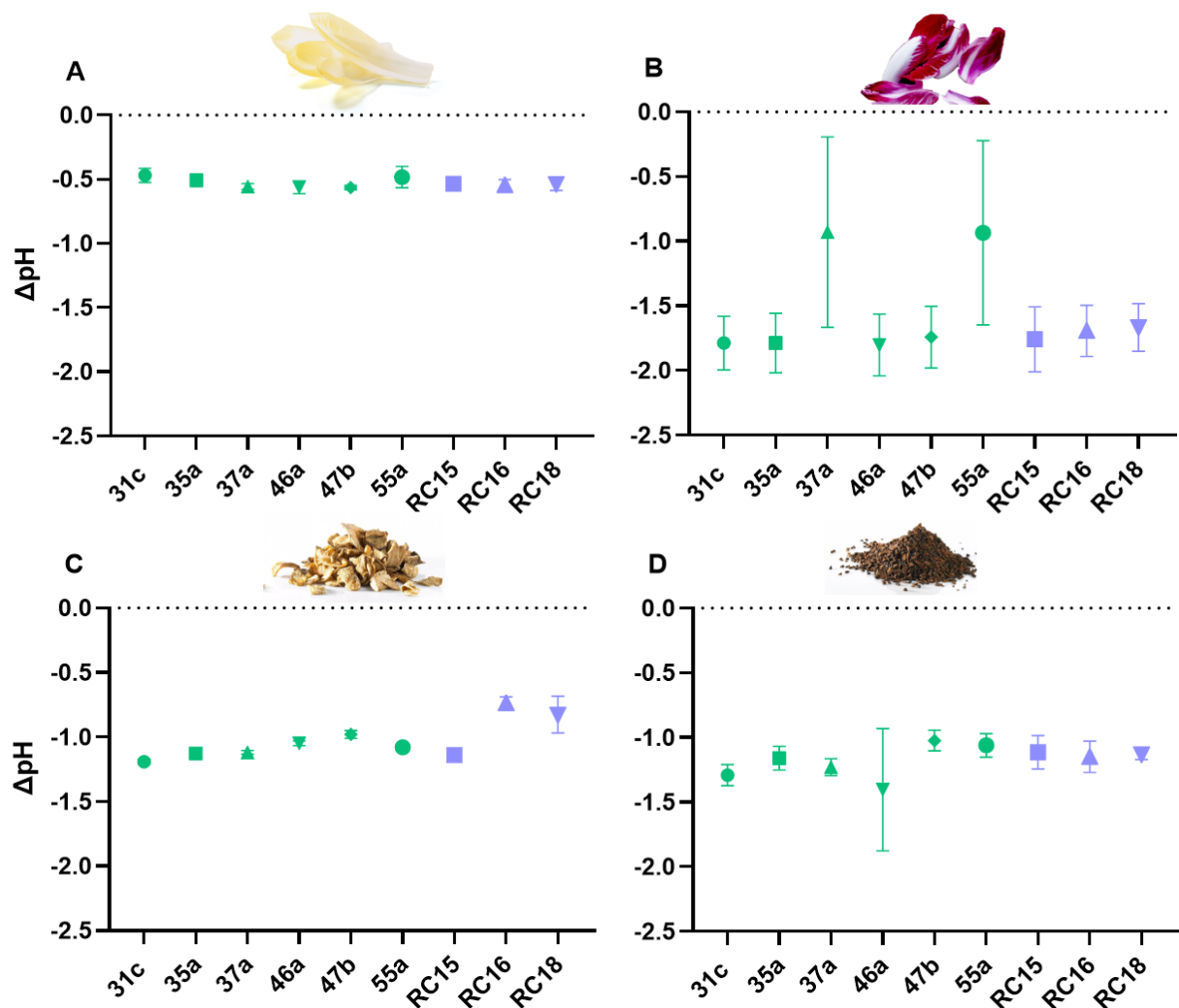


Figure 24 : Diminution du pH au cours des fermentations.

A : milieu de fermentation contenant les épluchures d'endives broyées au blender et à l'ULTRA-TURRAX®, **B** : milieu de fermentation contenant les épluchures de Carmines® broyées au blender et à l'ULTRA-TURRAX®, **C** : milieu de fermentation contenant le marc de chicorée broyé au blender et à l'ULTRA-TURRAX®, **D** : milieu de fermentation contenant les fines de cossettes non torréfiées broyées au blender et à l'ULTRA-TURRAX®. En vert : *L. plantarum*, en bleu : *L. reuteri*. Les fermentations ont été réalisées en Deepwell pendant 24 h, à 37 °C avec l'ensemble des souches sélectionnées inoculées à 0,3 de $\text{DO}_{600\text{nm}}$. Les valeurs sont les moyennes \pm écarts-types (N=2, n=3).

2.1.2. Évaluation de la croissance par dénombrement

Le dénombrement est une autre méthode permettant de déterminer la croissance des souches. Les différents milieux n'étant pas limpides, dus à la présence des co-produits broyés, il n'a pas été possible de mesurer la densité optique de manière certaine. Le dénombrement, qui est une méthode fiable, a donc été utilisé. La croissance la plus importante a été observée pour le milieu contenant les épluchures d'endives (**Figure 25**).

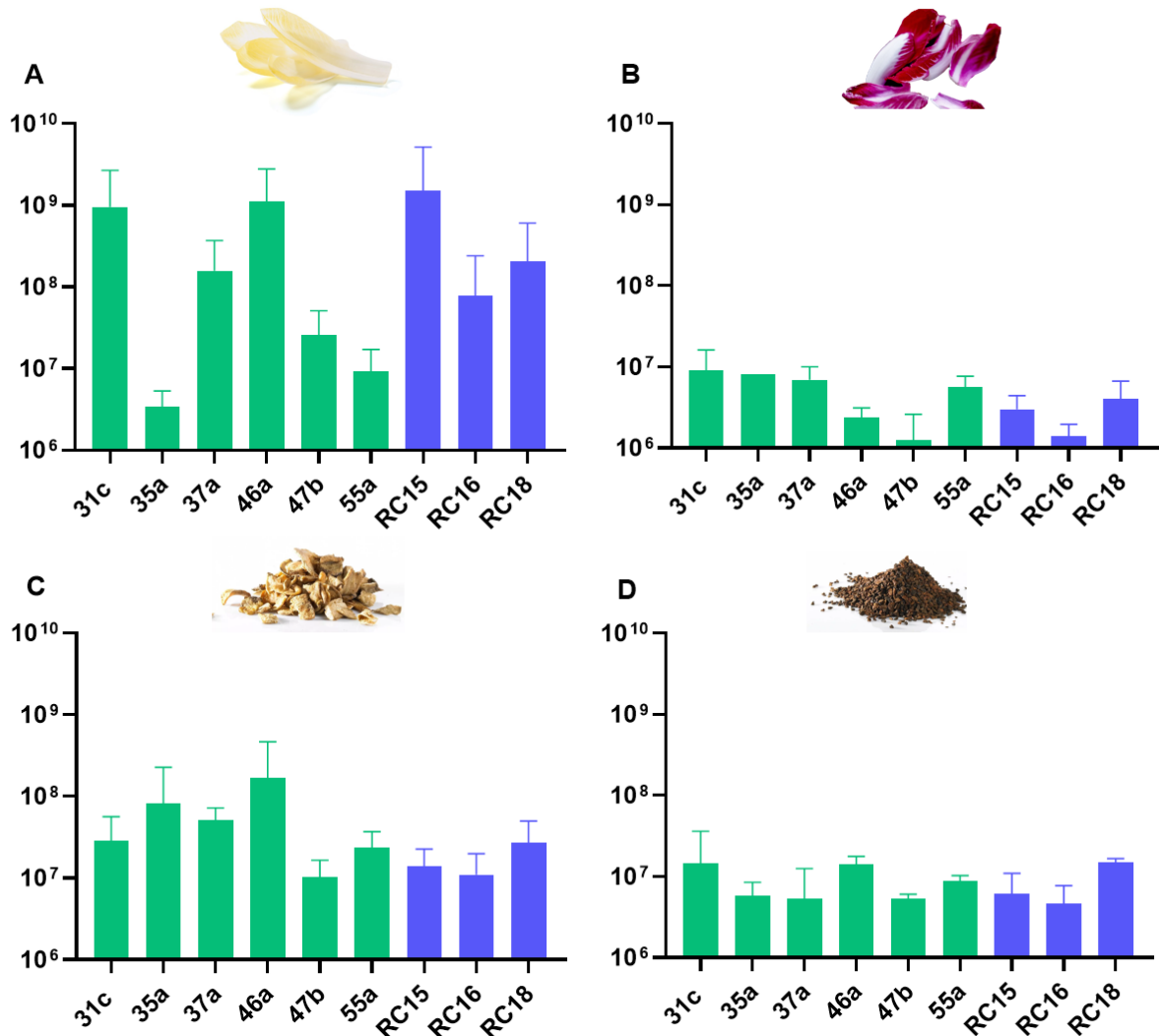


Figure 25 : Croissance des souches de lactobacillus dans les différents milieux de fermentation.

A : milieu de fermentation contenant les épluchures d'endives broyées au blender et à l'ULTRA-TURRAX®, **B :** milieu de fermentation contenant les épluchures de Carmine[®] broyées au blender et à l'ULTRA-TURRAX®, **C :** milieu de fermentation contenant le marc de chicorée broyé au blender et à l'ULTRA-TURRAX®, **D :** milieu de fermentation contenant les fines de cossettes non torréfiées broyées au blender et à l'ULTRA-TURRAX®. En vert : les *L. plantarum*, en bleu : les *L. reuteri*. Les fermentations ont été réalisées en Deepwell pendant 72 h, à 37 °C avec l'ensemble des souches sélectionnées, inoculées à 0,3 de DO_{600 nm}. Les valeurs sont les moyennes ± écarts-types (N=2, n=3).

En effet, 3 souches, 31c, 46a et RC15, atteignent une concentration de 1.10^9 UFC.mL⁻¹ après 72 h de fermentation. Le milieu contenant le marc de chicorée a également permis une bonne croissance, notamment pour la souche 46a qui atteignait 1.10^8 UFC.mL⁻¹ après 72 h de fermentation. En revanche, les milieux présentant les plus faibles croissances étaient les milieux contenant les épiluchures de Carmines® et celui contenant les fines de cossettes non torréfiées. Les souches présentant les croissances les plus importantes sont 31c, 46a et RC18, et ce dans la plupart des milieux. En revanche, les souches présentant la plus faible croissance sont 47b et RC16.

Les valeurs de dénombrement fournissent des informations différentes de celles obtenues par mesure de l'acidification du milieu. De plus, les différences de croissance entre les souches sont plus importantes lorsqu'elles sont mesurées par dénombrement que par l'acidification du milieu. Contrairement aux mesures de pH qui permettent de déterminer la production d'acide par les souches, les dénombrements déterminent de façon exacte le nombre d'unités formant des colonies présentes dans le milieu à un temps donné. Il est donc préférable d'utiliser cette mesure pour déterminer la croissance des souches. Ainsi, le milieu EEBU est celui dans lequel les souches se sont le mieux développées.

2.2. Évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH des différents substrats fermentés

L'activité antioxydante déterminée par la méthode de DPPH, est exprimée en μ M équivalent Trolox (TEAC). Le Trolox, une molécule antioxydante, a été utilisée comme contrôle positif. Les résultats des fermentations de 72 h en Deepwell des quatre co-produits de chicorée et d'endive sont présentés en **Figure 26**.

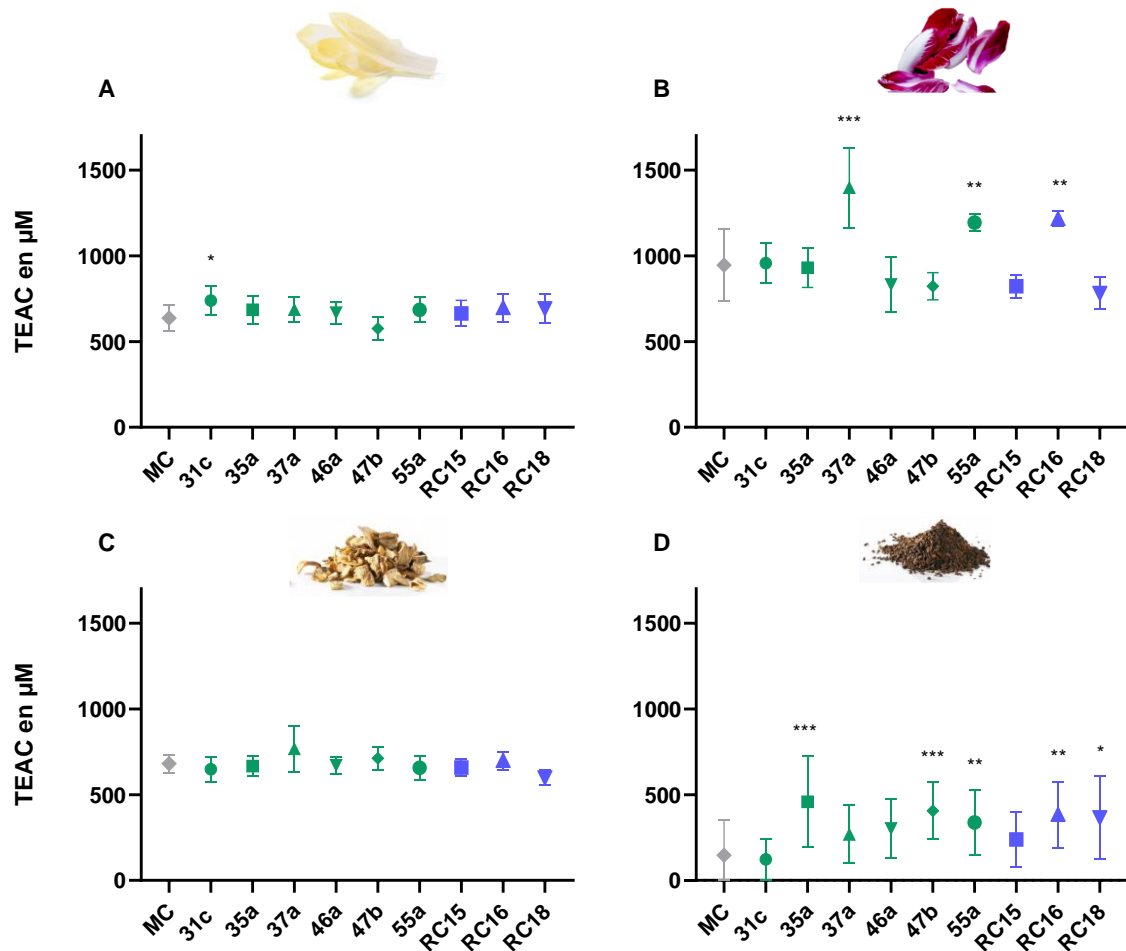


Figure 26 : Activité antioxydante des surnageants de fermentation en μM d'équivalent Trolox.

A : surnageants de fermentation des épluchures d'endives, **B** : surnageants de fermentation des épluchures de Carmines®, **C** : surnageants de fermentation du marc de chicorée, **D** : surnageants de fermentation des fines de cossettes non torréfiées. TEAC : activité antioxydante en équivalent Trolox de l'anglais *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*. MC : macérations contrôles, en vert : *L. plantarum*, en bleu : *L. reuteri*, en gris : macérations contrôles. Les surnageants des fermentations réalisées pendant 72 h, à 37 °C en Deepwell,ensemencées à 0,3 de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$. Statistiques : Les valeurs sont les moyennes \pm écarts-types (N=6, n=3). Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn ont été effectués en comparant les valeurs obtenues aux macérations contrôles, p * <0,05, p ** <0,01, p *** <0,001.

À l'exception des fermentations réalisées en milieu CNTBU, tous les sous-produits ont présenté des valeurs supérieures à 600 μM TEAC. La valeur obtenue pour les surnageants de macérations contrôles en milieu MCBU était de 681 μM TEAC. Cependant, la fermentation n'a pas significativement augmenté leur activité antioxydante. En revanche, le milieu ECBU a montré la plus forte activité parmi les sous-produits, avec une valeur de 946 μM TEAC avant fermentation. Seules trois souches, 37a, 55a et RC16, ont pu augmenter significativement la capacité antioxydante après fermentation. La condition avec la valeur la plus élevée (1398 μM TEAC) a été atteinte avec la souche 37a.

De plus, la souche 31c était la seule capable d'améliorer significativement l'activité antioxydante des fermentations réalisées avec le milieu EEBU.

2.3. Évaluation de l'activité hépato-protectrice des différents substrats fermentés

Afin d'évaluer l'activité hépato-protectrice des surnageants de fermentation des différents substrats, un test spécifique a été développé. Ce test repose sur l'induction d'un stress oxydatif dans les cellules hépatiques HepG2 à l'aide d'une solution d'éthanol. L'objectif était de déterminer si les surnageants de fermentation pouvaient atténuer les effets néfastes du stress oxydatif induit par l'éthanol, ce qui présagerait d'un potentiel effet hépato-protecteur.

2.3.1. Mises au point du test hépato-protecteur

Pour mettre au point ce test, des gammes de concentrations d'éthanol, de vitamine C et de Trolox ont été testées. Les résultats ont montré que, ni le Trolox, ni la vitamine C, n'affectaient la viabilité cellulaire aux concentrations testées (**Figure 27**).

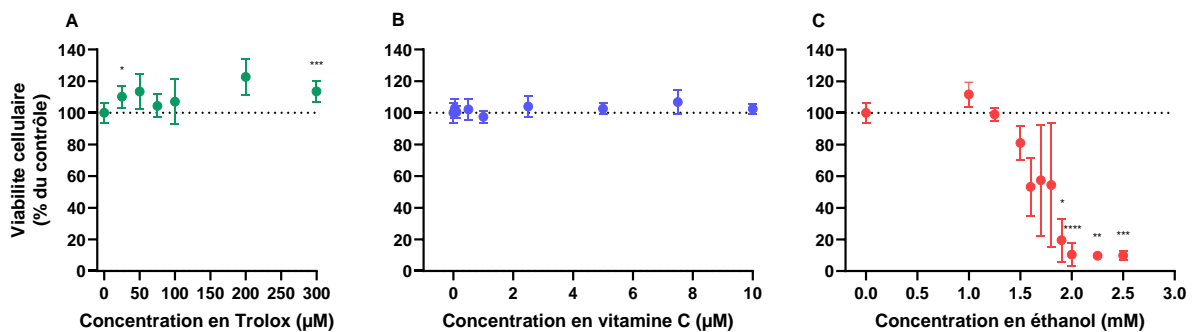


Figure 27 : Impact du Trolox, de la vitamine C et de l'éthanol sur la viabilité des cellules HepG2.

A : viabilité des cellules HepG2 en fonction de la concentration en Trolox (25 à 300 µM), **B** : viabilité des cellules HepG2 en fonction de la concentration en vitamine C (0,05 à 10 µM), **C** : viabilité cellules HepG2 en fonction de la concentration en éthanol (1 à 5 mM). L'ensemble de ces tests ont été réalisés sur des cellules à des passages compris entre P19 et P23. Statistiques : Les valeurs sont les moyennes ± écarts-types (N=2, n=3). Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn ont été effectués en comparant les valeurs obtenues aux contrôles correspondants à 100 % de viabilité, p * <0,05, p ** <0,01, p *** <0,001.

En revanche, plus la concentration en éthanol est élevée, plus la viabilité cellulaire est faible. Cependant, jusqu'à une concentration de 1,25 mM, la viabilité cellulaire est de 100 %, mais à partir de 1,9 mM, la viabilité cellulaire diminue de manière significative à 20 %.

Une deuxième phase de la mise au point a consisté à déterminer l'effet protecteur du Trolox en fonction du moment de son ajout (avant, pendant ou après l'éthanol à 1,8 mM). Les résultats sont présentés dans la **Figure 28**.

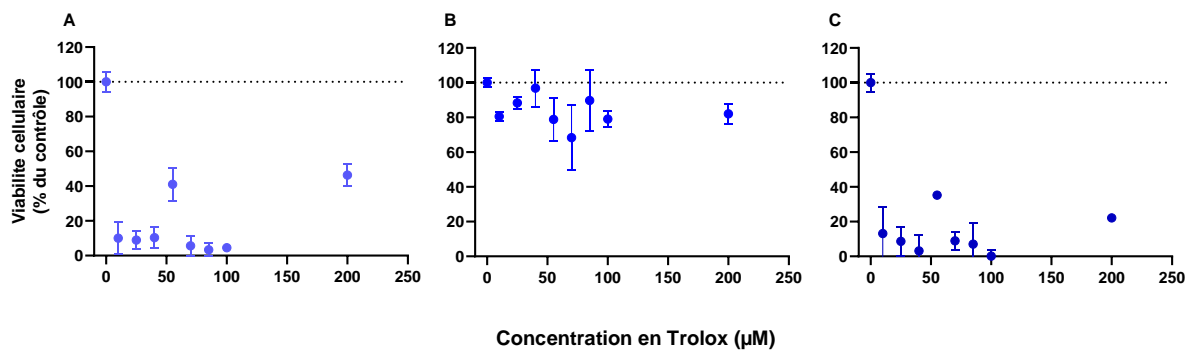


Figure 28 : Comparaison de l'effet du Trolox sur la viabilité des cellules HepG2 en fonction du moment de son ajout.

A : Trolox ajouté avant l'éthanol à 1,8 mM. **B :** Trolox ajouté en même temps que l'éthanol à 1,8 mM. **C :** Trolox ajouté après l'éthanol à 1,8 mM. L'ensemble de ces tests ont été réalisés sur des cellules à des passages compris entre P29 et P31. Des concentrations de Trolox allant de 10 à 200 µM ont été testées. Les valeurs sont les moyennes ± écarts-types (n=3).

Le Trolox ne permet pas de maintenir la viabilité cellulaire lorsqu'il est ajouté avant ou après l'exposition à l'éthanol. Lorsqu'il est ajouté avant, la viabilité cellulaire est assez faible et diminue lorsque le Trolox est ajouté à une concentration de 70 µM. Après l'exposition à l'éthanol, la viabilité cellulaire maximale diminue quand la concentration en Trolox est comprise entre 40 et 100 µM. En revanche, lorsque le Trolox et l'éthanol sont mis au contact des cellules de manière concomitante, la viabilité cellulaire varie de 68 à 97 %. Par conséquent, pour tester l'effet hépato-protecteur des différents surnageants de fermentation, ces derniers seront mis au contact des cellules HepG2 en même temps que l'éthanol.

Des combinaisons d'éthanol et de vitamine C ou de Trolox ont ensuite été testées. Suite à cela, le Trolox a été sélectionné pour les expérimentations ultérieures, les

résultats obtenus avec la vitamine C n'étant pas concluants (résultats non présentés). Le Trolox a ainsi été testé à différentes concentrations en combinaison avec trois concentrations d'éthanol (1,8 ; 1,9 et 2 mM) (**Figure 29**).

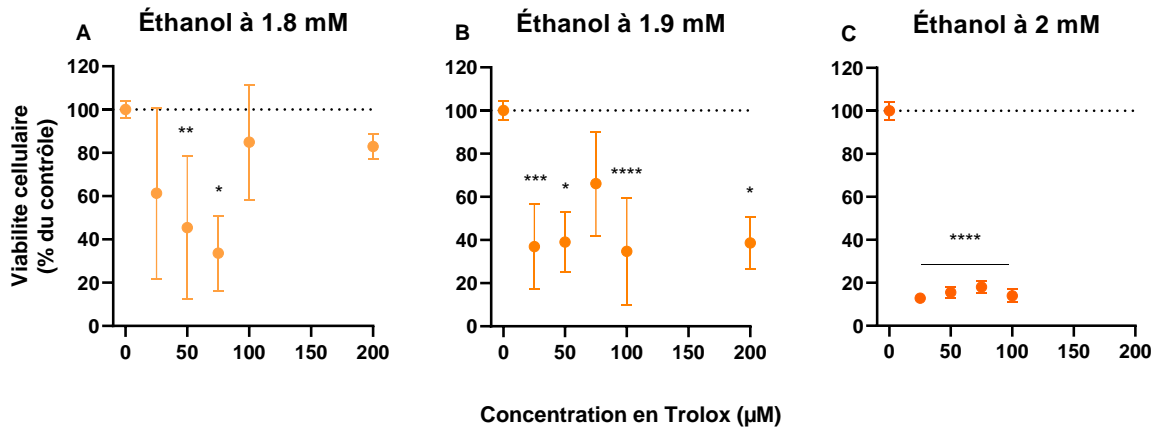


Figure 29 : Effet du Trolox à différentes concentrations en présence d'éthanol sur la viabilité des cellules HepG2.

A : effet du Trolox en présence de 1,8 mM d'éthanol. **B :** effet du Trolox en présence de 1,9 mM d'éthanol. **C :** effet du Trolox en présence de 2 mM d'éthanol. Des gammes de Trolox allant de 25 à 300 µM ont été mises au contact des HepG2 avec différentes concentrations d'éthanol, 1,8 ; 1,9 et 2 mM, dans le but de déterminer la valeur de Trolox capable de maintenir la viabilité cellulaire. L'ensemble de ces tests ont été réalisés sur des cellules à des passages compris entre P19 et P23. Les valeurs sont les moyennes ± écarts-types (N=2, n=3). Statistiques : un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn ont été effectués en comparant les valeurs obtenues aux contrôles correspondants à 100 % de viabilité, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Les résultats montrent qu'à une concentration d'éthanol de 1,8 mM, le Trolox ajouté à des concentrations de 100 et 200 µM permet de maintenir une viabilité cellulaire d'environ 80 %. Cependant, une forte variabilité entre les plaques et les passages cellulaires a été observée. Pour une concentration de 2 mM d'éthanol, la présence du Trolox ne permet pas d'augmenter significativement la viabilité cellulaire lorsque l'éthanol est en contact avec les cellules. Pour une concentration d'éthanol de 1,9 mM, la variabilité est moindre, et le Trolox permet de maintenir une viabilité cellulaire comprise entre 15 à 40 % selon la concentration testée. En conclusion, la concentration d'éthanol retenue pour mesurer l'effet hépato-protecteur des surnageants de fermentation est de 1,9 mM, et la concentration de Trolox a été fixée à 200 µM.

2.3.2. Activité hépato-protectrice des surnageants de fermentation des différents substrats

L'activité hépato-protectrice a été évaluée sur les cellules HepG2 exposées à la fois aux surnageants de fermentation et à de l'éthanol, dans le but de déterminer si ces surnageants peuvent atténuer le stress oxydatif induit par l'éthanol (**Figure 30**). Pour ce test, les surnageants ont été mis au contact des HepG2 à des concentrations non cytotoxiques.

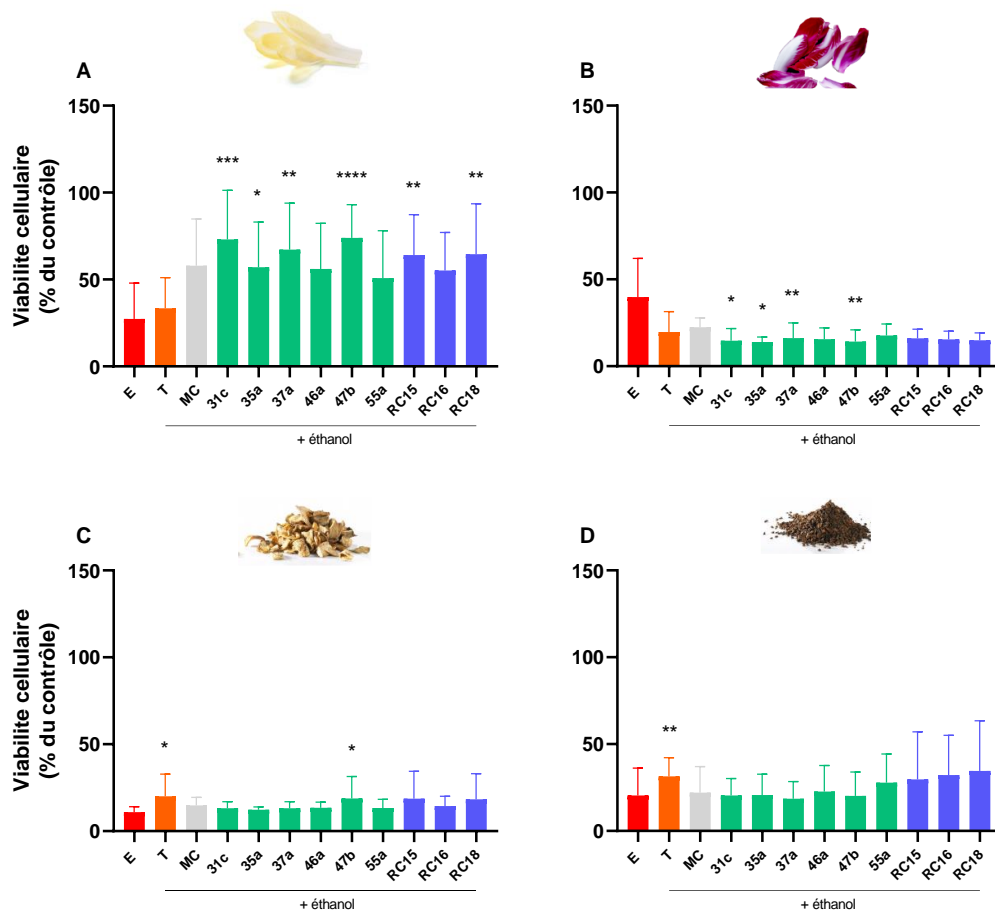


Figure 30 : Activité hépato-protectrice des surnageants de fermentation sur les cellules HepG2 exposées à une concentration de 1,95 mM d'éthanol.

A : surnageants de fermentation des épluchures d'endives, **B** : surnageants de fermentation des épluchures de Carmines®, **C** : surnageants de fermentation du marc de chicorée, **D** : surnageants de fermentation des fines de cossettes non torréfiées. En rouge : éthanol à 1,95 mM, en orange : Trolox à 200 µM, en vert : *L. plantarum*, en bleu : *L. reuteri*, en gris : surnageants de macérations contrôles. Les valeurs correspondent aux fermentations réalisées durant 72 h à 37 °C en Deepwell. Les souches ont été inoculées à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,3. Les surnageants de fermentation ont été dilués au quart dans les puits. L'ensemble de ces tests ont été réalisés sur des cellules à des passages compris entre P23 et P27. Statistiques : Les valeurs sont les moyennes \pm écarts-types (N=2, n=3). Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn, comparant les échantillons à la condition éthanol ont été utilisés, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Pour l'ensemble des tests, l'éthanol a induit un stress oxydatif important, entraînant une viabilité cellulaire inférieure à 50 %. Parmi les différents co-produits testés, seuls les surnageants de fermentation des épluchures d'endives ont permis de restaurer une viabilité cellulaire significativement supérieure à celle observée avec l'éthanol seul. En effet, en présence d'éthanol seul, la viabilité cellulaire a été réduite à 27 %, tandis qu'en présence des surnageants de fermentation issus des épluchures d'endives, la viabilité cellulaire a augmenté, pour atteindre des valeurs comprises entre 51 et 74 %. Concernant les autres co-produits testés, à savoir les épluchures de Carmines®, le marc de chicorée et les fines de cossettes non torréfiées, les surnageants de fermentation n'ont pas montré d'effet protecteur, la viabilité cellulaire restant inférieure à celles des cellules exposées à l'éthanol seul. Une exception concerne les surnageants de fermentation des fines de cossettes non torréfiées et fermentées par les souches de *L. reuteri*, qui ont permis d'atteindre des viabilités dont les valeurs étaient comprises entre 30 et 35 % en présence d'éthanol. Ces résultats montrent que seuls les surnageants de fermentation des épluchures d'endives exerceraient un potentiel effet hépatoprotecteur en atténuant le stress oxydatif induit par l'éthanol.

2.4. Caractérisation des polyphénols par analyse HPLC-PDA des surnageants de fermentation des différents substrats

Les surnageants des quatre co-produits ont été caractérisés par HPLC afin de comparer, de manière relative, la teneur en polyphénols par rapport aux surnageants de macérations contrôles. Des exemples de profils sont présentés en **Figure 31**.

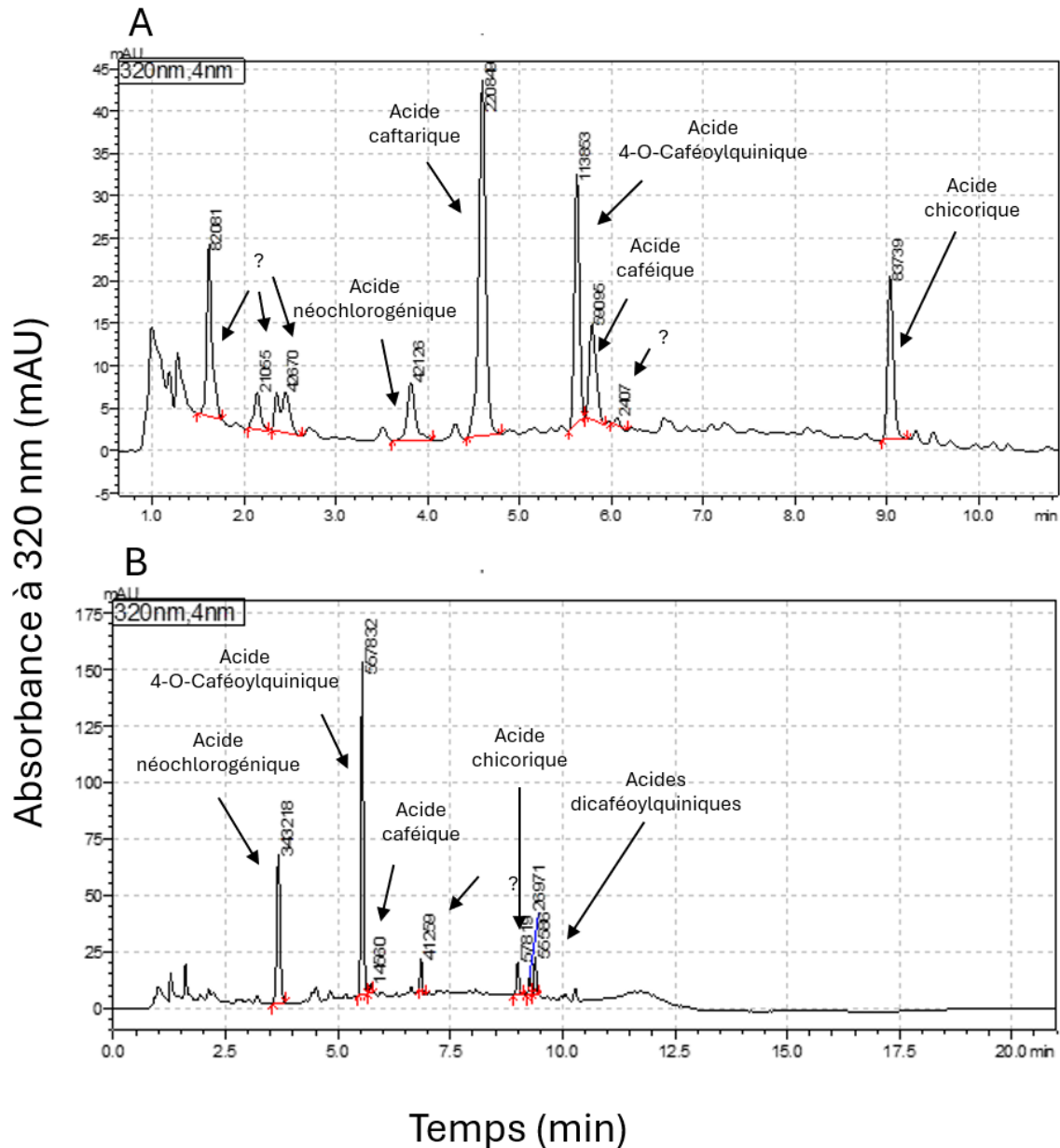


Figure 31 : Profils phénoliques des co-produits d'endive et de chicorée obtenus par HPLC.

A : profil phénolique des épluchures d'endives obtenu par HPLC. **B** : profil phénolique des fines de cossettes non torréfiées obtenu par HPLC. Les pics correspondants aux polyphénols identifiés sont indiqués sur la figure.

Pour la majorité des fermentations, la plupart des polyphénols est restée stable au cours du protocole expérimental. Cependant, les acides hydroxycinnamiques dont la teneur a été affectée par la fermentation sont présentés en **Figure 32**.

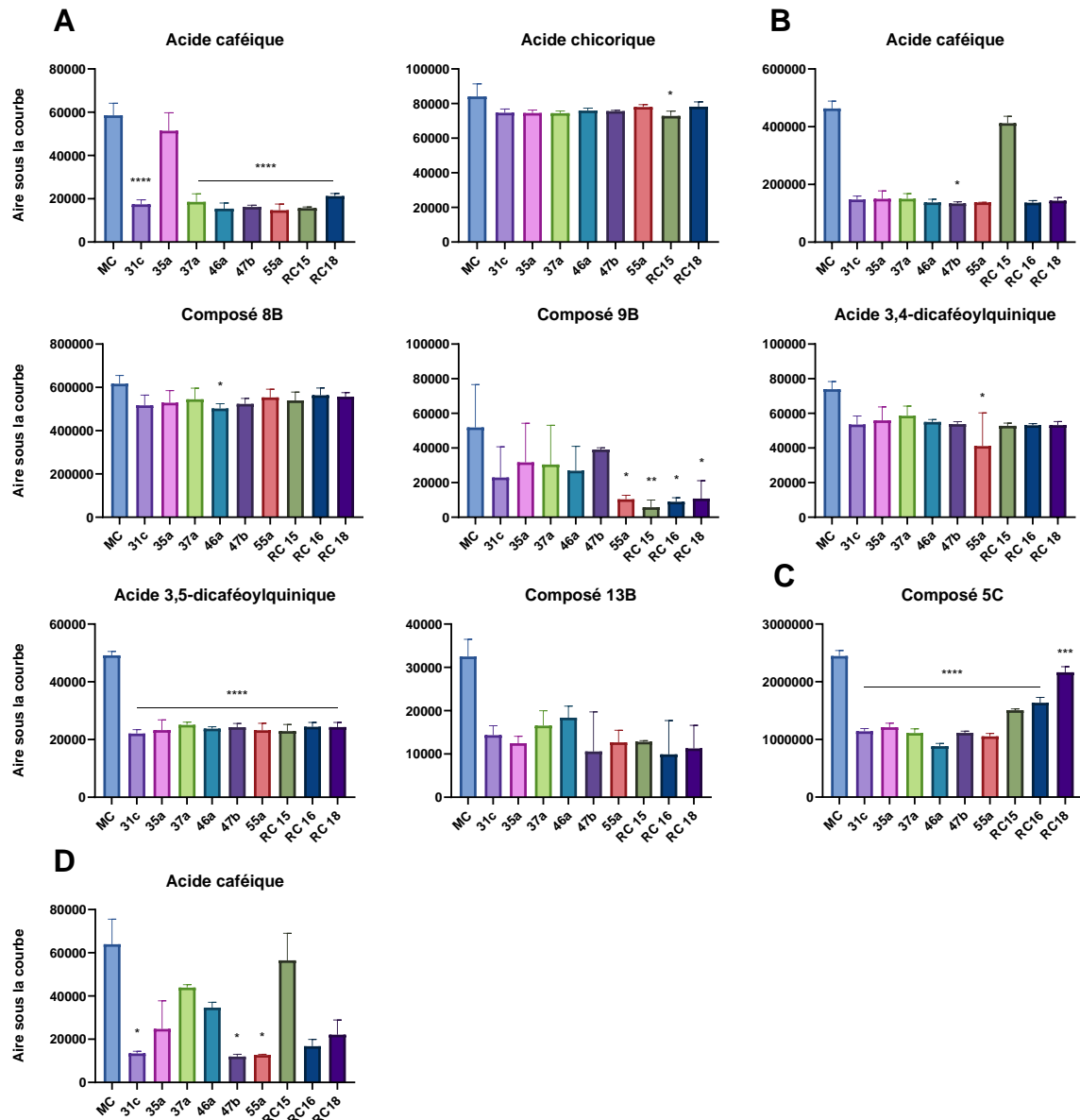


Figure 32 : Caractérisation des polyphénols dans les surnageants de fermentation des co-produits d'endive et de chicorée.

A : quantité relative des composés identifiés dans les surnageants de fermentation des épiluchures d'endives, obtenus à partir des fermentations réalisées en Deepwell, **B :** quantité relative des composés identifiés dans les surnageants de fermentation des épiluchures de Carmines®, obtenus à partir des fermentations réalisées en Deepwell, **C :** quantité relative des composés identifiés dans les surnageants de fermentation du marc de chicorée, obtenus à partir des fermentations réalisées en Deepwell, **D :** quantité relative des composés identifiés dans les surnageants de fermentation des fines de cossettes non torréfiées, obtenus à partir des fermentations réalisées en Deepwell. Statistiques : les valeurs sont les moyennes des aires sous la courbe \pm écarts-types (N=3). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant soit un test de Kruskal-Wallis, soit une ANOVA à un facteur, suivis respectivement d'un test post-hoc de Dunn ou de Dunnett pour les comparaisons avec les macérations contrôles. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Pour les fermentations en milieu EEBU (**Figure 32A**), toutes les souches ont entraîné une diminution des acides caféique et chicorique, avec une réduction significative de l'acide caféique. Concernant le milieu ECBU (**Figure 32B**), une diminution de la quantité de polyphénols a été observée pour 3 composés non identifiés (composés 8B, 9B et 13B), ainsi que pour l'acide 3,4-dicaféoylquinique, l'acide caféique et l'acide 3,5-dicaféoylquinique. De plus, la diminution observée pour ce dernier acide est significative pour l'ensemble des souches. Concernant le composé 9B, une diminution notable a été observée lorsque le milieu ECBU a été fermenté par les souches de *L. reuteri*. Pour le milieu MCBU (**Figure 32C**), seule la teneur en composé 5C a diminué après fermentation. Enfin, avec le milieu CNTBU (**Figure 32D**), seul l'acide caféique a montré une réduction de sa concentration relative, et cela pour la majorité des souches.

2.5. Analyse factorielle multiple pour le criblage des co-produits d'endive et de chicorée

Dans le but de sélectionner le co-produit à utiliser pour la suite du projet, une AFM a été réalisée. Cette analyse s'est basée sur les paramètres suivants : la croissance bactérienne (Δ pH et dénombrement), les activités antioxydantes et hépato-protectrices, et la teneur en polyphénols des surnageants de fermentation mesurée par HPLC (**Figure 33**).

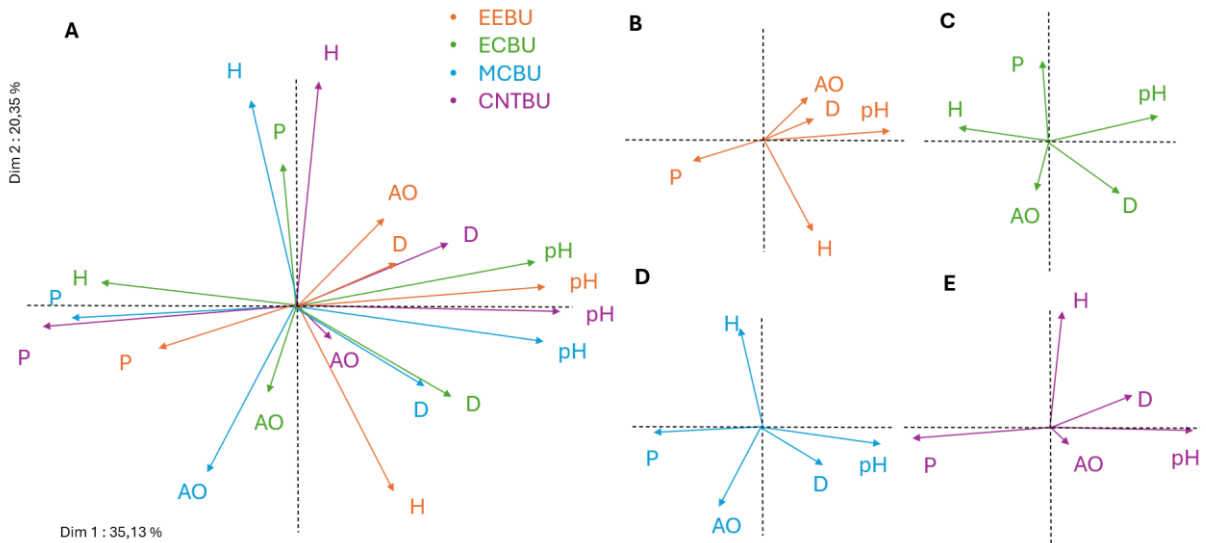


Figure 33 : Analyse factorielle multiple réalisée à partir de la croissance, la caractérisation et les bioactivités obtenues après fermentation des co-produits d'endive et de chicorée en Deepwell.

A : AFM des fermentations des quatre co-produits de chicorée et d'endive fermentés en Deepwell pendant 72 h à 37 °C avec un inoculum de départ à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,3. **B** : résultats obtenus par fermentation des épluchures d'endives, **C** : résultats obtenus par fermentation des épluchures de Carmines®, **D** : résultats obtenus par fermentation du marc de chicorée, **E** : résultats obtenus par fermentations des fines de cossettes torréfiées, pH : acidification des fermentations par rapport aux macérations contrôles, D : évaluation de la croissance par dénombrement, A : activité antioxydante par méthode DPPH, H : activité hépato-protectrice, P : contenu en acides phénoliques. Pour cette AFM, les paramètres qui ont été pris en compte correspondent à l'évaluation de la croissance par ΔpH et par dénombrement, l'activité antioxydante mesurée par la méthode DPPH, l'activité hépato-protectrice mesurée sur les cellules HepG2 ainsi que le contenu relatif en acides phénoliques évalué par HPLC.

Les dimensions 1 et 2 expliquent respectivement 35.13 et 20.35 % des données. Cette AFM permet donc d'avoir une vue globale sur la corrélation entre les différentes variables, mais ne prend pas en compte l'ensemble des données. Les corrélations positives sont illustrées par un angle aigu entre deux variables, tandis qu'une corrélation négative s'illustre par un angle obtus. L'AFM révèle que pour les fermentations réalisées avec les épluchures d'endives, les paramètres de croissance sont corrélés de façon positive à l'activité antioxydante mesurée par la méthode DPPH. L'acidification est également corrélée avec l'activité hépato-protectrice testée sur les cellules HepG2. Pour les fermentations réalisées en milieu ECBU, MCBU et CNTBU, les variables sont beaucoup plus dispersées et les corrélations positives très peu nombreuses.

Les fermentations des quatre co-produits de chicorée et d'endive, réalisées en Deepwell pendant 72 heures à 37 °C avec un inoculum initial de 0,3 à une DO à 600 nm, à l'aide des 9 souches de *Lactobacillus* sélectionnées, ont permis de retenir les épluchures d'endive pour la suite du projet.

3. Criblage des souches de *Lactobacillus*

Une fois le co-produit sélectionné (épluchure d'endive), une nouvelle étape de sélection a été nécessaire afin de limiter le nombre de souches bactériennes à utiliser. Afin d'identifier les souches permettant d'obtenir les meilleures croissances et bioactivités, les épluchures d'endives à une concentration de 25 g.L⁻¹, ont été fermentées par les six souches de *L. plantarum* (31c, 35a, 37a, 46a, 47b et 55a) de la collection de VF Bioscience, ainsi que les trois souches de *L. reuteri* (RC15, RC16 et RC18) provenant de l'isolement du biote de l'endive, avec un inoculum à une DO_{600 nm} de départ de 1,5 durant 24 h.

3.1. Évaluation de la croissance des souches de *Lactobacillus* sur les épluchures d'endive

Après 24 h de culture, les souches ont permis une diminution du pH du milieu de fermentation comprise entre -1,5 et -1,3 comparées aux macérations contrôles (sans souche) (**Figure 34A**). Concernant la croissance mesurée par dénombrement, les résultats sont plus dispersés. Après 24 h de fermentation, les souches se sont développées jusqu'à 3,4.10⁷ UFC.mL⁻¹ pour la 31c et jusqu'à 2,48.10⁸ UFC.mL⁻¹ pour la RC16 (**Figure 34B**). Les suivis de croissance par mesure de pH et dénombrement ne sont pas corrélés. La production d'acide lactique et autres composés acides durant la fermentation n'est donc pas directement reliée à la croissance des souches.

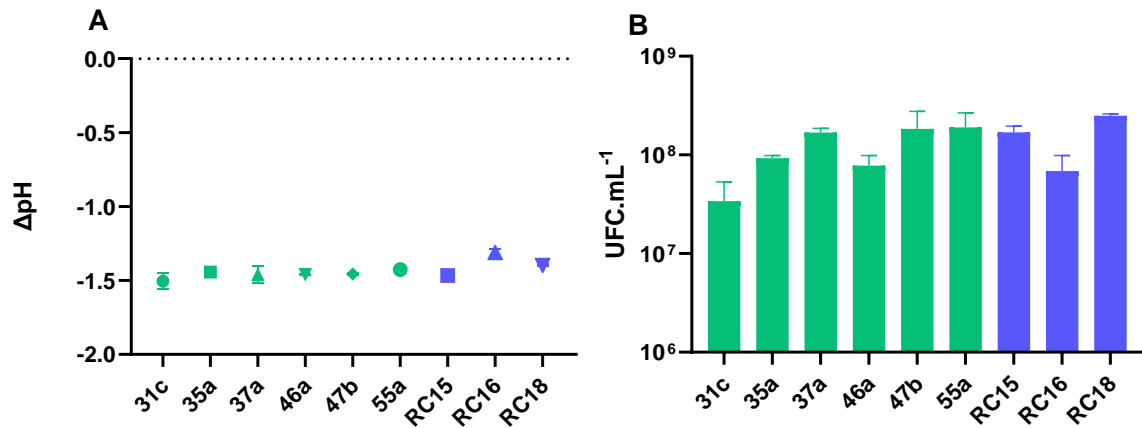


Figure 34 : Évaluation de la croissance des différentes souches inoculées à 5 X après 24 h de fermentation.

A: acidification du milieu de fermentation par rapport aux macérations contrôles (sans souche), **B**: dénombrements des différentes fermentations sur gélose MRS. Les valeurs sont les moyennes ± écarts-types (N=3). En vert : *L. plantarum*, en bleu : *L. reuteri*. Les fermentations ont été réalisées en erlenmeyer à 37 °C en condition anaérobie.

3.2. Activité antioxydante sur les cellules hépatiques et intestinales

L'activité antioxydante des surnageants a également été mesurée sur les lignées cellulaires intestinale Caco-2 et hépatique HepG2, à 0 et 24 h à des concentrations n'affectant pas la viabilité cellulaire (**Figure 35**).

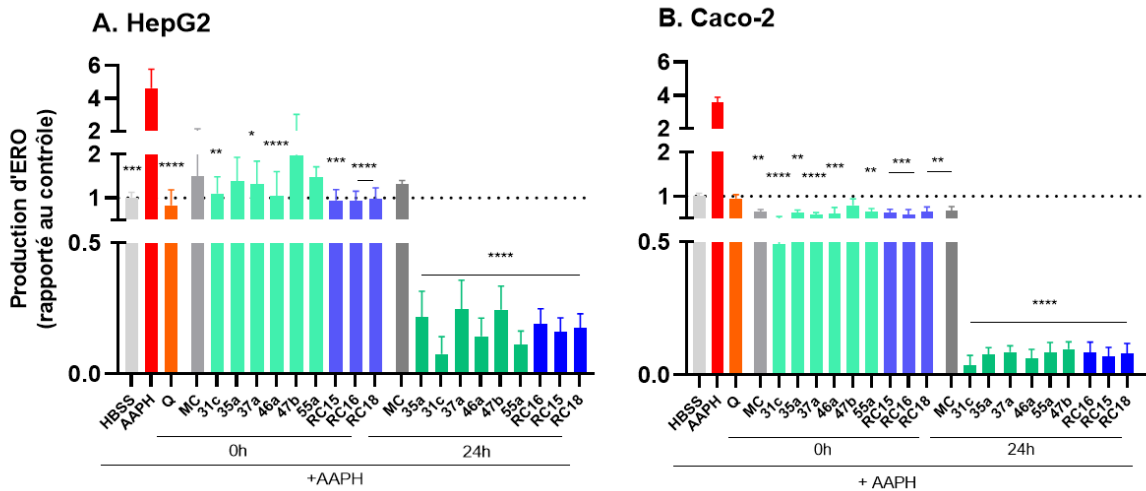


Figure 35 : Activité antioxydante des surnageants de fermentation à 0 h et 24 h avec une concentration d'inoculum de départ de 5 X évaluée par la production d'ERO intracellulaire à l'aide de la DCFH₂-DA.

A : production d'ERO par les cellules hépatiques HepG2, **B :** production d'ERO par les cellules intestinales Caco-2. Les résultats sont exprimés en fonction de valeurs obtenues pour le contrôle, ramenés à 1. En gris : macérations contrôles, en vert : *L. plantarum*, en bleu : *L. reuteri*. AAPH à 1 200 μ M, Q : quercétine à 100 μ M. Les surnageants ont été obtenus à partir des fermentations réalisées en erlenmeyer sur les épluchures d'endive et les souches ont été inoculées à 5 X. Ils ont été dilués au quart dans le puits. L'ensemble de ces tests ont été réalisés sur des cellules à des passages compris entre P30 et P34 pour les cellules HepG2 et entre P37 et P40 pour les cellules Caco-2. Statistiques : les valeurs sont les moyennes \pm écarts-types (N=2, n=3). Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn ont été réalisés, les statistiques ont été effectuées en comparant chaque échantillon à la condition AAPH, p *** <0,001, p **** <0,0001.

Ce test consiste à oxyder les cellules à l'aide d'AAPH afin d'évaluer la capacité des surnageants de fermentation à moduler cette production d'ERO. Pour cela, la DCFH₂-DA est utilisée. Lors de cette expérience, la production d'ERO intracellulaire est 3,6 fois plus élevée dans les cellules Caco-2 oxydées par l'AAPH que dans les cellules non oxydées. Cette augmentation est de 4,6 pour les cellules HepG2. La quercétine, une molécule antioxydante utilisée comme contrôle positif, a efficacement réduit l'oxydation induite par l'AAPH en diminuant la production d'ERO. La plupart des surnageants non fermentés ont montré une activité antioxydante significative, comparable à celle de la quercétine utilisée à une concentration de 100 μ M. Après 24 h de fermentation, l'activité antioxydante a été significativement améliorée par rapport à celle des macérations contrôles correspondantes. Globalement, les tendances observées sont les mêmes pour les deux lignées cellulaires. Les deux souches présentant les activités les plus importantes sur les deux lignées cellulaires, sont *L. plantarum* 31c et 46a.

3.3. Activité anti-inflammatoire sur les U937 différenciées en macrophages

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée en exposant les surnageants de culture (à une concentration non cytotoxique) à des cellules U937 différenciées en macrophages, après une exposition de 4 h avec du LPS (**Figure 36**).

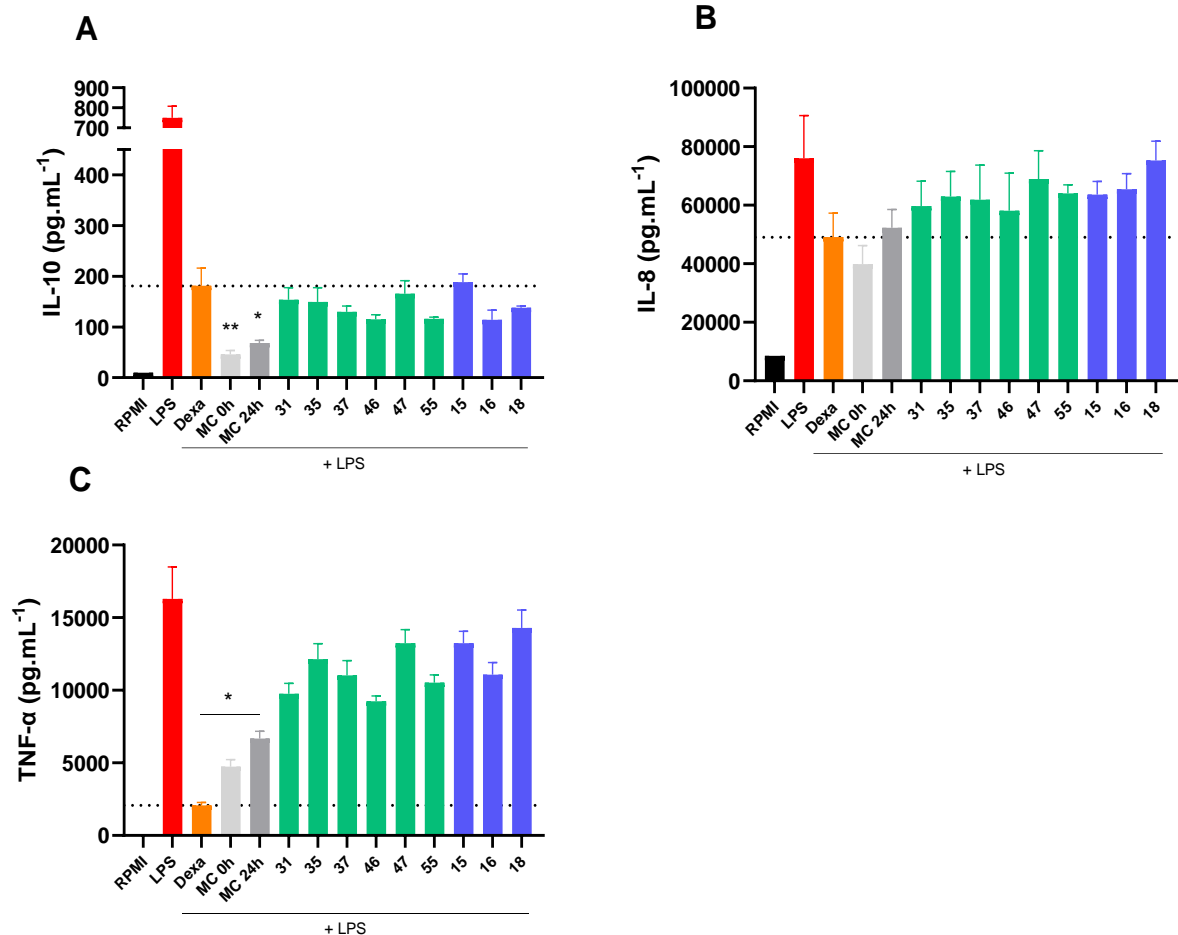


Figure 36 : Mesure de la réponse inflammatoire des cellules U937 en présence des surnageants de fermentation (24 h, 5 X) et de LPS.

A : concentration en IL-10, **B** : concentration en IL-8, **C** : concentration en TNF-α. Les cytokines ont été dosées dans le milieu de culture après 4 h de mise en contact des cellules U937 avec les surnageants à l'aide de kits ELISA. En gris : macérations contrôles, en vert : *L. plantarum*, en bleu : *L. reuteri*. Les valeurs sont les moyennes ± écarts-types (N=2, n=2). L'ensemble de ces tests ont été réalisés sur des cellules à des passages P13. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn. Les statistiques ont été effectuées en comparant chaque échantillon à la condition LPS. * p < 0,05, ** p < 0,01.

Les concentrations en cytokines ont ensuite été mesurées dans les surnageants cellulaires. Les résultats montrent que l'exposition au LPS a induit la sécrétion des trois cytokines mesurées avec des concentrations respectives de 750, 76 034 et 16 285 pg.mL⁻¹ pour l'IL-10, l'IL-8 et le TNF- α . La dexaméthasone, utilisée comme témoin positif, a permis de réduire les niveaux de toutes les cytokines, et ce, de façon significative pour le TNF- α . Concernant les échantillons testés, les surnageants des macérations contrôles à 0 et 24 h ont induit une réduction significative des sécrétions d'IL-10 et de TNF- α . Toutefois, pour l'IL-8, les macérations contrôles ont montré un effet similaire à celui de la dexaméthasone, avec des concentrations comprises entre 39 881 et 52 326 pg.mL⁻¹. Pour les trois cytokines testées, les surnageants de fermentation ont induit une réduction moins importante de leur concentration que celle observée avec les macérations contrôles. Cependant, ils ont entraîné une diminution plus prononcée que celle observée avec la dexaméthasone pour l'IL-10. Bien que les tendances soient différentes entre les trois cytokines, les souches 46a et RC16 ont engendré les niveaux de sécrétion les plus faibles, suggérant une activité anti-inflammatoire plus élevée par rapport aux autres souches.

3.4. Caractérisation des surnageants de fermentation des trois souches sélectionnées par approche métabolomique

La caractérisation des surnageants de fermentation, obtenus avec les souches 31c, 46a et RC16, a été effectuée par LC/MS (**Figure 37**).

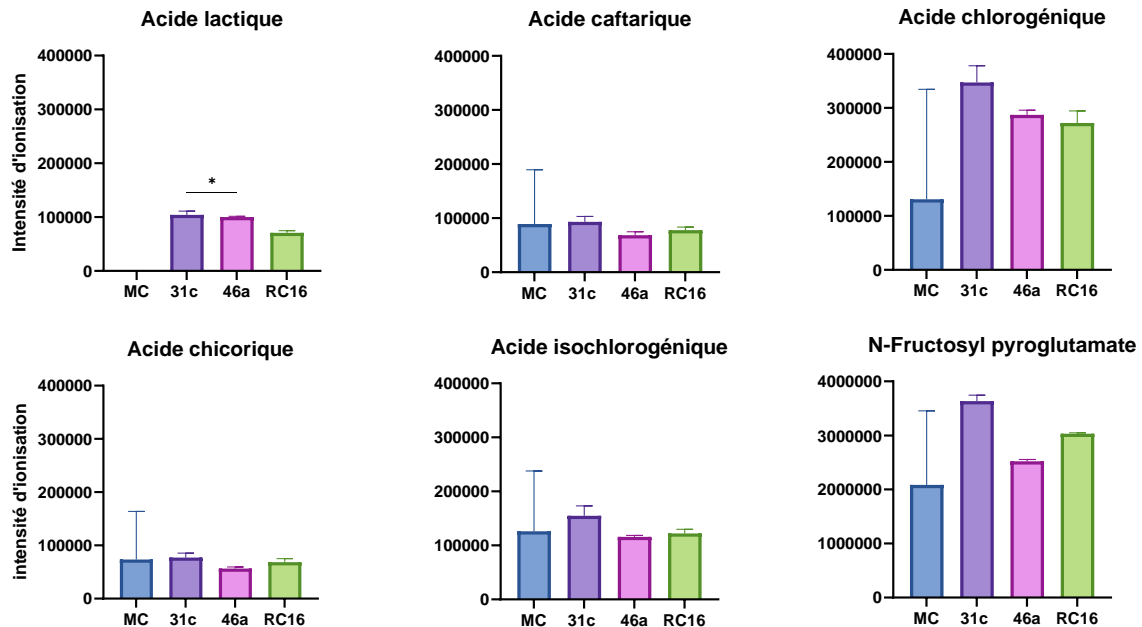


Figure 37 : Caractérisation des surnageants de fermentation en acide lactique, en acides hydroxycinnamiques et en N-Fructosyl pyroglutamate.

L'intensité d'ionisation fait référence à la quantité d'ions produits par une source d'ionisation. Les surnageants des macérations contrôles et des fermentations proviennent des fermentations réalisées en erlenmeyer durant 24 h à 37 °C sous agitation, avec les trois souches sélectionnées et inoculées à 5 X. Statistiques : les valeurs sont les moyennes ± écarts-types (N=3). Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn ont été réalisés, les statistiques ont été effectuées en comparant chaque fermentation aux macérations contrôles, $p^* < 0,05$.

Cette analyse a montré que tous les surnageants de fermentation contenaient de l'acide lactique, alors que les surnageants des macérations contrôles n'en contenaient pas, confirmant ainsi la capacité des souches à métaboliser une partie du substrat présent dans le milieu contenant les épiluchures d'endives. De plus, des acides hydroxycinnamiques caractéristiques de la chicorée ont été identifiés, notamment l'acide chicorique, l'acide chlorogénique, l'acide isochlorogénique et l'acide caftarique. Les contenus en acides caftarique, chicorique et isochlorogénique ne semblent pas être affectés par la fermentation réalisée avec les trois souches testées.

En revanche, la quantité d'acide chlorogénique a été augmentée par la fermentation, avec une intensité d'ionisation multipliée par un facteur de 2 à 2.6 par rapport à celles observées pour les macérations contrôles. Un autre composé, le N-fructosyl pyroglutamate, probablement issu de la réaction de Maillard, a également été détecté dans tous les surnageants, avec une abondance plus élevée après fermentation.

3.5. Analyse en composantes principales des fermentations d'épluchures d'endives réalisées en erlenmeyer

Afin de sélectionner les souches les plus pertinentes pour la suite du projet, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée en tenant compte de la croissance mesurée par acidification et par dénombrement, de l'activité hépato-protectrice évaluée sur les cellules HepG2, des activités antioxydantes mesurées sur les cellules HepG2 et Caco-2 ainsi que du contenu en acides phénoliques mesuré par HPLC. L'addition des deux dimensions correspondant à la variance totale est de 78,41 %, il est donc possible de l'utiliser afin de cribler les souches de *Lactobacillus* (**Figure 38**).

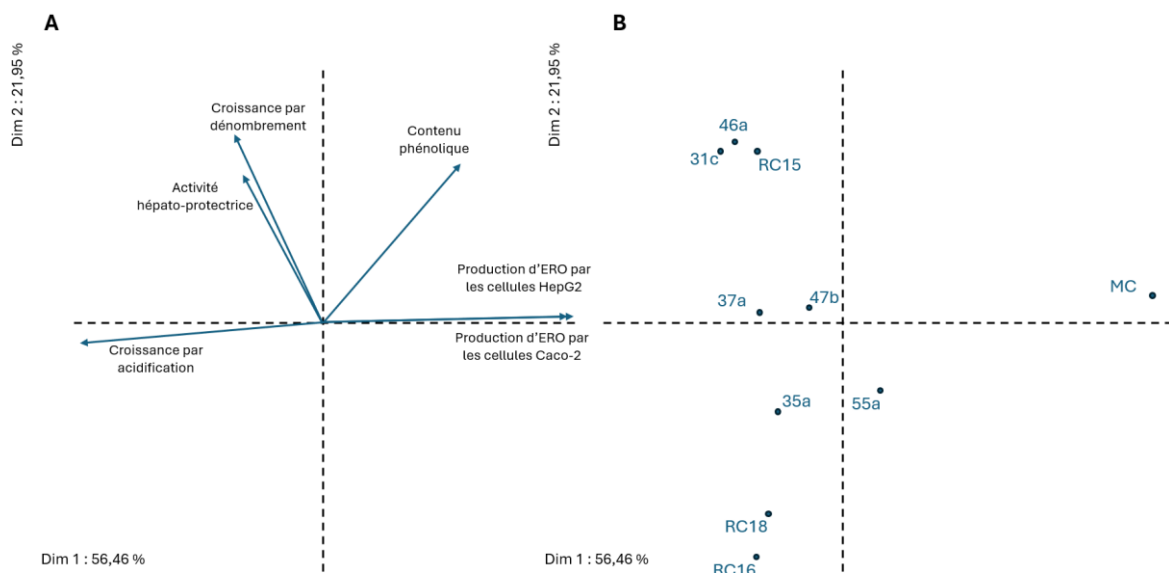


Figure 38 : Analyse en composantes principales réalisée à partir des données de croissance, de caractérisation et de bioactivités obtenues à partir des fermentations d'épluchures d'endives.

A : analyse en composantes principales en fonction des variables de croissance et de bioactivités. **B** : analyse en composantes principales en fonction des souches de *Lactobacillus*. Dans cette ACP, les paramètres qui ont été pris en compte correspondent à l'évaluation de la croissance par Δ pH et par dénombrement, les activités antioxydantes évaluées sur les cellules HepG2 et Caco-2, l'activité hépato-protectrice évaluée sur les cellules HepG2 ainsi que le contenu en acide phénolique déterminé par HPLC.

Les résultats présentés dans la **Figure 38A** ont permis de montrer que les croissances mesurées par acidification et dénombrement étaient corrélées positivement à l'activité hépato-protectrice par un angle aigu entre les vecteurs représentant les différentes variables. Au contraire, les croissances ainsi que l'activité hépato-protectrice sont corrélées de façon négative avec la production d'ERO par les cellules HepG2 et Caco-2. Cette production étant inversement proportionnelle à l'activité antioxydante, cela signifie que l'activité est corrélée positivement à la croissance et à l'activité hépato-protectrice. Cependant, les activités antioxydantes correspondant à l'inverse de la production d'ERO sont corrélées négativement au contenu phénolique. Comme attendu, les macérations contrôles sont isolées, car elles sont corrélées négativement avec la croissance et les activités. Les souches de *L. plantarum* 31c et 46a sont celles ayant montrées les croissances et les activités hépato-protectrices les plus élevées. Les souches de *L. reuteri* RC16 et RC18, provenant de l'isolement du biote de l'endive, ont engendré des teneurs moins élevées pour certains acides phénoliques, ainsi qu'une activité hépato-protectrice moins importante, ce qui pourrait expliquer leur position au sein de l'ACP.

Les résultats du screening des souches de *Lactobacillus* ont conduit à la sélection de trois souches pour la poursuite du projet. Les souches de *L. plantarum* 31c et 46a, ainsi que la souche de *L. reuteri* RC16 ont ainsi été retenues. Ce choix permet de conserver des souches représentatives de chaque espèce et une souche provenant du biote de l'endive.

4. Optimisation des paramètres de fermentation

Afin d'optimiser le processus de fermentation, différents paramètres ont été évalués. Tout d'abord, la concentration optimale en épluchures d'endives dans le milieu a été testée avec des concentrations de 15, 25 et 35 g.L⁻¹. Ensuite, des durées de fermentation de 12, 24, 36, 48 et 72 h, ainsi que des concentrations en inoculum bactérien de 1, 5, et 10 X (correspondant à des DO_{600 nm} de 0,3 ; 1,5 et 3) ont été étudiées. Les souches de *L. plantarum* 31c et 46a et la souche de *L. reuteri* RC16 ont été utilisées pour tester les différentes durées de fermentation. Pour l'étude couplant la concentration d'inoculum au temps de fermentation, seule la souche de *L. plantarum* 31c a été utilisée.

4.1. Évaluation de la croissance

Les variations de pH (ΔpH) observées lors des fermentations d'épluchures d'endives en fonction du temps (**Figure 39A**) étaient comprises entre -0,59 à -0,48 après 24 h de fermentation, entre -0,39 à -0,33 après 48 h, et enfin entre -0,28 à -0,25 après 72 h. Pour l'évaluation de la croissance (**Figure 39B**) par dénombrement, les résultats sont cohérents avec les mesures de pH. Les trois souches se sont développées jusqu'à 24 h de fermentation, avec un maximum de $6,2 \cdot 10^9$ UFC.mL⁻¹ pour la souche 46a. Après 24 h, les trois souches étaient en phase de déclin jusqu'à 72 h. Les mesures de pH des fermentations en fonction de l'inoculum de départ (**Figure 39C**) ont montré que l'acidification était importante après 12 h de fermentation, car la diminution du pH par rapport aux macérations contrôles était de -1,47. Après 12 h, le pH a faiblement diminué (-1,49 à 24 h) avant de remonter très légèrement (-1,44 à 72 h). Il y a bien une cohérence entre la mesure de pH et le dénombrement, car le développement des souches (**Figure 39D**) a atteint son maximum après 12 h de culture avec $8,8 \cdot 10^{10}$ UFC.mL⁻¹ pour un inoculum de 10 X et $1,85 \cdot 10^9$ UFC.mL⁻¹ pour l'inoculum de 5 X. À partir de 24 h, la croissance a décliné pour l'ensemble des conditions.

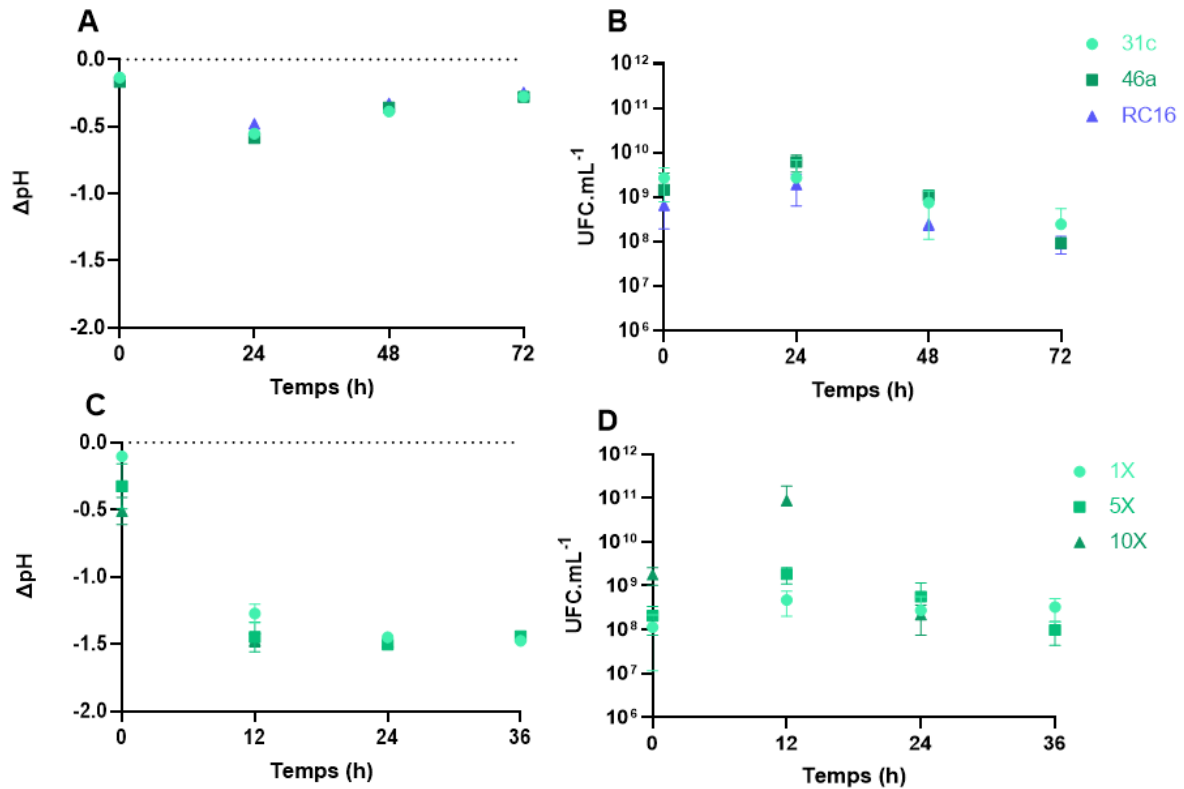


Figure 39 : Suivi de la croissance lors des fermentations d'épluchures d'endives en fonction du temps et de la concentration initiale en inoculum.

A : acidification des surnageants de fermentation en fonction des macérations contrôles et du temps de fermentation. **B** : croissance par dénombrement en fonction du temps de fermentation. **C** : acidification des surnageants de fermentation en fonction des macérations contrôles et de la concentration en inoculum de départ. **D** : croissance par dénombrement en fonction de la concentration en inoculum de départ. Les graphiques **A** et **B** ont été réalisés à partir des fermentations d'épluchures d'endives par les trois souches sélectionnées (31c, 46a et RC16). Pour les graphiques **C** et **D**, les fermentations d'épluchures d'endives ont été effectuées avec la souche 31c. Les valeurs sont les moyennes \pm écarts-types (N=3).

4.2. Évaluation de l'activité antioxydante sur les cellules hépatiques HepG2

Afin de sélectionner les meilleurs paramètres de fermentation, l'activité antioxydante sur les cellules hépatiques a, dans un premier temps, été mesurée avec les surnageants de fermentations d'épluchures d'endive obtenus avec les souches 31c, 46a et RC16, dans le but de déterminer le temps optimal de fermentation (21, 48 ou 72 h). Dans un second temps, les fermentations effectuées avec la souche 31c ont servi à déterminer la meilleure concentration de l'inoculum de départ (1, 5 et 10 X). Les échantillons ont été mis au contact des cellules à des concentrations non cytotoxiques.

Les résultats montrent que l'AAPH a provoqué une oxydation des cellules, entraînant une production d'ERO par les cellules HepG2, significativement plus élevée que celle mesurée en présence du milieu HBSS seul. En revanche, la quercétine, utilisée comme témoin positif, a permis de réduire la production d'ERO induite par l'AAPH, ramenant cette production à un niveau similaire à celui mesuré dans les cellules non oxydées (Figure 40).

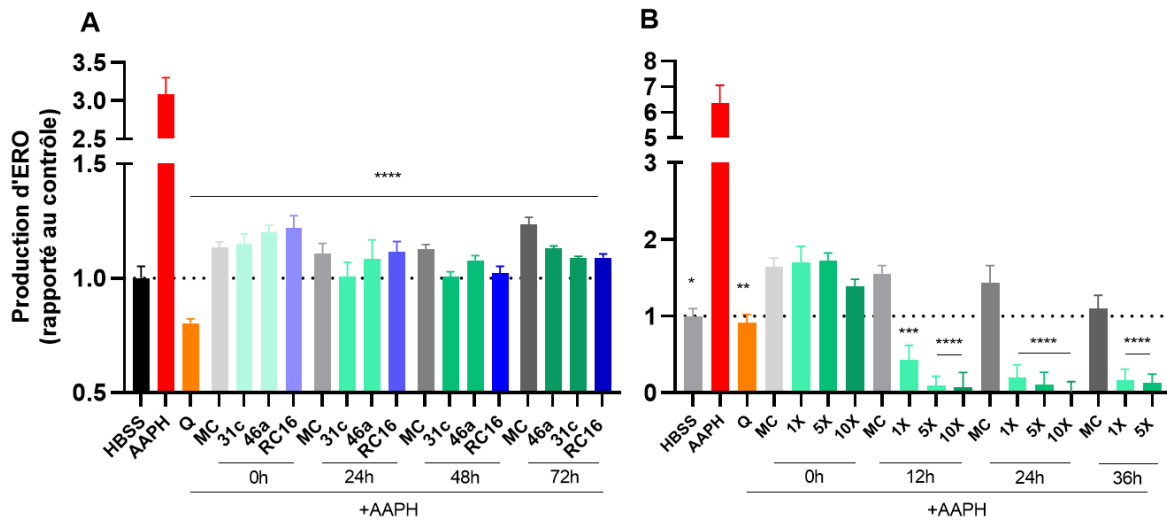


Figure 40 : Activité antioxydante des surnageants de fermentation des souches 31c, 46a et RC16 sur les cellules HepG2 à différents temps de fermentation, et de concentrations d'inoculum de départ.

A : production d'ERO par les cellules HepG2 en fonction du temps de fermentation des épiluchures d'endives par les souches 31c, 46a et RC16 inoculées à 1 X, **B :** production d'ERO par les cellules HepG2 en fonction de la concentration en inoculum de départ et du temps de fermentation des épiluchures d'endives par la souche 31c. En gris : macérations contrôles, en vert : *L. plantarum*, en bleu : *L. reuteri*. AAPH à 1 200 μM , Q : quercétine à 100 μM . Les surnageants de fermentation et les macérations contrôles ont été dilués au quart dans les puits de plaque. Les résultats sont exprimés en fonction de valeurs obtenues pour le contrôle, ramenés à 1. L'ensemble de ces tests ont été réalisés sur des cellules à des passages compris entre P17 et P24. Statistiques : Les valeurs sont les moyennes \pm écarts-types (N=3, n=3). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn pour comparer chaque échantillon à la condition AAPH, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.

Concernant les macérations contrôles, leur activité antioxydante est comparable à celle de la quercétine, avec des niveaux de production d'ERO compris entre 1,1 et 1,64 par rapport à celui du contrôle HBSS. Le temps de culture n'a pas influencé l'activité antioxydante des surnageants de culture. En revanche, une augmentation de la concentration de départ en inoculum a entraîné une activité antioxydante significativement plus élevée après 24 h de culture. Cependant, la différence d'activité

entre les différents surnageants de culture obtenus avec des concentrations en inoculum de départ de 5 et 10 X reste minime.

4.3. Évaluation de l'activité hépato-protectrice des surnageants de fermentation sur les cellules HepG2

Afin d'évaluer l'activité hépato-protectrice des surnageants de culture, mis au contact des cellules à des concentrations non cytotoxiques, un stress oxydatif a été induit sur les cellules HepG2 à l'aide de l'éthanol comme précédemment mis au point. Comme attendu, l'éthanol a provoqué une réduction significative de la viabilité cellulaire de l'ordre de 80 % par rapport au contrôle ne contenant que du milieu de culture (**Figure 41**).

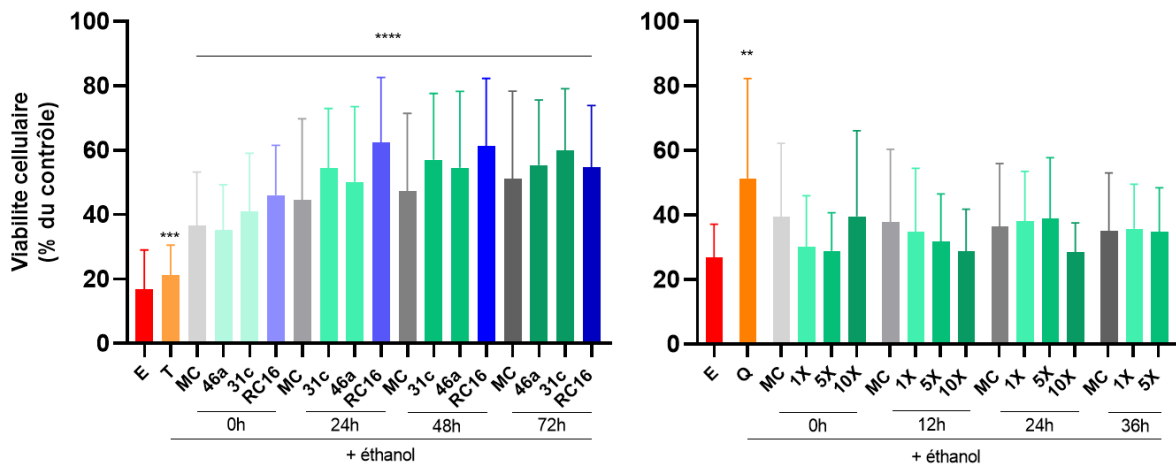


Figure 41 : Activité hépato-protectrice des surnageants de fermentation en fonction de la concentration en inoculum de départ et du temps de fermentation sur les cellules HepG2.

A : activité hépato-protectrice en fonction du temps de fermentation des épluchures d'endives par les souches 31c, 46a et RC16 inoculées à 1 X, **B :** activité hépato-protectrice en fonction de la concentration en inoculum de départ et du temps de fermentation des épluchures d'endives par la souche 31c. E : éthanol à 1,95 mM, T: Trolox à 100 μ M, Q : quercétine à 100 μ M. En gris : macérations contrôles, en vert : *L. plantarum*, en bleu : *L. reuteri*. Les valeurs sont les moyennes \pm écarts-types (N=6, n=3). L'ensemble de ces tests ont été réalisés sur des cellules à des passages compris entre P15 et P35. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn pour comparer chaque échantillon à la condition éthanol. ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Le Trolox et la quercétine, utilisés comme témoins, ont diminué le stress oxydatif induit par l'éthanol de façon significative. Bien que les écarts-types soient importants, l'ensemble des conditions testées (**Figure 41A**), a conduit à une amélioration significative de la viabilité cellulaire par rapport à la condition éthanol. Cependant, aucune différence

n'a été observée entre les différents temps de fermentation, malgré une tendance à l'amélioration après celle-ci. En revanche, la concentration en inoculum de départ n'a pas influencé significativement l'activité hépato-protectrice des surnageants.

À la suite de ces optimisations, les paramètres de fermentation ont été sélectionnés. Une concentration de 25 g.L⁻¹ en épluchures d'endives dans le milieu a été retenue, car aucune différence significative n'a été observée entre les différentes concentrations testées. Concernant le temps de fermentation, une durée de 24 h a été choisie, car elle a permis d'obtenir des activités antioxydante et hépato-protectrice significativement plus importantes. Enfin, un inoculum bactérien de départ de 5 X, correspondant à une DO_{600 nm} de 1,5, a été sélectionné. Cette concentration s'est révélée plus efficace que celle de 1 X et aussi efficace que celle de 10 X, tout en étant plus simple à mettre en œuvre à la fois à petite et grande échelle.

5. Évaluation de la croissance au cours des fermentations réalisées en bioréacteurs avec les paramètres précédemment sélectionnés

Après avoir réalisé des fermentations en Deepwell, dans un volume de 5 mL, puis en erlenmeyer, dans un volume de 20 mL, une dernière montée en échelle a été réalisée avec des fermentations en bioréacteurs avec un volume final de 300 mL. Les fermentations d'épluchures d'endives concentrées à 25 g.L⁻¹ ont été réalisées en bioréacteurs avec un inoculum initial de 5 X (1,5 de DO_{600 nm} final) pendant 24 h. Les milieux sont maintenus à un pH de 5, par ajout de NaOH, à 37°C, en condition anaérobie et sous agitation à 300 rpm. Il n'est donc pas possible d'évaluer la croissance des souches de *Lactobacillus* par mesure de pH mais uniquement par dénombrement à partir de prélèvements effectués à 0, 6, 19 et 24 h de fermentation (**Figure 42**). La souche 31c s'est développée jusque 6 h pour atteindre un maximum de 5,85.10⁸ UFC.mL⁻¹, ensuite elle a diminué jusqu'à 5,05.10⁸ UFC.mL⁻¹. La souche 46a, quant à elle, s'est développée jusque 19 h, pour ensuite décroître jusque 24 h et atteindre 3,45.10⁸ UFC.mL⁻¹. Pour finir la souche RC16 a décré jusque 24h pour atteindre 2,95.10⁸ UFC.mL⁻¹.

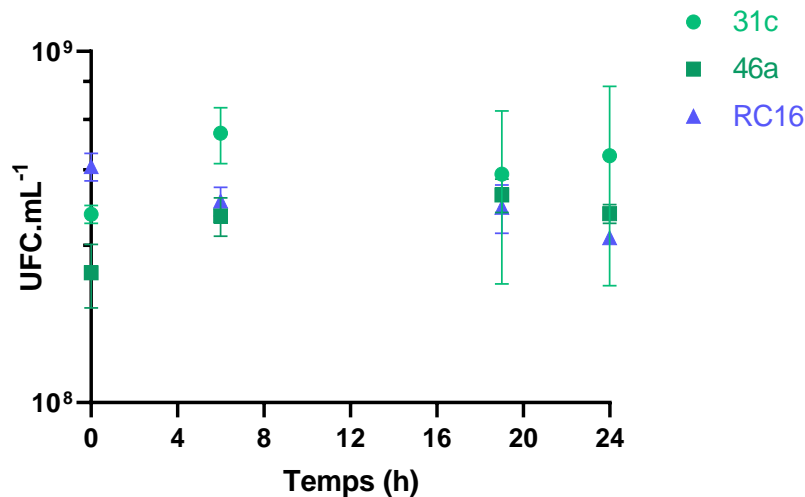


Figure 42 : Croissances des souches de *Lactobacillus* durant la fermentation sur milieu EEBU en bioréacteur.

En vert : *L. plantarum*, en bleu : *L. reuteri*, les fermentations d'épluchures d'endives par les souches 31c, 46a et RC16 inoculées à 5 X, ont été réalisées dans un volume de 300 mL à 37°C durant 24 h, sous une agitation de 300 rpm et à un pH de 5. Les valeurs sont les moyennes ± écarts-type (N=3).

6. Optimisation de la croissance des *Lactobacillus*

6.1. Détermination des auxotrophies en acides aminés et en vitamines des souches de *Lactobacillus* sélectionnées

L'ensemble des résultats précédemment présentés ont révélé une croissance assez faible et un déclin rapide de la population cellulaire (entre 12 et 24 h de fermentation) sur le milieu uniquement composé de feuilles d'endives. Afin d'améliorer la croissance des souches sélectionnées, les auxotrophies en acides aminés et en vitamines ont été évaluées pour les souches de *L. plantarum* 31c et 46a, ainsi que pour la souche de *L. reuteri* RC16. Le but était de compléter le milieu de fermentation, contenant uniquement des épluchures d'endives et du PBS, avec les acides aminés et les vitamines nécessaires à une meilleure croissance.

Les résultats présentés dans la **Table 8** ont montré que les trois souches de *Lactobacillus* ont été capables de croître sur le milieu MB complet.

Table 8 : Croissances des souches de *Lactobacillus* en absence d'un acide aminé ou d'une vitamine.

Acide aminé	31c	46a	RC16	Vitamine	31c	46a	RC16
Milieu MB contenant l'ensemble des acides aminés et des vitamines					+	+	+
Glycine (Gly)	+	+	+	Biotine (B8)	+	+	+
Serine (Ser)	+	+	+	Acide pantothénique (B5)	+	+	-
Thréonine (Thr)	+	+	+	Niacine (B3)	+	+	+
Asparagine (Asn)	+	+	+	Acide folique (B9)	+	+	+
Glutamine (Gln)	+	+	+	Cobalamine (B12)	+	+	+
Acide glutamique (Glu)	+	+	+	Vitamine K	+	+	+
Acide aspartique (Asp)	+	+	+	Acide nicotinique (B3)	+	+	+
Lysine (Lys)	+	+	+	Pyridoxine (B6)	+	+	+
Arginine (Arg)	+	+	+	Acide aminobenzoïque (B10)	+	+	+
Histidine (His)	+	+	+	Thiamine (B1)	+	+	+
Cystéine (Cys)	+	+	+	Riboflavine (B2)	+	+	+
Méthionine (Met)	-	-	-				
Tryptophane (Trp)	+	+	+				
Phénylalanine (Phe)	+	+	+				
Tyrosine (Tyr)	+	+	+				
Alanine (Ala)	+	+	+				
Valine (Val)	-	-	-				
Leucine (Leu)	-	+	+				
Isoleucine (Ile)	+	+	+				
Proline (Pro)	+	+	+				

+ : croissance en absence de l'acide aminé ou de la vitamine soustraite, *-* : absence de croissance en absence de l'acide aminé ou de la vitamine soustraite.

Cependant, des différences importantes ont été observées dans des milieux dépourvus de certains acides aminés et vitamines. Ainsi, la souche 31c ne s'est pas développée sur les milieux sans méthionine, sans valine ou sans leucine. La souche 46a n'a pas été capable de croître en absence de méthionine et de valine. Enfin, la souche RC16 ne s'est pas développée sans valine, sans méthionine et sans vitamine B5. Cette expérience a permis de mettre en évidence que les souches 31c, 46a et RC16 présentaient des

auxotrophies pour les acides aminés méthionine, valine et leucine, ainsi que pour la vitamine B5. Il apparaît donc nécessaire de compléter le milieu de culture EEBU en sources d'azote exogène, soit en ajoutant ces acides aminés et cette vitamine, soit en ajoutant de l'extrait de levure ou de la peptone.

6.2. Suivi de croissance en milieu complétementé

6.2.1. Complémentation du milieu MB en extrait de levure

Afin d'optimiser la croissance des souches de *Lactobacillus*, une supplémentation en extrait de levure a été effectuée afin de pallier aux auxotrophies en acides aminés et en vitamines précédemment identifiées. De plus, l'impact du milieu de préculture a également été évalué. Lors de ce test, 5 conditions ont été testées : MB MB (préculture en MB, suivi de croissance en MB), MB MBE (préculture en MB, suivi de croissance en MB complétementé en extrait de levure à 2 g.L⁻¹), MB MRS (préculture en MB, suivi de croissance en MRS), MRS MB (préculture en MRS, suivi de croissance en MB) et MRS MRS (préculture en MRS, suivi de croissance en MRS). L'ensemble de ces croissances ont été réalisées en erlenmeyers inoculés à une DO_{600 nm} de 0,3 avec les souches 31c, 46a ou RC16. Ces croissances ont été suivies pendant 24 h, et incubées à 37 °C, en condition anaérobie et sous agitation. Les résultats montrent que les conditions MB MB et MRS MB n'ont pas permis aux trois souches de *Lactobacillus* de croître. Lorsque le milieu était supplétementé en extrait de levure, la croissance mesurée par DO_{600 nm} a augmenté de 0,3 à respectivement 3,7 ; 2,77 et 2,91 pour les souches 31c, 46a et RC16. Quand la culture a été réalisée en milieu MRS, qui est le milieu préconisé pour ce type de bactéries, la croissance était beaucoup plus élevée. Cependant, une différence est visible en fonction du milieu de préculture utilisé, lorsque la préculture a été effectuée en MB, la croissance la plus élevée se caractérisait par une DO_{600 nm} mesurée de 6,89 après 24 h, alors que pour la même souche, quand la préculture était réalisée en MRS, la croissance se caractérisait par une DO_{600 nm} de 16,9. Concernant l'acidification après 24 h de croissance (**Figure 43D**), des différences sont également observables en fonction du milieu de préculture utilisé.

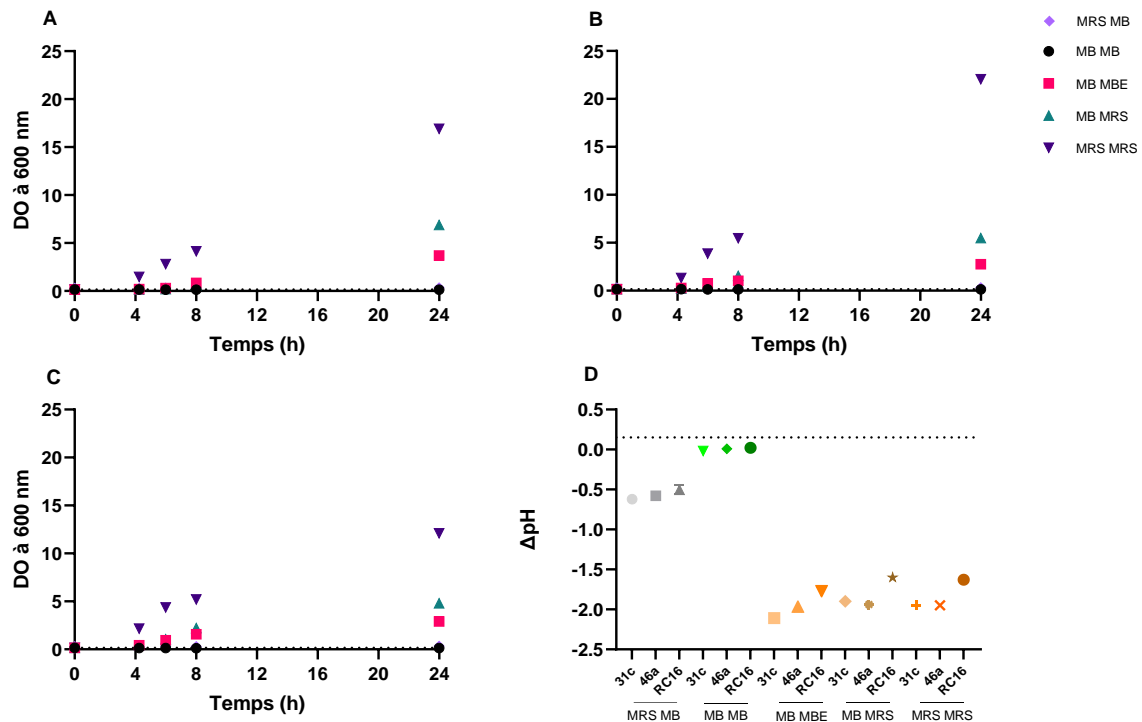


Figure 43 : Croissance des souches de *Lactobacillus* en milieu MB complémenté ou non, ou en milieu MRS.

Pour **A** : souche 31c, **B** : souche 46a, **C** : souche RC16, la croissance a été mesurée par densité optique. **D** : acidification du milieu par rapport aux macérations contrôles. MRS MB : précultures réalisées en milieu MRS, puis croissances réalisées en milieu MB. MB MB : précultures réalisées en milieu MB complet, puis croissances réalisées en milieu MB. MB MBE : précultures réalisées en milieu MB complet, puis croissances réalisées en milieu MB complémenté en extrait de levure à 5 g.L⁻¹. MB MRS : précultures effectuées en milieu MB complet, puis croissances réalisées en milieu MRS. MRS MRS : précultures effectuées en milieu MRS, puis croissances réalisées en milieu MRS. L'ensemble des milieux a été inoculé à 0,15 de DO_{600 nm}, et les croissances ont été suivies pendant 24 h à 37 °C en condition anaérobie et sous agitation.

En effet, la condition MB MB ne permet pas d'acidification alors que la condition MRS MB permet une diminution de pH de 0,5. En revanche, les croissances réalisées en milieu MRS et en milieu MB supplémenté en extrait de levure ont permis une acidification pouvant atteindre deux unités de pH. La supplémentation du milieu MB en extrait de levure permet donc d'améliorer la croissance des souches de *Lactobacillus* ainsi qu'une acidification similaire à celle observée pour les cultures réalisées en milieu MRS. De plus, une préculture en milieu MRS permet donc une meilleure croissance et une meilleure acidification, ce qui suggère une meilleure adaptabilité métabolique.

6.2.2. Complémentation du milieu de fermentation contenant les épiluchures d'endives en extrait de levure

Après avoir observé une amélioration de la croissance des souches de *Lactobacillus* lorsque le milieu MB a été supplémenté en extrait de levure, ce dernier a été ajouté à différentes concentrations dans le milieu EEBU. Afin de comparer les croissances obtenues en EEBU supplémenté, des cultures en milieu MB supplémenté en glucose à 10 g.L^{-1} ont été réalisées comme témoins. La **Figure 44** met en évidence les différences de croissances observées entre les trois souches.

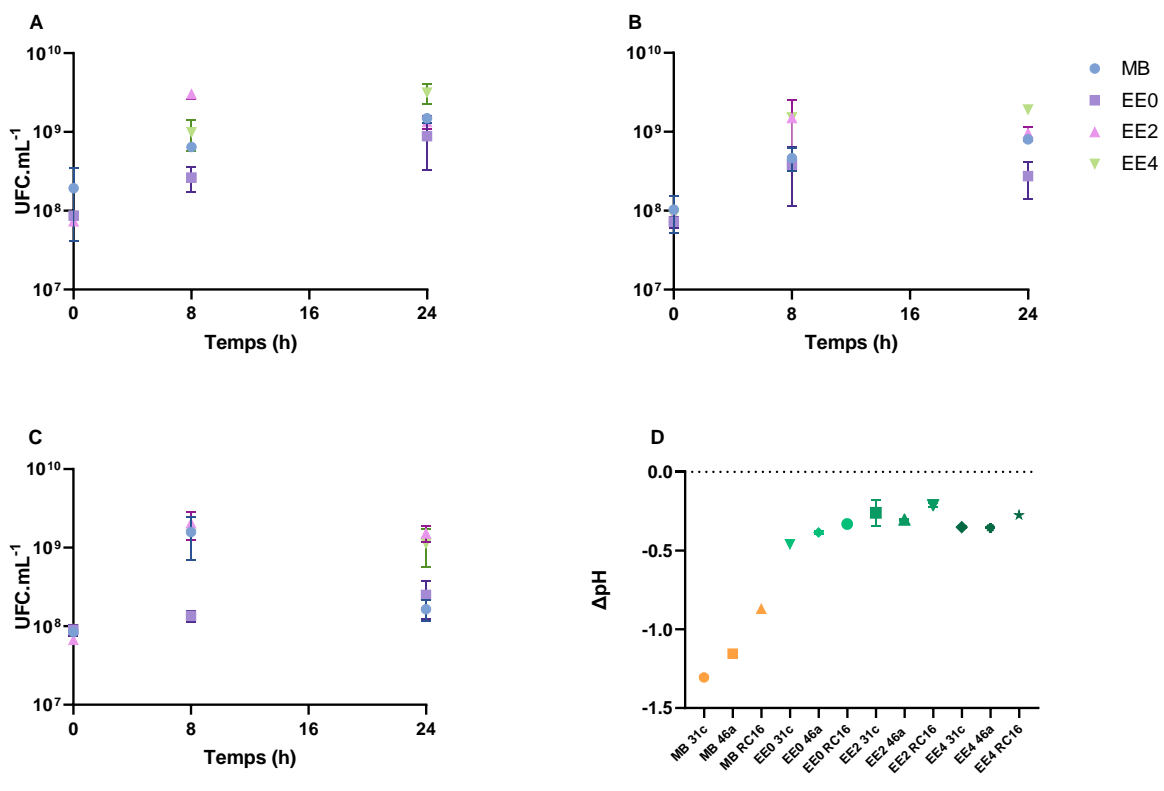


Figure 44 : Croissance des souches de *Lactobacillus* en fonction de la concentration en extrait de levure dans les milieux contenant les épiluchures d'endives et le milieu MB.

Pour **A** : souche 31c, **B** : souche 46a, **C** : souche RC16, la croissance a été mesurée par dénombrements. **D** : acidification du milieu par rapport aux macérations contrôles, par mesure de pH. MB : milieu de base supplémenté en extrait de levure à 2 g.L^{-1} et en glucose à 10 g.L^{-1} . EE0 : milieu composé d'épiluchures d'endives à 25 g.L^{-1} sans extrait de levure. EE2 : milieu composé d'épiluchures d'endives à 25 g.L^{-1} supplémenté en extrait de levure à 2 g.L^{-1} . EE4 : milieu composé d'épiluchures d'endives à 25 g.L^{-1} supplémenté en extrait de levure à 4 g.L^{-1} . L'ensemble des milieux a été inoculé à 0,3 de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$, et les croissances ont été suivies pendant 24 h à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en condition anaérobie et sous agitation.

Pour la souche 31c (**Figure 44A**), le milieu contenant 2 g.L^{-1} d'extrait de levure a permis la croissance la plus rapide avec $3,025 \cdot 10^9 \text{ UFC.mL}^{-1}$. Après 24 h de fermentation, c'est le

milieu contenant 4 g.L^{-1} d'extrait de levure qui a induit la croissance la plus importante, atteignant $3,15 \cdot 10^9 \text{ UFC.mL}^{-1}$. Les milieux MB et EE2 ont permis des croissances après 24 h similaires et le milieu EE0, ne contenant pas d'extrait de levure, a conduit à la croissance la plus faible. La **Figure 44B** correspondant à la souche 46a montre les mêmes résultats pour la souche 31c après 24 h. Cependant après 8 h de fermentation, les milieux EE2 et EE4 ont conduit à des croissances similaires. La souche RC16 (**Figure 44C**) s'est mieux développée dans le milieu EE2 après 8 h, viennent ensuite les milieux MB et EE4 puis le milieu EE0. Après 24 h, le milieu EE2 a permis les croissances les plus importantes, suivi du milieu EE4 et des milieux MB et EE0. Pour l'ensemble des souches, les milieux induisant les meilleures croissances sont les milieux EE2 et EE4, avec une augmentation de plus d'un log par rapport au $T=0 \text{ h}$. *A contrario*, le milieu induisant la plus faible croissance est le milieu EE0, sans extrait de levure, avec une augmentation de moins d'un log. Concernant la diminution du pH après 24 h de fermentation, la croissance bactérienne dans le milieu contenant les épluchures d'endives induisait des acidifications similaires allant de -0,46 à -0,21 par rapport aux macérations contrôles, et ce pour l'ensemble des souches. La présence et la concentration en extrait de levure n'influencent pas l'acidification finale. En revanche, la croissance bactérienne en milieu MB, qui est le seul milieu supplémenté en glucose, a conduit à une acidification plus importante, allant de -1,31 à -0,87 par rapport à celles des macérations contrôles. En observant ces résultats et en tenant compte des auxotrophies des souches, l'importance de supplémenter le milieu de culture avec une source d'azote exogène est mise en évidence, les extraits d'endive n'apportant pas suffisamment ces éléments pour assurer une bonne croissance des souches.

7. Impacts de la digestion et du passage de la barrière intestinale sur les bioactivités des surnageants des fermentations réalisées en bioréacteurs

Un ingrédient santé doit être capable d'exercer ses effets bénéfiques après le processus de digestion gastro-intestinale. Certaines molécules actives doivent traverser la barrière intestinale pour atteindre leur cible dans l'organisme, tandis que d'autres peuvent agir directement dans la lumière intestinale ou au niveau des entérocytes. Il est donc essentiel d'étudier l'impact de la digestion et les interactions qui se produisent au niveau de la barrière intestinale. Ainsi, une digestion gastro-intestinale des surnageants de fermentation a été réalisée à l'aide du protocole de DGIS. De plus, un modèle de barrière intestinale composé d'une coculture de cellules Caco-2/HT29-MTX a été utilisé pour étudier le devenir des molécules et leurs bioactivités après passage au travers de la barrière intestinale (**Figure 45**).

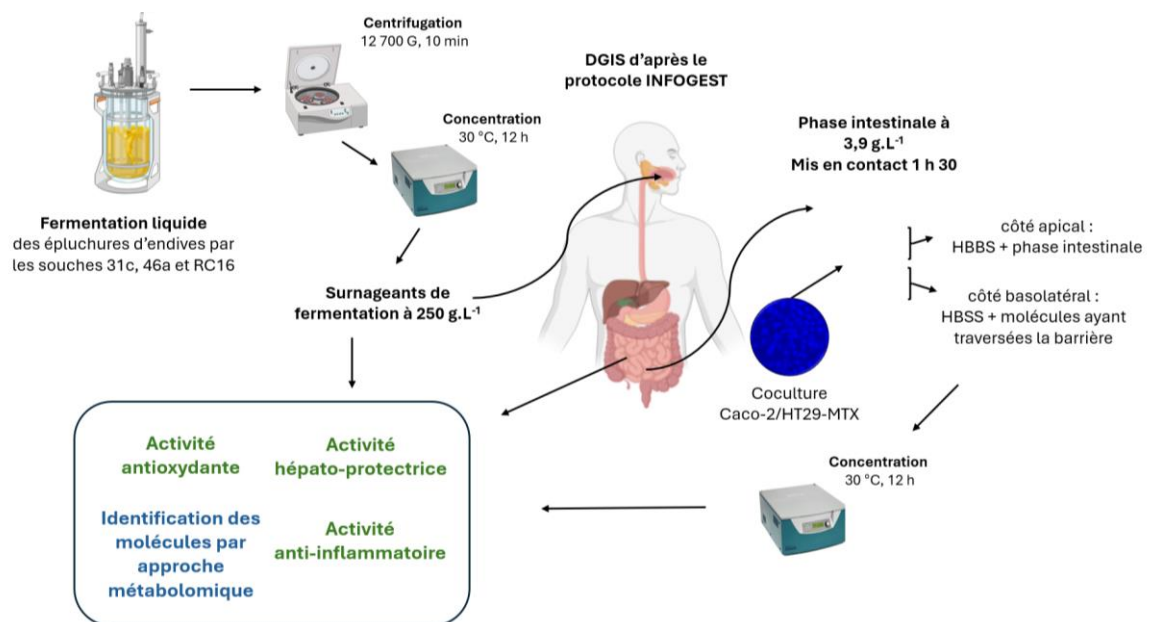


Figure 45 : Démarche expérimentale adoptée pour étudier l'impact de la digestion gastro-intestinale et du contact avec la barrière intestinale sur les activités biologiques des surnageants de fermentation.

Les surnageants de fermentation des épluchures d'endives réalisées avec les souches 31c, 46a et RC16, réalisées en bioréacteurs, ont été digérés *in vitro*, et la phase intestinale a été mise au contact de la coculture Caco-2/HT29-MTX qui mime la barrière intestinale. La mesure des activités antioxydante, hépato-protectrice et anti-inflammatoire ainsi que la caractérisation par approche métabolomique ont été réalisées sur les échantillons récoltés à l'issue de la fermentation, de la digestion et après passage de la barrière intestinale.

7.1. Intégrité de la barrière intestinale et mesure de la perméabilité des jonctions serrées au contact des digestats

Les surnageants des fermentations d'épluchures d'endive réalisées en bioréacteurs avec les souches 31c, 46a et RC16 pendant 24 h, ainsi que les macérations contrôles ont d'abord été soumis à une DGIS. Une digestion blanche, ne contenant que les enzymes digestives, a également été réalisée. Pour étudier les bioactivités après passage de la barrière intestinale, un modèle de barrière intestinale a été mis en place à l'aide d'une coculture de cellules Caco-2/HT29-MTX. Au préalable, des tests de cytotoxicité ont été effectués afin de s'assurer que les différents échantillons mis au contact de la coculture ne présentent pas de toxicité pour les cellules. À l'issue de ce test, les surnageants de digestion, à une concentration de $3,9 \text{ g.L}^{-1}$ de matière sèche, ont été utilisés. Dans un premier temps, il a été nécessaire de vérifier l'intégrité de la monocouche de cellules intestinales cultivées sur inserts. La mesure de TEER a été utilisée à cet effet. Si la valeur de TEER était supérieure à $500 \Omega.\text{cm}^{-2}$, ce qui correspond à une valeur de 450Ω pour les inserts utilisés dans cette expérience, ces derniers étaient considérés comme intègres. Les résultats, présentés dans la **Figure 46A**, montrent que les échantillons testés n'ont pas affecté l'intégrité de la barrière intestinale après un de temps de contact de 1 h 30. La valeur la plus basse de TEER ($647 \Omega.\text{cm}^{-2}$) a été obtenue pour les digestats des macérations contrôles après 1 h 30 de contact avec la coculture. Les résultats ont également montré que la TEER diminuait à partir de 30 minutes de contact avec les échantillons, avec une diminution moyenne d'environ $200 \Omega.\text{cm}^{-2}$ après 1 h 30 de contact.

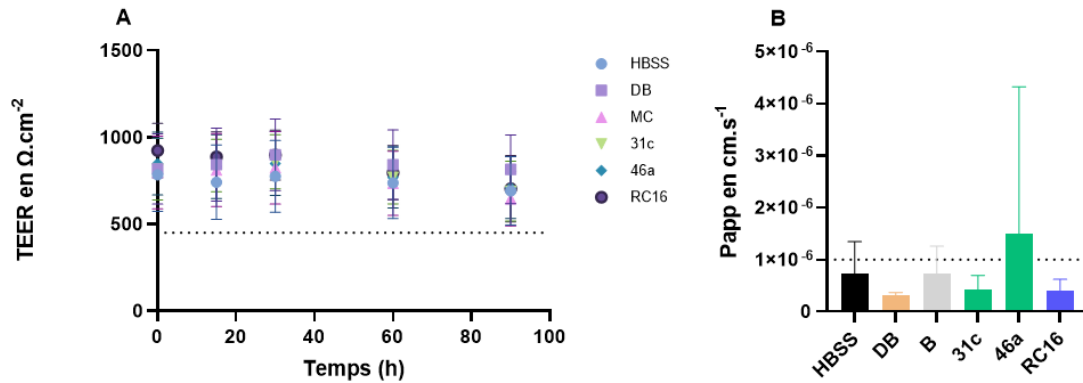


Figure 46 : Vérification de l'intégrité et de la perméabilité apparente de la coculture Caco-2/HT29-MTX.

A : évaluation de l'intégrité de la barrière intestinale par mesure de la TEER en $\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$, durant les 1 h 30 de contact avec les surnageants de digestion. **B** : mesure de la perméabilité apparente de la barrière intestinale par la lucifer yellow, après 1 h 30 de contact avec les surnageants de digestion. Le passage de la barrière intestinale a été effectué avec les surnageants de digestion, à une concentration de matière sèche de $3,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pendant 1 h 30 sur une coculture de Caco-2/HT29-MTX de 3 semaines maintenue à 37°C et 5 % de CO_2 . L'ensemble de ces tests ont été réalisés sur des cellules à des passages compris entre P15 et P18 pour les cellules Caco-2 et entre P14 et P16 pour les cellules HT29-MTX. Les valeurs sont les moyennes \pm écarts-types ($N=3$, $n=3$).

Après 1 h 30 de contact entre les digestats des surnageants de macérations contrôles et de fermentation, la perméabilité apparente a été mesurée à l'aide de la lucifer yellow, qui traverse la barrière intestinale via les jonctions serrées. La perméabilité apparente est jugée conforme si elle est inférieure à $1 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette condition a été respectée pour l'ensemble des digestats, à l'exception de deux puits contenant les digestats des surnageants issus des fermentations d'épluchures d'endives par la souche 46a (**Figure 46B**).

L'absence de multicouche a été confirmée par une coloration au DAPI. Les images obtenues en microscopie à fluorescence, présentées dans la **Figure 47**, montrent clairement l'absence de multicouche. En effet, tous les noyaux sont situés sur le même plan dans les trois clichés représentatifs choisis, ce qui atteste de la formation d'une monocouche. Cette condition était essentielle pour garantir la validité du modèle de barrière utilisée.

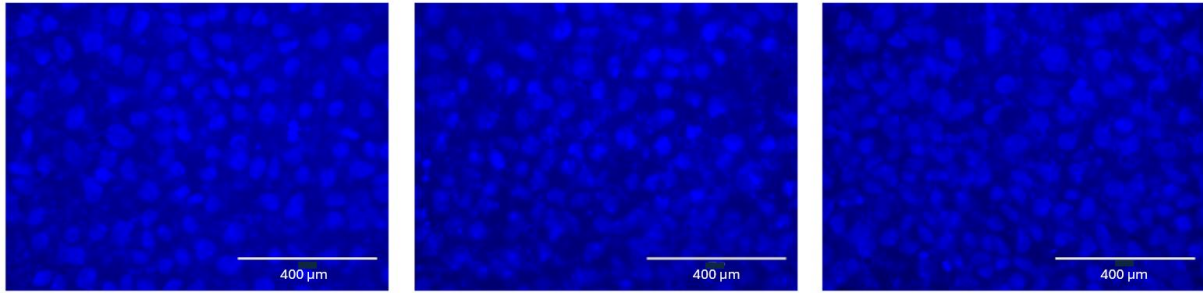


Figure 47 : Coloration au DAPI de la coculture Caco-2/HT29-MTX après 3 semaines de culture.

Photographies réalisées à l'aide d'un microscope à fluorescence. Cette coloration permet de visualiser les noyaux des cellules, confirmant l'absence de multicouche et la formation d'une monocouche homogène. Statistiques : cette expérience a été réalisée en N=3 pour chaque réplicat biologique.

7.2. Activité antioxydante sur les cellules HepG2 des échantillons après fermentation, DGIS et après passage de la barrière intestinale

L'activité antioxydante sur les cellules HepG2 a été évaluée après contact des surnageants des fermentations d'épluchures d'endives réalisées en bioréacteurs, après DGIS et passage au travers de la barrière intestinale. L'ensemble des échantillons ont été mis au contact des cellules HepG2 à des concentrations non cytotoxiques. Les résultats montrent que L'AAPH a induit une oxydation des cellules via la production d'ERO intracellulaires, tandis que la quercétine a réduit cette production d'ERO à un niveau similaire à celui observé en condition contrôle, avec le milieu HBSS seul. La **Figure 48** montre que les surnageants des macérations contrôles et des fermentations ont une activité antioxydante significative, cette activité est conservée après digestion.

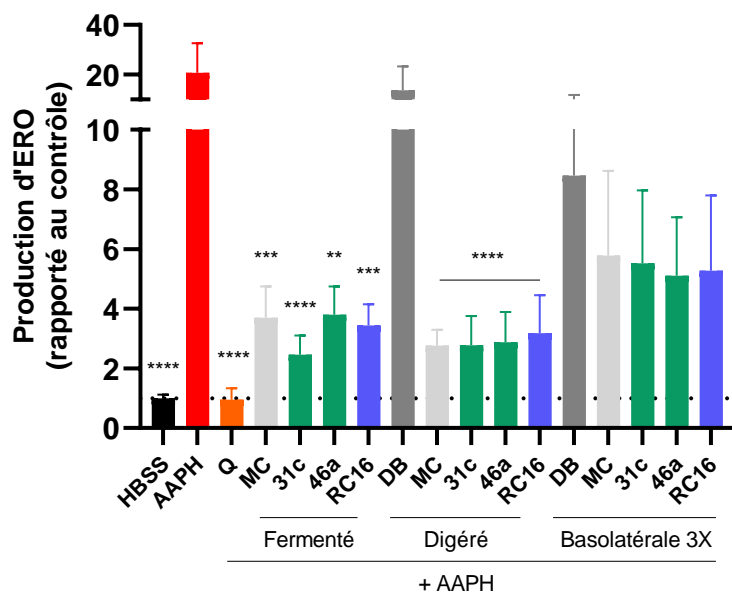


Figure 48 : Activité antioxydante des surnageants de fermentation sur les cellules HepG2 après fermentation, digestion et passage de la barrière intestinale.

En gris : macérations contrôles, en vert : *L. plantarum*, en bleu : *L. reuteri*. AAPH à 1 200 μM , Q : quercétine à 100 μM . Production d'ERO par les cellules HepG2 pour l'ensemble des échantillons provenant des fermentations d'épluchures d'endives par les souches 31c, 46a et RC16 réalisées en bioréacteurs avec les paramètres précédemment sélectionnés et dilués à une concentration finale de 2.9 g.L⁻¹ dans les puits. Les valeurs sont exprimées en fonction de celles du contrôle, ramenées à 1. L'ensemble de ces tests ont été réalisés sur des cellules à des passages compris entre P18 et P20. Statistiques : Les valeurs sont les moyennes \pm écarts-types (N=5, n=3). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn pour comparer chaque échantillon à la condition AAPH. ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

De plus, les digestats des surnageants de fermentation obtenus avec les souches 31c et RC16 ont respectivement montré des activités supérieures de 34 % et 7 % par rapport à celles des macérations contrôles. Cependant, après passage au travers de la barrière intestinale, l'activité antioxydante a diminué significativement. Cette diminution pourrait être partiellement attribuée à la dilution des surnageants de digestion dans le milieu basolatéral et à la sélectivité de la barrière intestinale. Bien que l'activité soit réduite par rapport à celle observée après fermentation et digestion, la production d'ERO a tendance à diminuer par rapport à la condition AAPH. De plus, après le passage au travers de la barrière intestinale, les activités antioxydantes des digestats de surnageants de fermentation ont été respectivement améliorées de 5, 12 et 9 % pour les souches 31c, 46a et RC16 par rapport à leurs macérations contrôles, bien que ces différences ne soient pas significatives.

Discussion

L'objectif final de ce projet était de développer un ingrédient bénéfique pour la santé humaine ayant des propriétés antioxydantes et hépato-protectrices. Pour cela, des co-produits d'endive et de chicorée ont été fermentés par des bactéries lactiques, et plus précisément des souches de *Lactobacillus*. Six souches de *L. plantarum* provenant de la collection de VF Bioscience, ainsi que trois souches de *Limosilactobacillus reuteri*, isolées du biote de l'endive, ont ainsi été utilisées.

1. Isolement du biote de l'endive

Afin d'isoler ces souches, le microbiote de l'endive a été étudiée, permettant l'isolement de 36 souches. Parmi celles-ci, 16 souches ont pu être formellement identifiées au niveau du genre et de l'espèce. Certaines d'entre elles sont habituellement associées à l'Homme ou aux animaux, suggérant des contaminations possibles durant les étapes de culture en champs, de récolte ou de nettoyage des endives. C'est le cas de *Citrobacter gillenii*, initialement isolée du tractus intestinal d'une truite arc-en-ciel, et également retrouvée sur des légumes comme la mâche (Duman et al., 2017). De même, *Bacillus licheniformis*, initialement isolé chez un bovin en Iran, est souvent retrouvé dans la viande, le lait cru et les légumes (Nayeri Fasaie et al., 2023). *Staphylococcus hominis*, une bactérie plus spécifique à l'Homme, est abondamment présente sur la peau (Joglekar et al., 2023). Enfin, la bactérie lactique *Streptococcus mitis*, habituellement retrouvée dans le microbiote buccal et parfois responsable de l'endocardite infectieuse, a été isolée dans le biote des endives étudiées (Wei et al., 2023). D'autres bactéries isolées du biote des endives sont typiques du sol et non spécifiques de cette plante. Par exemple, *Raoultella terrigena* est couramment retrouvée dans les sols, notamment forestiers, ainsi que dans les milieux aquatiques. Cette souche est une bactérie opportuniste qui peut être responsable d'infections respiratoire ou urinaire (De Lima Brossi et al., 2016; Fazal et al., 2019). *Lelliottia amnigena*, tout comme *Raoultella terrigena*, est largement présente dans les sols et les eaux usées, mais a également été retrouvée dans l'air et dans les poumons de certains mammifères marins (Negus et al., 2023). Parmi les souches isolées et généralement associées aux végétaux, ont été retrouvées *Pectobacterium carotovorum*, qui est le principal pathogène responsable de la pourriture dite molle des

légumes comme la carotte, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas koreensis* et *Rahnella aquatilis* (Naligama and Halmillawewa, 2022). Ces trois dernières souches ont déjà été isolées de l'endive mais *Pantoea agglomerans* est considérée comme un pathogène pour cette dernière (Yum et al., 2023). *Pseudomonas koreensis*, bien que présente dans le sol et la rhizosphère, a également été isolée précédemment de l'endive frisée (Federico et al., 2015; Lopes et al., 2018).

En plus de *Streptococcus mitis* et *Weissella cibaria*, trois autres bactéries lactiques ont été isolées du biote de l'endive. Ces trois souches correspondent à des *L. reuteri*. Bien que ces souches ne soient pas spécifiques à l'endive, car elles sont généralement retrouvées dans le tractus gastro-intestinal des vertébrés à sang chaud, elles ont été utilisées dans ce projet afin de fermenter les co-produits d'endive et de chicorée (Shi et al., 2022). En effet, cette espèce possède le statut GRAS ainsi que les enzymes permettant de dégrader les substrats végétaux tel que la chicorée et l'endive.

2. Screening des co-produits et des souches de *Lactobacillus*

Afin de fermenter les différents co-produits d'endive et de chicorée à l'aide des souches de *Lactobacillus*, un milieu très simple a été utilisé. Celui-ci était composé uniquement des co-produits broyés, tels que les épluchures d'endives et de Carmines®, les fines de cossettes non torréfiées ou le marc de chicorée, ainsi que de PBS. Le broyage améliore la disponibilité des nutriments nécessaires à la croissance des souches de *Lactobacillus*, tandis que le PBS apporte une source minérale d'azote et de potassium. Ce milieu sans supplémentation a été choisi afin que les souches de *Lactobacillus* utilisent exclusivement les co-produits comme source de carbone et d'azote organique pour se développer, sachant qu'elles sont capables de croître sur diverses matrices alimentaires comme les légumes (Seddik et al., 2017). Cette capacité a permis la fermentation des co-produits tels que ceux de tomate, de carotte et de melon par des bactéries lactiques comme *L. plantarum*. La fermentation avait alors été réalisée en utilisant uniquement de l'eau distillée et les co-produits stérilisés. La présence exclusive de co-produits a entraîné une croissance des *Lactobacillus* comprise entre 0,84 et 2,04 log après 72 h de

fermentation (Ricci et al., 2019). Notre étude a permis d'obtenir des résultats similaires pour la fermentation des épluchures d'endives par les souches 31c, 46a et RC15, où la simple présence du co-produit en milieu PBS a permis une augmentation de la croissance d'un log. En revanche, les autres co-produits n'ont pas permis la croissance des bactéries lactiques. Une autre étude, spécifique à l'endive, a montré que la fermentation de feuilles d'endives rouges par des *Lactobacillus*, dans un milieu contenant uniquement des feuilles dans de l'eau physiologique, a réduit le pH du milieu de deux unités et a multiplié par cinq l'activité antioxydante par rapport à celle des surnageants de macérations contrôles (Kagkli et al., 2016). Ces acidifications sont légèrement plus importantes que celles observées lors de notre étude qui sont de -1,5 par rapports aux macérations contrôles. Cependant, l'activité antioxydante obtenue par méthode DPPH a été multiplié par 5 dans l'étude de Kagkli et al., alors que dans notre étude, la fermentation des épluchures d'endives a permis de multiplier cette activité par 18. L'étude de Kagkli et al., a montré que l'augmentation de l'activité antioxydante était corrélée avec l'augmentation de la concentration en acides phénoliques. Le profil phénolique étudié par HPLC a montré que dans les échantillons non fermentés, 3 pics correspondants aux acides protocatéchique, chicorique et chlorogénique étaient présents. Après fermentation, de l'acide gallique ainsi que différents pics non identifiés présents entre l'acide protocatéchique et l'acide chicorique sont apparus. Ces molécules pourraient provenir de la dégradation des acides phénoliques. Cependant, les fractions correspondantes aux pics 1, 2, 3 et 4 ont montré une activité antioxydante, tandis que la fraction correspondante aux molécules apparues durant la fermentation n'a montré aucune activité (Kagkli et al., 2016). Dans notre étude, les résultats obtenus sont assez différents, la teneur en composés phénoliques a eu tendance à diminuer par rapport aux macérations contrôles, cependant d'autres composés sont apparus, mais des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de les identifier. La fermentation de substrats végétaux par les souches de *Lactobacillus*, comme *Lactiplantibacillus plantarum*, permet d'augmenter les quantités d'acide phénolique dans la plupart des études référencées dans la littérature. Cette augmentation se fait grâce aux nombreuses enzymes que possède cette souche comme les estérases, les réductases et les décarboxylases d'acides phénoliques. De plus, la dépolymérisation des acides phénoliques permet d'augmenter leur quantité

ainsi que leur activité antioxydante (Hur et al., 2014; Kagkli et al., 2016; Kwaw et al., 2018). Dans notre étude, la diminution de la teneur de certains composés pourrait être due à ces transformations en d'autres composés potentiellement plus actifs. Il serait intéressant, à l'issue de la caractérisation des surnageants de fermentation, d'identifier les fractions ayant les meilleures activités.

Après avoir sélectionnées les épluchures d'endive comme co-produit et les souches 31c, 46a et RC16 pour la suite du projet, différents paramètres de fermentation ont été étudiés.

3. Optimisation des paramètres de fermentation et de la croissance des souches de *Lactobacillus*

Sur la base des résultats de croissance, nous avons ajusté plusieurs paramètres de culture dans le but d'optimiser la croissance des souches et d'améliorer l'activité du produit fermenté. C'est ainsi que différentes concentrations en épluchures d'endives ont été testées (15, 25 et 35 g.L⁻¹), mais également la concentration de l'inoculum (DO_{600nm} de 0,3 ; 1,5 et 3), et le temps de fermentation (12, 24, 36, 48 et 72 h). La concentration en épluchures d'endives dans le milieu n'a pas impacté l'activité antioxydante. La concentration de l'inoculum de départ était positivement corrélée à la croissance des souches ainsi qu'aux activités biologiques des surnageants de fermentation, mettant en évidence l'impact positif de la fermentation. À la suite de ces essais, une concentration de 25 g.L⁻¹ d'épluchures d'endives dans le milieu et un inoculum de départ de 1,5 DO à 600 nm ont été choisis en raison de leur praticité pour les manipulations et de leur adéquation à la réalisation des fermentations à grande échelle. Concernant le temps de fermentation, une durée de 24 h a été retenue, car les activités biologiques étaient plus élevées après cette période, bien que le pic de croissance des souches ait été atteint après 12 h. La croissance des *Lactobacillus* dépend du milieu de culture utilisé et de la température d'incubation. Si la fermentation est réalisée en condition optimale en laboratoire, c'est-à-dire à 37°C en milieu MRS, une augmentation de la population bactérienne de 2 log est observée (Dai et al., 2022). C'est ce qui a été observé pour les fermentations témoins réalisées en MRS lors de notre étude (**Figure 43**).

En revanche, pour les milieux plus simples, constitués uniquement de co-produits de fruits ou de légumes, la croissance des souches peut être moins importante, atteignant 1 à 2 log après 72 h de fermentation. Le temps de croissance peut également être décalé en raison d'une phase de latence plus longue. En comparaison, dans un milieu MRS, ce temps de latence est généralement très court, environ 3 heures, avec une phase exponentielle qui s'arrête entre 8 et 12 h (Aryani et al., 2016; Ricci et al., 2019; Kwoji et al., 2022). Dans notre étude, la population bactérienne a augmenté d'environ 1 log, comme celle observée pour *Lactocaseibacillus casei* dans une autre étude au sein de laquelle un milieu contenant des co-produits de melon avait été utilisé (Ricci et al., 2019). Dans notre étude, la phase exponentielle était légèrement plus courte que 12 h, ce qui correspond à des temps cohérents à ceux retrouvés dans la littérature.

Après avoir choisi les paramètres de fermentation précédemment évoqués et les avoir testés à différentes échelles (Deepwell, fiole d'Erlenmeyer et bioréacteur), des essais visant à améliorer la croissance ont été entrepris. Au cours de cette étude, les auxotrophies en acides aminés et en vitamines ont été déterminées pour les trois souches de *Lactobacillus* sélectionnées : 31c, 46a et RC16. Ces trois souches se sont révélées auxotrophes pour la valine, la leucine, la méthionine et la vitamine B5. Ce phénomène d'auxotrophie varie selon les souches. Plusieurs études ont observé que les souches de *L. plantarum* sont souvent auxotrophes pour l'arginine, l'alanine, la leucine, la valine, la phénylalanine et la cystéine (Nicoloff et al., 2000; Bron et al., 2002; Bringel and Hubert, 2003; Staudigl et al., 2014; Consuegra et al., 2020). Les deux souches de *L. plantarum* utilisées dans ce projet sont auxotrophes pour la méthionine, la valine et la leucine. Exceptée pour la méthionine, ces deux souches présentent des auxotrophies similaires à celles habituellement retrouvées pour cette espèce. En outre, certaines souches peuvent avoir de nombreuses auxotrophies comme une souche de *L. reuteri*, qui s'est révélée auxotrophe pour l'alanine, l'arginine, l'isoleucine, la méthionine, l'acide glutamique, l'asparagine, la leucine, l'acide glutamique, la glycine, la thréonine, l'histidine, la serine, le tryptophane, les vitamines B5 et B6 et l'uracile (Kwoji et al., 2022). RC16, la souche de *L. reuteri* utilisée dans ce projet, est auxotrophe pour la valine, la méthionine et la vitamine B5. Ces auxotrophies sont donc cohérentes avec les données de la littérature concernant *L. reuteri*.

Afin de compléter le milieu de fermentation en acides aminés et en vitamines essentiels à la croissance des *Lactobacillus*, il est possible d'utiliser des extraits de levures. En effet, ces extraits permettent d'apporter l'ensemble des acides aminés et les vitamines sous forme libre et donc directement assimilables par les souches. Par ailleurs, ces extraits représentent une solution bien plus économique pour l'industriel que de compléter le milieu en acides aminés purifiés. Dans certaines études, les milieux de culture sont complétés afin d'améliorer la croissance et/ou la production de molécules d'intérêt. Une étude a comparé la croissance de *Lactobacillus*, mesurée par densité optique, entre un milieu MRS classique et un milieu MRS sans extrait de levure. Le milieu sans extrait de levure n'a pas permis la croissance des *Lactobacillus*, contrairement au milieu MRS classique (Arakawa et al., 2015). Dans notre étude, les deux conditions ont été testées en milieu MB. Les trois souches de *Lactobacillus* ont étéensemencées à une $DO_{600\text{nm}}$ de 0,3 et le milieu contenant des extraits de levures a permis d'atteindre des $DO_{600\text{nm}}$ respectives de 3,7 ; 2,8 et 2,9 pour les souches 31c, 46a et RC16, ce qui correspond à une augmentation d'un facteur 10 après 24 h de croissance. En revanche, le milieu MB non complété n'a pas permis aux souches de croître. Dans d'autres études le milieu de culture a également été complété afin d'améliorer la croissance des souches, lorsque la seule source de carbone était le co-produit. C'était par exemple le cas pour la fermentation des co-produits de bananes, de papayes, d'ananas et d'oranges (Ngouénam et al., 2021). Dans notre étude, la complémentation en extrait de levure à 4 g.L^{-1} a permis une amélioration de la croissance d'1,5 log après 24 h de fermentation. Ces résultats sont similaires à ceux de l'étude de Curiel et al., qui s'est intéressée à la fermentation de la myrthe. Dans cette étude, la croissance des souches de *Lactobacillus* a augmenté de 2 log lorsque le milieu a été complété de manière similaire, avec 4 g.L^{-1} d'extrait de levure (Curiel et al., 2015).

Une des raisons pour lesquelles il est nécessaire de compléter le milieu de fermentation contenant uniquement des co-produits est liée à la stérilisation par autoclave. En effet, cette stérilisation qui a été effectuée à 121°C pendant 20 minutes, peut provoquer la dégradation de certains composés comme les polyphénols, les acides aminés ou les vitamines (Deng et al., 2018). Une étude a ainsi montré que la stérilisation par autoclave avait un impact sur les minéraux et les vitamines contenus dans des repas

à base de caséines ou de farine de soja (Tuśnio et al., 2014). Selon ces auteurs, les conditions d'autoclavage utilisées dans notre projet, qui sont de 121 °C pendant 20 minutes, entraîneraient une diminution de moitié de la teneur en vitamine B5, une vitamine pour laquelle la souche RC16 est auxotrophe (Tuśnio et al., 2014). De plus, il a été montré que certains acides aminés comme l'arginine, l'histidine, la phénylalanine, la sérine, la glutamine et l'acide glutamique pouvaient être affectés par la stérilisation par autoclave (Yeung et al., 2006; Mesías et al., 2016). La supplémentation en extrait de levure permettrait donc de compenser la perte de vitamines et d'acides aminés essentiels à la croissance des *Lactobacillus*, causée par la stérilisation par autoclave. Les polyphénols, principales molécules bioactives de la chicorée et de l'endive, sont thermosensibles et peuvent donc aussi être altérés par la stérilisation par autoclave. En effet, lors de notre étude, des dégradations ont été observées pour la plupart des polyphénols détectés comme les acides néochlorogénique, caftarique, caféique et chicorique (**Annexes 2**). Certaines recherches ont évalué l'impact du traitement par autoclave sur les profils en composés phénoliques de diverses matrices. Par exemple, les profils phénoliques du colza et du marc de raisins obtenus après stérilisation par autoclave indiquaient une diminution de certains polyphénols, tels que la catéchine, l'épicatéchine, ou les dimères de procyanidine, ce qui va dans le sens des résultats obtenus dans notre étude (Chamorro et al., 2012). En revanche, une autre étude a montré que la stérilisation par autoclave (121 °C pendant 15 min) des graines de moutarde avait conduit à la libération des acides hydroxybenzoïques, hydroxycinnamiques, syringiques et des dérivés de catéchines corrélée à une augmentation de l'activité antioxydante, comparée à celle des graines non stérilisées (Gök et al., 2021). Concernant les drêches de brasserie, une étude a montré que certains traitements thermiques avaient un impact sur le contenu en composés phénoliques. D'autres recherches ont montré que les différents barèmes réalisés par autoclave conduisaient à l'obtention de profils en composés phénoliques différents. A 90 et 100 °C, les concentrations en acides phénoliques étaient diminuées, mais à 110 et 130 °C, elles avaient augmenté, probablement en raison de la dégradation des drêches permettant une meilleure extraction des composés. De plus, dans cette étude, l'activité antioxydante avait augmenté après autoclavage à toutes les températures testées, probablement en raison de la dépolymérisation de certains polyphénols (Naibaho et al., 2022). La température de stérilisation utilisée dans notre

étude est de 121 °C, cependant et contrairement à l'étude précédemment citée, la teneur en polyphénols a diminué. Il est également possible que l'extraction durant la stérilisation par autoclave compense la dégradation des acides hydroxycinnamiques présents sous forme libre. Il a également été observé que la stérilisation par autoclave pouvait entraîner la formation de dimères tels que de le 4-vinylguaïacol et le 4-vinylphénol à partir des acides férulique et p-coumarique, ces molécules ayant une activité antioxydante plus élevée que celle des acides d'origine (Arrieta-Baez et al., 2012). Ainsi, bien que la stérilisation par autoclave puisse dégrader certains acides hydroxycinnamiques, elle peut également favoriser leur extraction et leur conversion en dérivés plus actifs.

4. Activité antioxydante des co-produits et des surnageants de fermentation

Les premières fermentations, réalisées en plaque Deepwell, avaient pour objectif de comparer la croissance bactérienne en présence des différents co-produits, afin de déterminer celui qui engendrait la meilleure croissance bactérienne au cours de la fermentation, mais surtout les meilleures activités antioxydantes et hépato-protectrices. Les résultats obtenus ont permis de sélectionner les épluchures d'endives. Il est établi dans la littérature que l'inuline, qui est une source de carbone pour les souches de *Lactobacillus*, est plus présente dans les racines de chicorée et d'endives, ce qui correspond dans notre projet au marc de chicorée et aux fines de cossettes non torréfiées. *A contrario*, le contenu en polyphénols est plus important dans les feuilles correspondant aux épluchures d'endives et de Carmines® (Nwafor et al., 2017; Perović et al., 2021). Néanmoins, les résultats obtenus par HPLC n'ont pas confirmé que les épluchures d'endives et de Carmines® étaient plus riches en polyphénols que le marc de chicorée et les fines de cossettes non torréfiées, mais un plus grand nombre d'acides hydroxycinnamiques ont été identifiés dans les épluchures d'endives et de Carmines®.

Le criblage des souches de *L. plantarum* et de *L. reuteri* avait pour objectif de sélectionner celles à utiliser dans la suite du projet, en comparant leur croissance ainsi que leurs activités anti-inflammatoires, hépato-protectrices mais surtout antioxydantes évaluées par le pouvoir antiradicalaire (méthode DPPH) et par la capacité à diminuer la production

d'ERO intracellulaires (méthode DCFH₂-DA). La méthode DPPH a été utilisée pour le criblage des co-produits d'endive et de chicorée et la méthode cellulaire pour le reste de l'étude. La fermentation des épluchures d'endives lors du screening de co-produits, a permis d'augmenter l'activité antioxydante, mesurée par la méthode DPPH, de 16 % pour la souche 31c. D'après les données de la littérature, les matrices les plus antioxydantes sont les fruits et jus de fruits notamment grâce à la présence de polyphénols. Les jus de fruits rouges comme les mûres, les baies de Goji ou la grenade inhibent la DPPH à 60 %. Les jus de poires sont également d'excellents antioxydants car ils ont provoqué une inhibition de la DPPH à 78 %. Les jus de tomates et de pommes sont un peu moins actifs avec des inhibitions respectives de 20 et 25 %. Une étude a comparé l'activité antioxydante de diverses matrices comme les fruits et les légumes, et a montré que l'endive avait un pouvoir antioxydant comparable à celui de la pomme et légèrement plus faible que celui du chou-fleur ou de la poire (Crujeiras et al., 2010). La fermentation des jus de fruits a permis d'obtenir des activités relativement élevées. En effet, ils constituent d'excellents substrats pour la croissance des souches, grâce à leur teneur en sucres libres qui contribue à améliorer la croissance des souches de *Lactobacillus*. Il a ainsi été montré que la fermentation des jus de poires, mûres, baies de Goji et de pommes par *L. plantarum* permettait d'améliorer l'activité antioxydante mesurée par DPPH respectivement de 7,5 ; 33 ; 24 et 92 %, afin d'atteindre des inhibitions de DPPH de 84, 73, 80 et 48 %. Ces fermentations ont été réalisées directement dans les jus de fruits, avec ou sans supplémentation en glucose, à 37 °C pendant 20 à 72 h (Kwaw et al., 2018; Li et al., 2018b; Liu et al., 2019; Wang et al., 2021). Dans notre étude, l'amélioration de l'activité antioxydante des épluchures d'endives fermentées, mesurée par la méthode DPPH, était de 16 % pour la souche de *L. plantarum* 31c. Le gain d'activité observé dans notre projet est plus important que celui observé lors de la fermentation des poires. Cependant, il est bien inférieur à celui observé lors de la fermentation d'autres matrices comme les baies de Goji, les mûres mais surtout la pomme. Par ailleurs, la fermentation de fruits tels que le kiwi et la grenade, ayant des activités respectives de 47 et 60 % d'inhibition de DPPH, par *L. plantarum* a permis d'améliorer l'activité antioxydante de 60 et 50 %, permettant d'obtenir des activités finales de 75 et 90 % d'inhibition de DPPH (Mousavi et al., 2013; Zhou et al., 2020). D'autres matrices fermentées comme la figue de lotus ayant une activité de 17 %, sont bien moins élevées que celle des fruits rouges, ont

montré une augmentation de 240 % lorsqu'elles étaient fermentés par *L. plantarum*, permettant une activité finale de 41 % d'inhibition de DPPH (Zhang et al., 2018). À l'inverse, dans notre étude, la fermentation des co-produits de chicorée et d'endives par les différentes souches de *Lactobacillus* n'a pas permis d'améliorer l'activité de façon aussi importante. C'est également le cas de la fermentation des co-produits de choux-fleurs et des feuilles d'avocatier fermentés par *L. plantarum*, où aucune amélioration de l'activité n'a été observée (De Montijo-Prieto et al., 2023; Zhang et al., 2024). Enfin, à ce jour, une seule étude s'est intéressée à la fermentation de l'endive, et en particulier de l'endive rouge. L'activité antioxydante évaluée par la méthode DPPH a montré qu'après fermentation par *L. plantarum*, l'activité était multipliée par cinq, c'est-à-dire beaucoup plus que lors de notre étude ou elle est multiplié par 1,6 (Kagkli et al., 2016). Cependant, les résultats précédemment cités ont évalué l'activité antioxydante uniquement avec la méthode DPPH.

Table 9 : Gain en activité antioxydante (%) obtenu par fermentation, évaluée par la méthode DPPH, de différentes matrices.

Matrice	Espèce utilisée et condition particulière de culture	Gain d'activité par la fermentation évaluée par méthode DPPH	Références
Poire	<i>L. plantarum</i>	7,5 %	(Wang et al., 2021)
Mûres	<i>L. plantarum</i>	33 %	(Kwaw et al., 2018)
Baies de Goji	<i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Bacillus velezensis</i> et <i>Bacillus licheniformis</i> Ajout de pectinases et de glucose dans le milieu de fermentation	24 %	(Liu et al., 2019)
Pomme	<i>L. plantarum</i>	92 %	(Li et al., 2018c)
Kiwi	<i>L. plantarum</i>	60 %	(Zhou et al., 2020)
Grenade	<i>L. plantarum</i>	50	(Mousavi et al., 2013)
Figue de lotus	<i>L. plantarum</i>	240 %	(Zhang et al., 2018)
Coproduits de choux-fleurs	<i>L. plantarum</i> et <i>L. brevis</i>	500%	(Zhang et al., 2024)
Feuilles d'avocatier	<i>L. plantarum</i> Ajout de glucose et d'extrait de levure dans le milieu de fermentation	0%	(De Montijo-Prieto et al., 2023)
Feuilles d'endive rouge	<i>L. plantarum</i>	0 %	(Kagkli et al., 2016)

Différentes études ont comparé les activités antioxydantes en utilisant la méthode DPPH et des tests cellulaires. Par exemple, l'activité antioxydante mesurée par le test DPPH a montré que le jus de pomme fermenté par *L. plantarum* présentait une activité 2 fois plus élevée, tout comme celle mesurée sur les macrophages Raw264.7 (Li et al., 2018b). Une autre étude portant sur la fermentation du riz brun par *L. plantarum* et *L. reuteri* a montré que les résultats obtenus avec la méthode DPPH, et ceux avec la méthode DCFH₂-DA sur les cellules Caco-2 étaient similaires, avec une augmentation de l'activité antioxydante respectivement de 6 et 5,7 fois par rapport au riz brun non fermenté (Tyagi et al., 2021). Dans notre étude, les résultats obtenus avec la méthode DPPH et la méthode cellulaire sont très différents. En effet, avec la méthode DPPH, la fermentation des épiluchures d'endives a permis de multiplier l'activité par 1,6 pour la souche 31c par rapport aux macérations contrôles, alors qu'avec le test cellulaire, l'activité est respectivement 6 et 18 fois plus élevée que les macérations contrôles sur les cellules HepG2 et Caco-2. Cette différence peut s'expliquer en partie par les mécanismes distincts des deux méthodes. Le test DPPH évalue le pouvoir antiradicalaire des extraits en mesurant la capacité des molécules présentes dans les échantillons à réduire le DPPH par transfert de protons. En revanche, le test DCFH₂-DA permet de mesurer la quantité d'ERO présente dans les cellules soumises à un stress oxydatif, et ainsi d'évaluer la capacité des échantillons à réduire cette production (Chen et al., 2010; Gülçin, 2020). Le test DPPH est peu coûteux, simple et rapide à réaliser. En revanche, il est moins sensible et moins représentatif des conditions physiologiques que le test cellulaire utilisant la DCFH₂-DA (Furger, 2021). La méthode cellulaire est plus complexe et plus chronophage, mais elle offre une plus grande adaptabilité à diverses lignées cellulaires et permet de nombreuses applications. Par ailleurs, les deux méthodes ne sont pas compatibles avec tous les types d'échantillons, et les protocoles varient d'un laboratoire à l'autre, ce qui rend la comparaison des résultats avec ceux de la littérature difficile (Xing et al., 2015; Munteanu and Apetrei, 2021; Mendonça et al., 2022). En conclusion, bien que plus complexe à mettre en œuvre, la méthode cellulaire utilisant la DCFH₂-DA est plus pertinente en raison de son mécanisme d'action physiologique et de son adéquation à l'étude des processus biologiques.

5. Activité anti-inflammatoire des co-produits et des surnageants de fermentation

Au cours de l'inflammation, et notamment lors des MICI, le processus inflammatoire et la formation d'intermédiaires réactifs, notamment les ERO, sont étroitement associés (Bouma and Strober, 2003), ce qui contribue à la destruction épithéliale et à l'augmentation de la perméabilité intestinale (Natividad and Verdu, 2013). De ce fait, le stress oxydant est un mécanisme qui contribue à l'inflammation chronique ainsi qu'au déséquilibre du microbiote intestinal (Chong et al., 2017).

Par conséquent, cette étude a également exploré de manière préliminaire le potentiel anti-inflammatoire des macérations et fermentations d'épluchures d'endives, qui ont été caractérisées pour leur activité antioxydante sur les cellules intestinales et hépatiques. L'activité anti-inflammatoire a été évaluée à l'aide d'un test développé au laboratoire, utilisant des cellules U937 différenciées en macrophages par le PMA, puis stimulées avec du LPS, ce qui a induit une production accrue de cytokines, notamment TNF- α , IL-8 et IL-10 (Moldovan et al., 2022). Les effets des échantillons, à des concentrations non cytotoxiques, sur l'inflammation ont été étudiés en mesurant leur capacité à moduler la sécrétion de ces trois cytokines. Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire, essentielle à la défense de l'hôte contre les agents infectieux (Wada et al., 2001). Toutefois, une production excessive de cytokines inflammatoires peut entraîner des lésions tissulaires, une toxicité et la mort cellulaire. La synthèse de ces cytokines pro-inflammatoires par les macrophages peut être modulée et inhibée par des cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 (Iyer and Cheng, 2012). Dans notre étude, la dexaméthasone, un glucocorticoïde, a été utilisée comme contrôle positif pour inhiber l'inflammation. En effet, les glucocorticoïdes sont bien connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires et protectrices, en raison de leur capacité à inhiber l'expression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires, et sont largement utilisés dans le traitement des inflammations (Medzhitov, 2010).

Pour l'ensemble des surnageants de macérations contrôles et de fermentation, une diminution des trois cytokines a été observée. De plus, les surnageants des macérations contrôles ont permis de diminuer significativement les sécrétions de l'IL-10 et du TNF- α .

Une étude récente, réalisée dans notre laboratoire, a porté sur l'activité anti-inflammatoire de la décoction de farine de chicorée. Cette dernière, ainsi que certains de ces composés comme l'acide chlorogénique, le fructose et des LST ont été mis au contact de cellules U937 différenciées en macrophages en présence de LPS. La décoction de farine de chicorée a permis de diminuer de façon significative la sécrétion des cytokines TNF- α , IL-1 β et IL-8. De plus, le fructose a également diminué significativement la sécrétion du TNF- α , tout comme l'acide chlorogénique et les LST pour l'IL-1 β . Les trois composés ont également permis de diminuer significativement la sécrétion pour l'IL-8 (Pouille et al., 2022). Dans notre étude, des résultats similaires ont été observés. En effet, les surnageants de macérations contrôles tout comme la décoction de farine de chicorée utilisée dans l'étude de Pouille et al., étaient capables de diminuer de façon significative la sécrétion de d'IL-10 et de TNF- α induit par le LPS. Une autre étude a évalué l'activité anti-inflammatoire de deux fruits exotiques couramment utilisés en Asie du Sud-Est, riches en molécules bioactives, le durian et le rambutan sur des U937 différenciées en présence de LPS. Les extraits éthanoliques de durain ont permis de diminuer significativement la sécrétion des cytokines TNF- α et IL-8. Les extraits de rambutan, quant à eux ont une tendance à diminuer la sécrétion de TNF- α . Cette étude mentionnait que cette activité anti-inflammatoire était probablement due aux flavonoïdes et à l'acide caféique (Chingsuwanrote et al., 2016). Comparés aux résultats obtenus dans notre étude, les surnageants des macérations témoins présentent une activité anti-inflammatoire supérieure à celle observée pour le durian et le ramboutan. D'autres études ont été réalisées sur des macrophages RAW 264,7 inflammées au LPS. Des extraits de narirutine, un flavonoïde provenant de citron, ont permis de diminuer la sécrétion des cytokines IL-1 β et TNF- α de façon significative (Ha et al., 2012). Enfin, une étude a mesuré l'activité anti-inflammatoire des prunelles sur les neutrophiles PBMC en présence de LPS. Les différents extraits mis au contact des neutrophiles ont permis de diminuer la sécrétion des trois mêmes cytokines que celles étudiées dans notre étude, soit le TNF- α , l'IL-8 et l'IL-10. De plus, l'acide chlorogénique a été utilisé comme témoin positif, et a montré une diminution de la sécrétion des trois cytokines, et ce, de manière significative pour TNF- α et IL-8 à partir de 25 μ M (Magiera et al., 2022). L'ensemble de ces études suggèrent que les molécules potentiellement

responsables de l'activité anti-inflammatoire sont les acides phénoliques comme l'acide caféique et chlorogénique ainsi que les LST.

Une fois fermentées, les épluchures d'endives ont tendance à diminuer la sécrétion des trois cytokines. En comparaison, une étude a montré que des extraits méthanoliques, issus de la fermentation du kimchi de moutarde par *L. plantarum*, inhibaient la sécrétion du TNF- α et d'IL-6 par les macrophages RAW 264.7 inflammés au LPS, exerçant ainsi une activité anti-inflammatoire plus importante après fermentation (Le et al., 2020). Par rapport à notre étude, la fermentation du kimchi a permis une meilleure activité anti-inflammatoire que celle des épluchures d'endives. Une autre étude, portant sur la fermentation du lait de soja combiné à une céréale Taiwanaise appelée Alday par des *L. plantarum*, a montré une diminution très légère de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IL-6 par des macrophages inflammés au LPS par rapport aux échantillons non fermentés (Wu et al., 2013). L'ensemble des études montrent que la fermentation n'améliore pas toujours l'activité anti-inflammatoire.

Différentes équipes de recherches se sont également intéressées à l'effet de la fermentation sur certains TLR comme le TLR4. Ali et al., a étudié l'activité anti-inflammatoire des fruits d'aronia, contenant une quantité importante de polyphénols, fermentés par *L. plantarum*. Les résultats ont montré une diminution de l'expression de l'ARNm des cytokines TNF- α , IL-6, et IL-1 β des cellules RAW 264,7 en présence de LPS, mais également une diminution significative et dose-dépendante de l'expression de l'ARNm des TLR4 (Ali et al., 2021). En effet, la voie de signalisation TLR4/NF- κ B, joue un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire. Le TLR4 reconnaît certains motifs spécifiques des bactéries et NF- κ B régule l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Cibler cette voie peut donc être efficace afin d'atténuer l'inflammation intestinale. Les acides hydroxycinnamiques de la chicorée et de l'endive ont cette capacité une fois dans la lumière intestinale. Dans cette famille, l'acide chlorogénique, le plus référencé dans la bibliographie, permet de réduire l'expression des cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α dans la muqueuse du jéjunum et de l'iléon, et augmente l'expression des régulateurs négatifs de l'inflammation comme le suppresseur de la signalisation des cytokines 1 et de la protéine d'interaction Toll. L'acide chlorogénique inhibe également la phosphorylation de NF- κ B, ainsi que de la voie de signalisation

TLR4/NF- κ B. L'acide caféique joue aussi un rôle essentiel, en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoire et l'expression de NF- κ B (Chen et al., 2018; Arya et al., 2020; Yu et al., 2022). Ces travaux de recherches montrent que les acides hydroxycinnamiques présents dans les épiluchures d'endives pourraient être en partie responsables de l'activité anti-inflammatoire en inhibant l'expression des TLR4.

6. Impacts de la digestion et du passage de la barrière intestinale sur les activités antioxydantes

Pour un ingrédient à visée santé, il est essentiel de déterminer la biodisponibilité des acides hydroxycinnamiques dans l'intestin ainsi que l'impact de la digestion sur leur activité antioxydante. Dans ce cadre, les surnageants des fermentations réalisées en bioréacteurs ont été soumis à une DGIS, puis mis au contact d'un modèle de barrière intestinale, constitué d'une coculture de cellules Caco-2 et HT29-MTX cultivées sur inserts, afin de vérifier si l'activité antioxydante était toujours présente après la digestion puis après le passage au travers de l'épithélium intestinal.

Dans notre étude, les digestats des surnageants de fermentation ont conservé une activité antioxydante sur la lignée cellulaire HepG2. En effet, les surnageants des macérations contrôles et des fermentations par les souches 31c, 46a et RC16 ont montré des activités significatives après digestion avec une diminution de la production d'ERO induite par l'AAPH de 85 %. Une étude portant sur l'activité anti-inflammatoire avant et après digestion a été réalisée à partir de décoction de farine de chicorée. Ces résultats ont montré des effets similaires aux nôtres car la digestion n'a pas impacté l'activité anti-inflammatoire de la décoction de farine de chicorée (Pouille, 2022). D'autres travaux ont également étudié l'impact de la digestion gastro-intestinale des acides hydroxycinnamiques sur l'activité antioxydante au niveau des cellules HepG2. Par exemple, la digestion d'agrumes a montré que la concentration des acides vanillique et p-coumarique diminuait tandis que celle de l'acide férulique augmentait. L'activité antioxydante mesurée sur les cellules HepG2 était significativement plus importante après digestion, bien qu'aucun acide hydroxycinnamique n'ait été détecté dans les cellules (Sun et al., 2019). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats : l'acide

féruilique, potentiellement responsable de l'activité antioxydante, pourrait exercer cette activité sans être internalisé, être dégradé dans les cellules, ou ne pas être responsable de l'activité observée. Cette étude présente des résultats contradictoires à la nôtre car la digestion des surnageants de fermentation ont une activité similaire avant et après digestion. Une autre étude qui portait sur la digestion de rhizomes de *Ligusticum chuanxiong* a montré que la digestion améliorait l'activité antioxydante mesurée par la méthode DPPH, ainsi que par la méthode DCFH₂-DA, sur les cellules HepG2. De plus, des recherches préliminaires ont montré que l'acide féruilique serait le principal responsable de l'activité antioxydante au niveau cellulaire (Ge et al., 2018). Cependant, d'autres études proposent des hypothèses divergentes. Par exemple, la digestion de dix fleurs comestibles a montré une réduction du contenu en polyphénols, accompagnée d'une perte significative d'activité antioxydante mesurée par la méthode DPPH. Il en est de même pour le maté qui perd 25 % de son activité antioxydante mesurée sur les cellules HepG2 après digestion (Boaventura et al., 2015; Huang et al., 2017). Enfin, une étude a examiné l'impact de la DGIS par le protocole de digestion *in vitro* statique INFOGEST sur les phénols et l'activité antioxydante des mûres. La digestion gastro-intestinale a provoqué une diminution de 68 % des polyphénols ainsi qu'une perte de 50 % de l'activité antioxydante (Sánchez-Velázquez et al., 2021). Il est difficile de conclure quant à l'impact de la digestion sur les acides hydroxycinnamiques et leur activité, car ce dernier dépend à la fois des matrices et des individus. Cependant dans notre étude, contrairement aux précédentes, la digestion n'affecte pas l'activité antioxydante des surnageants de fermentation.

Une fois l'impact de la digestion sur l'activité antioxydante évalué, les surnageants de digestion ont été mis au contact de la coculture Caco-2/HT29-MTX, qui simule la barrière intestinale. L'activité antioxydante présente dans les compartiments basolatéraux obtenus après passage de la coculture, a ensuite été mesurée sur les cellules HepG2. Une diminution de 50 % de l'activité après le passage de la barrière intestinale a été observée mais cette activité était toujours présente, réduisant la quantité d'ERO induite par l'AAPH de 75 %. De plus, l'activité antioxydante a respectivement été améliorée de 5, 9 et 12 % après fermentation des épluchures d'endives par les souches 31c, RC16 et 46a en comparaison aux macérations contrôles. Les principales molécules de l'endive

responsables de l'activité antioxydante sont les acides hydroxycinnamiques. L'activité présente dans le compartiment basolatéral est donc probablement due au passage de ces acides au travers de l'épithélium intestinal. Certaines études ont investigué la capacité des acides hydroxycinnamiques à passer la barrière intestinale. L'acide chicorique, isolé pour la première fois à partir de la chicorée, est un acide considéré comme faiblement biodisponible. En effet, son absorption intestinale a été évaluée à 2 % chez le rat (Wang et al., 2022). Il en est de même pour l'acide férulique qui a une biodisponibilité faible (Li et al., 2011). D'autres acides comme l'acide p-coumarique ont une biodisponibilité plus importante mais leur demi-vie au sein de l'organisme est très courte. Elle a ainsi été évaluée à 15,9 minutes chez le rat (Ferreira et al., 2019). L'acide chlorogénique est l'un des acides hydroxycinnamiques les plus biodisponibles. Une étude réalisée sur l'Homme a montré que la consommation de café induisait deux pics d'acide chlorogénique dans le sang, un premier entre 30 minutes et 1 h, et un second entre 1 h 30 et 4 h (Lu et al., 2020). L'absorption des acides hydroxycinnamiques se fait à la fois sous forme intacte au niveau de l'intestin grêle puis après avoir été métabolisés par le microbiote intestinal. La variabilité interindividuelle de ce processus doit être prise en compte, car le microbiote, unique à chaque individu, influence la manière dont ces acides sont absorbés (Lee et al., 2014).

En conclusion, il est difficile de prédire l'impact de la digestion gastro-intestinale sur le contenu en polyphénols et sur l'activité antioxydante, car ces effets dépendent des matrices alimentaires, de la bioaccessibilité des acides hydroxycinnamiques et de leur biodisponibilité. Dans ce projet, la digestion gastro-intestinale n'a que peu affecté l'activité antioxydante qui a même été retrouvée après passage de la barrière intestinale. Ces résultats sont donc très encourageants pour le développement de l'ingrédient santé.

Conclusions et perspectives

Ce projet de thèse, mené en partenariat entre l'UMRt 1158 BioEcoAgro et l'entreprise VF Bioscience dans le cadre de la Chaire Industrielle Charles Viollette, avait pour objectif de développer un ingrédient aux propriétés antioxydantes et hépato-protectrices à partir de la fermentation lactique de co-produits issus des filières de l'endive et de la chicorée.

La première étape a consisté à isoler des *Lactobacillus* à partir du biote de l'endive afin de les utiliser pour fermenter les différents co-produits. Pour cela, des isolements du biote externe de l'endive ainsi que des macérations en milieu MRS ont été réalisés. Au total, 36 souches ont été isolées, et 16 d'entre elles ont pu être identifiées de manière certaine au niveau du genre et de l'espèce. Parmi ces 16 souches, trois ont été identifiées comme appartenant à *Limosilactobacillus reuteri*. Ces souches proviennent des macérations effectuées en milieu MRS à partir de racines récoltées en champs.

Par la suite, un premier criblage a été réalisé afin de sélectionner le co-produit à utiliser parmi les épluchures d'endives, les épluchures de Carmines®, le marc de chicorée et les fines de cossettes non torrifiées. Les fermentations ont été réalisées avec les trois souches de *Limosilactobacillus reuteri* précédemment isolées des racines en champs, ainsi que six souches de *Lactiplantibacillus plantarum* issues de la collection de VF Bioscience. Les critères de sélection du co-produit incluaient la croissance bactérienne, les activités antioxydantes et hépato-protectrices, ainsi que la teneur en acides hydroxycinnamiques. Les co-produits ayant permis la croissance bactérienne la plus importante étaient les épluchures d'endive et de Carmine®, présentant des résultats comparables en termes d'activité antioxydante. Toutefois, seules les fermentations des épluchures d'endives ont montré un effet hépato-protecteur sur les cellules HepG2. Par conséquent, les épluchures d'endives ont été choisies pour la suite du projet.

Un criblage des 9 souches de *Lactobacillus* a ensuite été réalisé. Pour ce faire, toutes les fermentations ont été effectuées à l'échelle de la fiole d'Erlenmeyers. Afin de sélectionner les souches les plus prometteuses, des mesures de croissance et des activités anti-inflammatoires et antioxydantes ont été réalisées à l'aide de tests biochimiques et cellulaires. À l'issue de ce deuxième criblage, trois souches ont été retenues : 31c, 46a et RC16.

Après avoir sélectionné les couples optimaux co-produit/souches (EEBU/31c ; EEBU/46a et EEBU/RC16), les paramètres de fermentation ont été améliorés. L'effet de la concentration en épluchures d'endives dans le milieu a tout d'abord été évalué, mais aucune différence significative n'a été observée parmi les concentrations testées. Par souci de praticité, une concentration de 25 g.L⁻¹ a été retenue. Ensuite, différents temps de fermentation ont été comparés, et la durée de 24 heures a été choisie. En effet, bien que la phase de croissance exponentielle ne dépasse pas 12 heures, les bioactivités mesurées étaient plus élevées après 24 heures de fermentation. Enfin, différentes concentrations d'inoculum bactérien ont été testées. Comme attendu, la croissance a été plus importante avec l'inoculum le plus concentré, correspondant à une DO_{600 nm} de 3 (10 X). Toutefois, les bioactivités obtenues avec les concentrations de 5 X et 10 X n'ont montré aucune différence significative. Par conséquent, un inoculum de 5 X a été sélectionné afin de faciliter la réalisation des fermentations à petite et grande échelle.

Après avoir sélectionné de nouveaux paramètres de fermentation, les expériences se sont portées sur l'optimisation des conditions de croissance. Un premier test a permis d'identifier les auxotrophies en acides aminés et en vitamines des trois souches sélectionnées. Ce test a révélé des auxotrophies pour la valine, la leucine, la méthionine et la vitamine B5. Pour remédier à ces carences, de l'extrait de levure a été ajouté au milieu de fermentation, ce qui a permis une augmentation notable de la croissance des souches de *Lactobacillus*. Néanmoins, ce point demandera des investigations futures.

Après avoir sélectionnées les épluchures d'endives, les trois souches de *Lactobacillus* et améliorés certains paramètres, des fermentations à l'échelle du bioréacteur de 300 mL ont été réalisées. Les surnageants de ces fermentations ont ensuite été soumis à une digestion gastro-intestinale *in vitro*, et mis en contact avec une coculture de cellules Caco-2/HT29-MTX simulant la barrière intestinale afin d'étudier leur impact sur l'activité antioxydante. Cette dernière a donc été évaluée après chaque étape du processus : la fermentation, la digestion gastro-intestinale et le passage de la barrière intestinale. Les activités antioxydantes sont restées relativement élevées, bien que les écarts entre les surnageants des macérations contrôles et ceux issus des fermentations se soient réduits au fil des étapes. Toutefois, des améliorations notables de l'activité antioxydante sur les cellules HepG2, après passage de la barrière intestinale, ont été observées par rapport

aux macérations contrôles, avec des augmentations respectives de 5, 9 et 12 % pour les souches 31c, RC16 et 46a.

En conclusion, la fermentation lactique permet de valoriser les épluchures d'endives en améliorant leur activité antioxydante sur des lignées cellulaires hépatiques et intestinales, tout en montrant une bonne résistance à la digestion gastro-intestinale et au passage de la barrière intestinale. L'ensemble de ces résultats est prometteur pour le développement d'un ingrédient santé innovant (**Figure 49**).

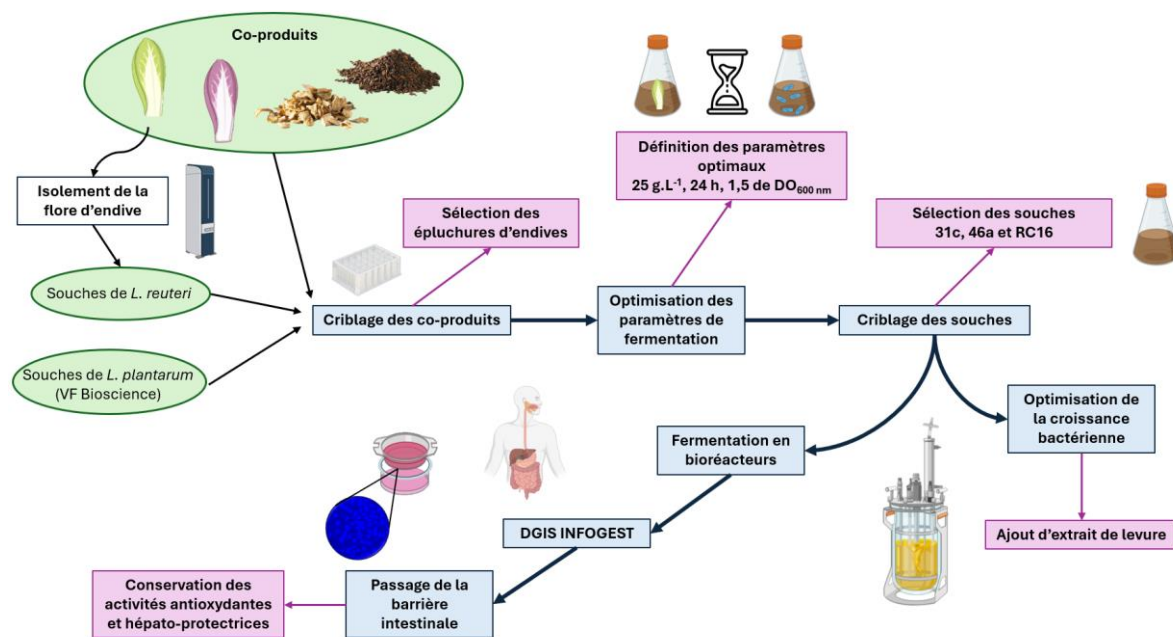


Figure 49 : Schéma récapitulatif de la démarche scientifique et des principaux résultats de la thèse.

Ce projet a permis d'isoler trois souches de *Limosilactobacillus reuteri* à partir des co-produits de l'endive. Ces souches, ainsi que celle de *L. plantarum* issues de la collection de VF Bioscience ont été utilisées pour fermenter les co-produits de chicorée et d'endives. A l'issue de ces fermentations, les épluchures d'endives et les souches 31c, 46a et RC16 ont été sélectionnées pour leur potentiel. Par la suite, les paramètres de fermentation ont été optimisés, et les conditions de croissance des *Lactobacillus* ont été améliorées. En parallèle, l'impact de la digestion gastro-intestinale et du passage de la barrière intestinale, simulée par la coculture de cellules intestinales, ont été évalués. Ces expériences ont montré une préservation des activités antioxydante et hépato-protectrice des fermentations.

Les prochaines étapes de ce projet consisteront à vérifier l'activité anti-inflammatoire des fermentations réalisées en bioréacteurs, après la digestion gastro-intestinale et le passage au travers de la barrière intestinale. Par ailleurs, le retraitement informatique des données obtenues suite à l'analyse HPLC-MS/MS des surnageants de fermentation, de

digestion gastro-intestinale et après le passage de la barrière intestinale est en cours. Ces résultats fourniront des informations sur les molécules potentiellement responsables des activités observées. Les surnageants de fermentation, de digestion ainsi que le contenu basolatéral provenant des expériences de passage de la barrière intestinale sont des échantillons très complexes, contenant une grande quantité de molécules, parfois difficiles à identifier. Afin d'identifier les molécules responsables des activités biologiques observées, il serait nécessaire de fragmenter les surnageants afin d'identifier les molécules actives. À cette fin, des extractions assistées par ultrasons, à l'aide d'alcool ou de méthanol, pourraient être utilisées (Pradal et al., 2016; Luntraru et al., 2022). D'autres techniques d'extraction sans solvant peuvent être utilisées comme les extractions par ultrasons, micro-ondes, champs électriques pulsés ou utilisant certaines enzymes (Panja, 2018).

À plus long terme, d'autres perspectives pourraient être envisagées, telles qu'une optimisation complète du milieu de fermentation. Bien que l'extrait de levure ait permis d'optimiser la croissance des *Lactobacillus*, le milieu de fermentation pourrait encore être enrichi par d'autres composés comme une source de sucre (carbone) facilement fermentescible. Après cette supplémentation, il sera essentiel de vérifier que l'ajout de sucres fermentescibles ne favorise pas uniquement la production d'acide lactique, mais qu'il contribue également à améliorer la croissance des *Lactobacillus*, dans le but d'augmenter les activités biologiques d'intérêts.

En plus de cette optimisation, il serait pertinent d'explorer la combinaison de plusieurs souches de *Lactobacillus* afin de déterminer si des effets synergiques pourraient améliorer les activités des surnageants de fermentation, que ce soit par l'augmentation de la quantité ou par la diversité des molécules actives produites. Une étude a évalué la fermentation de jus de poire en mono et biculture de bactéries lactiques. Les fermentations avec une seule souche ont montré de bons résultats, mais une des trois combinaisons testées a permis une meilleure prolifération des souches dans le milieu de fermentation, ainsi qu'une activité antioxydante plus importante que celle obtenue en monoculture (Wang et al., 2021).

Ensuite, il serait intéressant de regarder le mode d'action des molécules bioactives et les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les bioactivités observées.

Pour cela, il serait pertinent d'étudier l'expression des ARNm de TLR4 au niveau cellulaire afin de déterminer si l'activité observée est due aux polyphénols. Les récepteurs TLR, en particulier TLR4, reconnaissent généralement les motifs moléculaires associés aux pathogènes. Certains polyphénols peuvent inhiber ces TLR4 ou d'autres molécules impliquées dans la voie de signalisation TLR4/NF- κ B, et ainsi exercer une activité anti-inflammatoire via les TLR4 (**Figure 50**) (Arya et al., 2020; Coutinho-Wolino et al., 2022; Yu et al., 2022). L'utilisation de ces anticorps anti-TLR pourrait donc permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action des polyphénols de l'endive sur les cellules Caco-2 et HepG2.

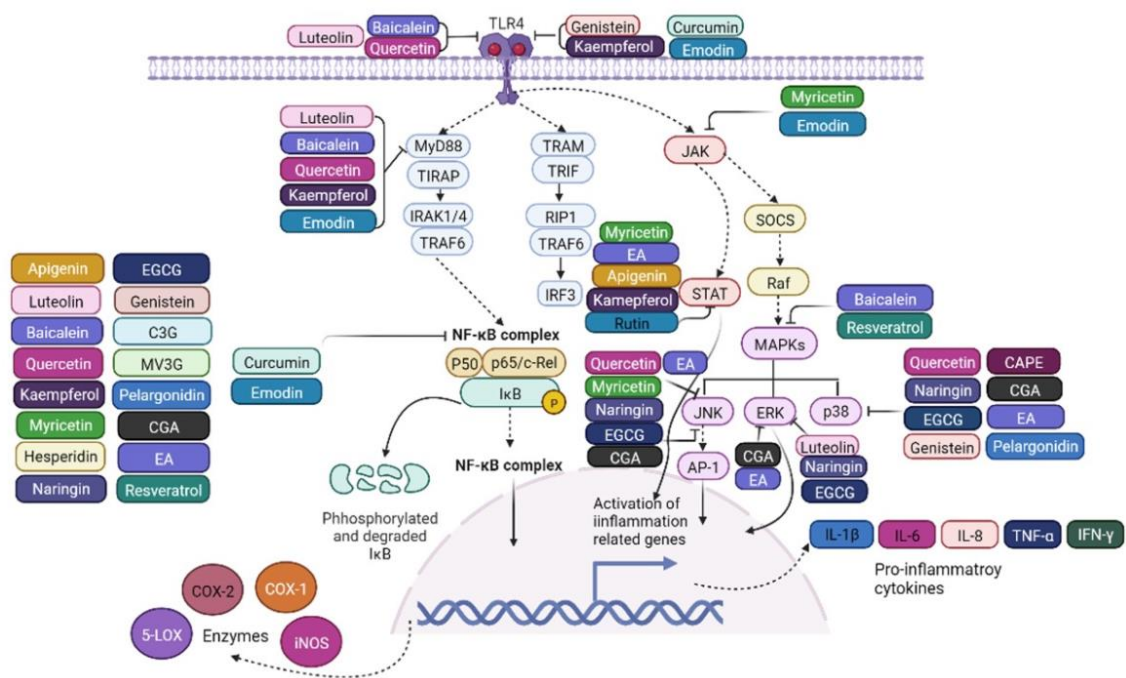


Figure 50 : Interactions des polyphénols avec la voie de signalisation TLR4/NF- κ B (Yu et al. 2022).

—| : inhibition, -----> : activation. De nombreuses classes de polyphénols sont capables d'inhiber les TLR4 ainsi que d'autres médiateurs qui activent la voie de signalisation TLR4/NF- κ B, empêchant ainsi l'activation de la réponse inflammatoire, la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et d'enzymes anti-inflammatoires.

D'autres méthodes pourraient être utilisées pour mieux comprendre certains mécanismes d'action. La cytométrie en flux permet d'analyser certains marqueurs présents à la surface ou à l'intérieur des cellules, ainsi que de détecter des ARNm à l'aide de fluorochromes. Cette méthode permettrait d'identifier des changements potentiels au sein des cellules lorsqu'elles sont exposées aux surnageants de fermentation.

L'activité antioxydante étant au cœur de ce projet, différents tests enzymatiques pourraient être mis en place pour comprendre les mécanismes d'action des molécules actives, telles que les polyphénols, sur les cellules. Pour cela, des enzymes impliquées dans les processus d'oxydation, comme la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, la lactate déshydrogénase ou la NADPH oxydase, pourraient être quantifiées (Gülçin, 2020). De plus, l'utilisation de RNA seq serait intéressante afin de quantifier l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le stress oxydatif mentionnées ci-dessus, ainsi que les gènes associés à des voies de signalisation comme Nrf2 ou Keap1 (**Figure 51**) (Li et al., 2018).

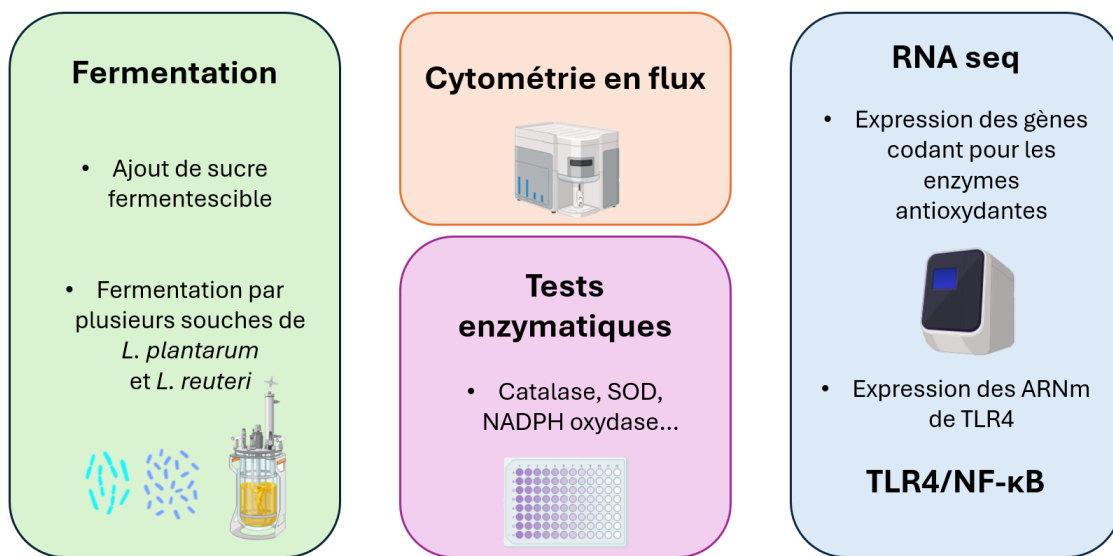


Figure 51 : Perspectives envisagées pour la suite du projet.

L'optimisation de la fermentation, notamment par la supplémentation du milieu de culture en glucose et la fermentation par plusieurs souches de *Lactobacillus*, pourraient améliorer l'activité antioxydante. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des surnageants de fermentation sur les cellules et d'identifier les molécules responsables des activités biologiques, des analyses par cytométrie en flux et des tests enzymatiques pourraient être menés. De plus, l'étude de l'expression génique pourrait apporter des informations sur l'impact des surnageants de fermentation sur certaines voies de signalisation comme TLR4/NF-κB.

L'objectif de cette étude est de développer un ingrédient santé à partir de la fermentation lactique de co-produits de chicorée et d'endives. Les résultats obtenus montrent que la fermentation des épluchures d'endives par les souches de *Lactobacillus* permet d'améliorer leur activité antioxydante. De plus, cette activité est conservée après la digestion gastro-intestinale et le passage de la barrière intestinale. Ces résultats sont donc encourageants pour le développement de cet ingrédient antioxydant en question.

Références

- Abd El-sattar, T., Abo-Srea, M., and EL-Sawah, T. (2017). Properties of Bio-Fermented Milk as Influenced with the Addition of Chicory (*Cichorium intybus* L) Roots Powder. *Journal of Food and Dairy Sciences* 8, 309–314. doi: 10.21608/jfds.2017.38723
- Agroalimentaire | La Chicorée Leroux (2024). Available at: <https://www.action-agricole-picarde.com/la-chicoree-leroux-change-de-propretaire> (Accessed April 29, 2024).
- Aguirre Santos, E. A., Schieber, A., and Weber, F. (2018). Site-specific hydrolysis of chlorogenic acids by selected *Lactobacillus* species. *Food Research International* 109, 426–432. doi: 10.1016/j.foodres.2018.04.052
- Akyol, S., Ozturk, G., Ginis, Z., Armutcu, F., Yigitoglu, M. R., and Akyol, O. (2013). In Vivo and In Vitro Antineoplastic Actions of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE): Therapeutic Perspectives. *Nutrition and Cancer* 65, 515–526. doi: 10.1080/01635581.2013.776693
- Alharthi, F. (2023). Chicoric acid enhances the antioxidative defense system and protects against inflammation and apoptosis associated with the colitis model induced by dextran sulfate sodium in rats. *Environ Sci Pollut Res* 30, 119814–119824. doi: 10.1007/s11356-023-30742-y
- Ali, Md. S., Lee, E.-B., Lee, S.-J., Lee, S.-P., Bobby, N., Suk, K., et al. (2021). Aronia melanocarpa Extract Fermented by *Lactobacillus plantarum* EJ2014 Modulates Immune Response in Mice. *Antioxidants* 10, 1276. doi: 10.3390/antiox10081276
- Amorati, R., and Valgimigli, L. (2015). Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research* 49, 633–649. doi: 10.3109/10715762.2014.996146
- Antonio, M. A. D., Hawes, S. E., and Hillier, S. L. (1999). The Identification of Vaginal *Lactobacillus* Species and the Demographic and Microbiologic Characteristics of Women Colonized by These Species. *J INFECT DIS* 180, 1950–1956. doi: 10.1086/315109
- APEF – endive.fr (n.d.). Available at: <https://www.endive.fr/apef-aop-endives/> (Accessed March 8, 2024).
- Arakawa, K., Matsunaga, K., Takihiro, S., Moritoki, A., Ryuto, S., Kawai, Y., et al. (2015). *Lactobacillus gasseri* requires peptides, not proteins or free amino acids, for growth in milk. *Journal of Dairy Science* 98, 1593–1603. doi: 10.3168/jds.2014-8860
- Arrieta-Baez, D., Dorantes-Álvarez, L., Martínez-Torres, R., Zepeda-Vallejo, G., Jaramillo-Flores, M. E., Ortiz-Moreno, A., et al. (2012). Effect of thermal sterilization on ferulic, coumaric and cinnamic acids: dimerization and antioxidant activity. *J Sci Food Agric* 92, 2715–2720. doi: 10.1002/jsfa.5695

- Arya, V. S., Kanthlal, S. K., and Linda, G. (2020). The role of dietary polyphenols in inflammatory bowel disease: A possible clue on the molecular mechanisms involved in the prevention of immune and inflammatory reactions. *J. Food Biochem.* 44. doi: 10.1111/jfbc.13369
- Aryani, D. C., Zwietering, M. H., and Den Besten, H. M. W. (2016). The effect of different matrices on the growth kinetics and heat resistance of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology* 238, 326–337. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.012
- Arzami, A. N., Ho, T. M., and Mikkonen, K. S. (2022). Valorization of cereal by-product hemicelluloses: Fractionation and purity considerations. *Food Research International* 151, 110818. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110818
- Atta, A., Elkoly, T., Mounair, S., Kamel, G., Alwabel, N., and Zaher, S. (2010). Hepatoprotective effect of methanol extracts of *Zingiber officinale* and *Cichorium intybus*. *Indian J Pharm Sci* 72, 564. doi: 10.4103/0250-474X.78521
- Azay-Milhau, J., Ferrare, K., Leroy, J., Aubaterre, J., Tournier, M., Lajoix, A.-D., et al. (2013). Antihyperglycemic effect of a natural chicoric acid extract of chicory (*Cichorium intybus* L.): A comparative in vitro study with the effects of caffeic and ferulic acids. *Journal of Ethnopharmacology* 150, 755–760. doi: 10.1016/j.jep.2013.09.046
- Baixinho, J. P., Anastácio, J. D., Ivasiv, V., Cankar, K., Bosch, D., Menezes, R., et al. (2021). Supercritical CO₂ Extraction as a Tool to Isolate Anti-Inflammatory Sesquiterpene Lactones from *Cichorium intybus* L. Roots. *Molecules* 26, 2583. doi: 10.3390/molecules26092583
- Baker, I., Chohan, M., and Opara, E. I. (2013). Impact of cooking and digestion, in vitro, on the antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of cinnamon, clove and nutmeg. *Plant Foods Hum Nutr* 68, 364–369. doi: 10.1007/s11130-013-0379-4
- Barcelos, M. C. S., Ramos, C. L., Kuddus, M., Rodriguez-Couto, S., Srivastava, N., Ramteke, P. W., et al. (2020). Enzymatic potential for the valorization of agro-industrial by-products. *Biotechnol Lett* 42, 1799–1827. doi: 10.1007/s10529-020-02957-3
- Barthelmebs, L., Divies, C., and Cavin, J.-F. (2000). Knockout of the *p*-Coumarate Decarboxylase Gene from *Lactobacillus plantarum* Reveals the Existence of Two Other Inducible Enzymatic Activities Involved in Phenolic Acid Metabolism. *Appl Environ Microbiol* 66, 3368–3375. doi: 10.1128/AEM.66.8.3368-3375.2000
- Beam, A., Clinger, E., and Hao, L. (2021). Effect of Diet and Dietary Components on the Composition of the Gut Microbiota. *Nutrients* 13, 2795. doi: 10.3390/nu13082795

- Beaudor, M., Vauchel, P., Pradal, D., Aljawish, A., and Phalip, V. (2023). Comparing the efficiency of extracting antioxidant polyphenols from spent coffee grounds using an innovative ultrasound-assisted extraction equipment versus conventional method. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* 188, 109358. doi: 10.1016/j.cep.2023.109358
- Bibbò, S., Ianiro, G., Giorgio, V., Scaldaferrì, F., Masucci, L., Gasbarrini, A., et al. (2016). The role of diet on gut microbiota composition.
- Bischoff, T. A., Kelley, C. J., Karchesy, Y., Laurantos, M., Nguyen-Dinh, P., and Arefi, A. G. (2004). Antimalarial activity of Lactucin and Lactucopicrin: sesquiterpene lactones isolated from *Cichorium intybus* L. *Journal of Ethnopharmacology* 95, 455–457. doi: 10.1016/j.jep.2004.06.031
- Boaventura, B. C. B., Amboni, R. D. D. M. C., Da Silva, E. L., Prudencio, E. S., Di Pietro, P. F., Malta, L. G., et al. (2015). Effect of in vitro digestion of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells. *Food Research International* 77, 257–263. doi: 10.1016/j.foodres.2015.05.004
- Bouma, G., and Strober, W. (2003). The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3, 521–533. doi: 10.1038/nri1132
- Bringel, F., and Hubert, J.-C. (2003). Extent of genetic lesions of the arginine and pyrimidine biosynthetic pathways in *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, and *L. casei*: prevalence of CO(2)-dependent auxotrophs and characterization of deficient *arg* genes in *L. plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 69, 2674–2683. doi: 10.1128/AEM.69.5.2674-2683.2003
- Brodkorb, A., Egger, L., Almingier, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., et al. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc* 14, 991–1014. doi: 10.1038/s41596-018-0119-1
- Bron, P. A., Benchimol, M. G., Lambert, J., Palumbo, E., Deghorain, M., Delcour, J., et al. (2002). Use of the *alr* Gene as a Food-Grade Selection Marker in Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68, 5663–5670. doi: 10.1128/AEM.68.11.5663-5670.2002
- Cankar, K., Hakkert, J. C., Sevenier, R., Papastolopoulou, C., Schipper, B., Baixinho, J. P., et al. (2023). Lactucin Synthase Inactivation Boosts the Accumulation of Anti-inflammatory 8-Deoxylactucin and Its Derivatives in Chicory (*Cichorium intybus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, acs.jafc.2c08959. doi: 10.1021/acs.jafc.2c08959
- Caron, J., Domenger, D., Dhulster, P., Ravallec, R., and Cudennec, B. (2017). Using Caco-2 cells as novel identification tool for food-derived DPP-IV inhibitors. *Food Research International* 92, 113–118. doi: 10.1016/j.foodres.2017.01.002

- Chamorro, S., Goñi, I., Viveros, A., Hervert-Hernández, D., and Brenes, A. (2012). Changes in polyphenolic content and antioxidant activity after thermal treatments of grape seed extract and grape pomace. *Eur Food Res Technol* 234, 147–155. doi: 10.1007/s00217-011-1621-7
- Chapoutot, P., Rouillé, B., Sauvant, D., and Renaud, B. (2018). Les coproduits de l'industrie agro-alimentaire : des ressources alimentaires de qualité à ne pas négliger. *INRAE Productions Animales* 31, 201–220. doi: 10.20870/productions-animales.2018.31.3.2353
- Chen, J. H., and Ho, C. T. (1997). Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *Agricultural And Food Chemistry* 45, 2374–2378. doi: 10.1021/jf970055t
- Chen, J., Yu, B., Chen, D., Huang, Z., Mao, X., Zheng, P., et al. (2018). Chlorogenic acid improves intestinal barrier functions by suppressing mucosa inflammation and improving antioxidant capacity in weaned pigs. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 59, 84–92. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.06.005
- Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., and Wang, Y. (2010). 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radical Research* 44, 587–604. doi: 10.3109/10715761003709802
- Chicorée et endive (n.d.). Available at: <https://biologie.ens-lyon.fr/ressources/Biodiversite/Documents/la-plante-du-mois/chicoree-et-endive> (Accessed October 8, 2024).
- Chingsuwanrote, P., Muangnoi, C., Parengam, K., and Tuntipopipat, S. (2016). Antioxidant and anti-inflammatory activities of durian and rambutan pulp extract. *International Food Research Journal* 23, 939–947.
- Chong, W., Shastri, M., and Eri, R. (2017). Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Nexus Implicated in Bowel Disease Pathophysiology. *IJMS* 18, 771. doi: 10.3390/ijms18040771
- Consuegra, J., Grenier, T., Baa-Puyoulet, P., Rahioui, I., Akherraz, H., Gervais, H., et al. (2020). Drosophila-associated bacteria differentially shape the nutritional requirements of their host during juvenile growth. *PLoS Biol* 18, e3000681. doi: 10.1371/journal.pbio.3000681
- Conte, A., and Del Nobile, M. A. (2023). Introduction to the Special Issue “Scientific Breakthroughs to Fruit and Vegetable By-Product Valorization in the Food Sector.” *Foods* 12, 2726. doi: 10.3390/foods12142726
- Coutinho-Wolino, K. S., Almeida, P. P., Mafra, D., and Stockler-Pinto, M. B. (2022). Bioactive compounds modulating Toll-like 4 receptor (TLR4)-mediated inflammation: pathways involved and future perspectives. *Nutrition Research* 107, 96–116. doi: 10.1016/j.nutres.2022.09.001

- Crujeiras, A. B., Goyenechea, E., and Martínez, J. A. (2010). "Fruit, Vegetables, and Legumes Consumption," in *Bioactive Foods in Promoting Health*, (Elsevier), 359–380. doi: 10.1016/B978-0-12-374628-3.00024-4
- Curiel, J. A., Pinto, D., Marzani, B., Filannino, P., Farris, G. A., Gobbetti, M., et al. (2015). Lactic acid fermentation as a tool to enhance the antioxidant properties of *Myrtus communis* berries. *Microb Cell Fact* 14, 67. doi: 10.1186/s12934-015-0250-4
- Dai, J., Fang, L., Zhang, M., Deng, H., Cheng, X., Yao, M., et al. (2022). Isolation and identification of new source of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* C010 and growth kinetics of its batch fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 38, 67. doi: 10.1007/s11274-022-03244-1
- De Lima Brossi, M. J., Jiménez, D. J., Cortes-Tolalpa, L., and Van Elsas, J. D. (2016). Soil-Derived Microbial Consortia Enriched with Different Plant Biomass Reveal Distinct Players Acting in Lignocellulose Degradation. *Microb Ecol* 71, 616–627. doi: 10.1007/s00248-015-0683-7
- De Montijo-Prieto, S., Razola-Díaz, M. D. C., Barbieri, F., Tabanelli, G., Gardini, F., Jiménez-Valera, M., et al. (2023). Impact of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Avocado Leaf Extracts. *Antioxidants* 12, 298. doi: 10.3390/antiox12020298
- Définition anti-inflammatoire (n.d.). Available at: <https://www.e-cancer.fr/Dictionnaire/A/anti-inflammatoire> (Accessed August 1, 2024).
- Définition inflammation (n.d.). Available at: <https://www.e-cancer.fr/Dictionnaire/I/inflammation> (Accessed August 1, 2024).
- Dei Piu', L., Tassoni, A., Serrazanetti, D. I., Ferri, M., Babini, E., Tagliazucchi, D., et al. (2014). Exploitation of starch industry liquid by-product to produce bioactive peptides from rice hydrolyzed proteins. *Food Chemistry* 155, 199–206. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.055
- Deng, J., Yang, H., Capanoglu, E., Cao, H., and Xiao, J. (2018a). "Technological aspects and stability of polyphenols," in *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, (Elsevier), 295–323. doi: 10.1016/B978-0-12-813572-3.00009-9
- Deng, J., Yang, H., Capanoglu, E., Cao, H., and Xiao, J. (2018b). "Technological aspects and stability of polyphenols," in *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, (Elsevier), 295–323. doi: 10.1016/B978-0-12-813572-3.00009-9
- Devarbhavi, H., Asrani, S. K., Arab, J. P., Nartey, Y. A., Pose, E., and Kamath, P. S. (2023). Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of Hepatology* 79, 516–537. doi: 10.1016/j.jhep.2023.03.017
- Dinarello, C. A. (2010). Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell* 140, 935–950. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.043

- Duar, R. M., Kyle, D., and Casaburi, G. (2020). Colonization Resistance in the Infant Gut: The Role of *B. infantis* in Reducing pH and Preventing Pathogen Growth. *High-Throughput* 9, 7. doi: 10.3390/ht9020007
- Dugardin, C., Fleury, L., Touche, V., Ahdach, F., Lesage, J., Tenenbaum, M., et al. (2022). An Exploratory Study of the Role of Dietary Proteins in the Regulation of Intestinal Glucose Absorption. *Front. Nutr.* 8, 769773. doi: 10.3389/fnut.2021.769773
- Duman, M., Saticioglu, I. B., Buyukekiz, A. G., Balta, F., and Altun, S. (2017). Caractérisation moléculaire et profil de résistance antimicrobienne de *Citrobacter gillenii* atypique et *Citrobacter* sp. isolés à partir de truite *arc-en-ciel* malade (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 10, 136–142. doi: 10.1016/j.jgar.2017.05.014
- Durazzo, A., Andrzejewska, J., and Enioutina, E. Y. (2021). Valuable Hepatoprotective Plants - How Can We Optimize Waste Free Uses of Such Highly Versatile Resources? *Frontiers in Pharmacology* 12.
- Dussert, E. (2020). Étude des activités antioxydantes et anti-inflammatoires de métabolites secondaires bactériens produits directement dans l'eau, en modèles acellulaires, cellulaires et par la mise en place d'un modèle original de barrière intestinale.
- Endive. Agreste, la statistique agricole (2024). Available at: <https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/disaron/IraLeg23130/detail/> (Accessed January 16, 2024).
- Fabrication de la chicorée (n.d.). *Chicorée Leroux*. Available at: <https://www.leroux.com/fabrication/> (Accessed March 8, 2024).
- Farag, M. R., Zizzadoro, C., Alagawany, M., Abou-Zeid, S. M., Mawed, S. A., El Kholy, M. S., et al. (2023). In ovo protective effects of chicoric and rosmarinic acids against Thiachlopid-induced cytotoxicity, oxidative stress, and growth retardation on newly hatched chicks. *Poultry Science* 102, 102487. doi: 10.1016/j.psj.2023.102487
- Fazal, M.-A., Alexander, S., Grayson, N. E., Deheer-Graham, A., Oliver, K., Holroyd, N., et al. (2019). Complete Whole-Genome Sequences of Two *Raoultella terrigena* Strains, NCTC 13097 and NCTC 13098, Isolated from Human Cases. *Microbiol Resour Announc* 8, e00239-19. doi: 10.1128/MRA.00239-19
- Federico, B., Pinto, L., Quintieri, L., Carito, A., Calabrese, N., and Caputo, L. (2015). Efficacy of lactoferricin B in controlling ready-to-eat vegetable spoilage caused by *Pseudomonas* spp. *International Journal of Food Microbiology* 215, 179–186. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.017
- Ferreira, P. S., Victorelli, F. D., Fonseca-Santos, B., and Chorilli, M. (2019). A Review of Analytical Methods for *p*-Coumaric Acid in Plant-Based Products, Beverages, and Biological Matrices. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 49, 21–31. doi: 10.1080/10408347.2018.1459173

- Ferri, M., Graen-Heedfeld, J., Bretz, K., Guillon, F., Michelini, E., Calabretta, M. M., et al. (2017). Peptide Fractions Obtained from Rice By-Products by Means of an Environment-Friendly Process Show In Vitro Health-Related Bioactivities. *PLoS ONE* 12, e0170954. doi: 10.1371/journal.pone.0170954
- Fleury, L., Deracinois, B., Dugardin, C., Nongonierma, A. B., FitzGerald, R. J., Flahaut, C., et al. (2022). In Vivo and In Vitro Comparison of the DPP-IV Inhibitory Potential of Food Proteins from Different Origins after Gastrointestinal Digestion. *IJMS* 23, 8365. doi: 10.3390/ijms23158365
- Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., and Louis, P. (2015). Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 74, 13–22. doi: 10.1017/S0029665114001463
- Fox, J. (2005). The R Commander: A Basic-Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software* 14, 1–42. doi: 10.18637/jss.v014.i09
- Fritsch, C., Jänsch, A., Ehrmann, M. A., Toelstede, S., and Vogel, R. F. (2017). Characterization of Cinnamoyl Esterases from Different Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr Microbiol* 74, 247–256. doi: 10.1007/s00284-016-1182-x
- Furger, C. (2021). Live Cell Assays for the Assessment of Antioxidant Activities of Plant Extracts. *Antioxidants* 10, 944. doi: 10.3390/antiox10060944
- García-Herrera, P., Morales, P., Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., Tardío, J., and Sánchez-Mata, M. C. (2020). Nutritional and Phytochemical Composition of Mediterranean Wild Vegetables after Culinary Treatment. *Foods* 9, 1761. doi: 10.3390/foods9121761
- Ge, H., Chen, Y., Chen, J., Tian, J., Liang, X., and Chen, L. (2018). Evaluation of antioxidant activities of ethanol extract from *Ligusticum* subjected to in-vitro gastrointestinal digestion. *Food and Chemical Toxicology* 119, 417–424. doi: 10.1016/j.fct.2017.12.035
- Ghamarian, A., Abdollahi, M., Su, X., Amiri, A., Ahadi, A., and Nowrouzi, A. (2012). Effect of chicory seed extract on glucose tolerance test (GTT) and metabolic profile in early and late stage diabetic rats. *DARU J Pharm Sci* 20, 56. doi: 10.1186/2008-2231-20-56
- Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., et al. (2005). Electron Transfer between Cytochrome c and p66Shc Generates Reactive Oxygen Species that Trigger Mitochondrial Apoptosis. *Cell* 122, 221–233. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.011
- Godlewska-Żyłkiewicz, B., Świsłocka, R., Kalinowska, M., Golonko, A., Świdorski, G., Arciszewska, Ż., et al. (2020). Biologically Active Compounds of Plants: Structure-Related Antioxidant, Microbiological and Cytotoxic Activity of Selected Carboxylic Acids. *Materials* 13, 4454. doi: 10.3390/ma13194454

- Gök, V., Çağlar, M. Y., and Tomar, O. (2021). Comparison of chemical properties, antioxidant capacity, and phenolic acids of autoclaved and unautoclaved ground mustard seeds. *Food Sci. Technol* 41, 513–518. doi: 10.1590/fst.09020
- Goldstein, E. J. C., Tyrrell, K. L., and Citron, D. M. (2015). Lactobacillus Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases* 60, S98–S107. doi: 10.1093/cid/civ072
- González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., et al. (2011). Effects of Flavonoids and other Polyphenols on Inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51, 331–362. doi: 10.1080/10408390903584094
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 86, 345–391. doi: 10.1007/s00204-011-0774-2
- Gülçin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol* 94, 651–715. doi: 10.1007/s00204-020-02689-3
- Gurram, S., Chinni Preetam, V., Vijaya Lakshmi, K., Raju, M. V. L. N., Venkateswarlu, M., and Bora, S. (2022). Synergistic effect of probiotic, chicory root powder and coriander seed powder on growth performance, antioxidant activity and gut health of broiler chickens. *PLoS ONE* 17, e0270231. doi: 10.1371/journal.pone.0270231
- Guzmán-Lagunes, F., Martínez-dlCruz, L., Wongsirichot, P., Winterburn, J., and Montiel, C. (2024). Production of polyhydroxybutyrate by coupled saccharification–fermentation of inulin. *Bioprocess Biosyst Eng* 47, 119–129. doi: 10.1007/s00449-023-02953-7
- Ha, S. K., Park, H.-Y., Eom, H., Kim, Y., and Choi, I. (2012). Narirutin fraction from citrus peels attenuates LPS-stimulated inflammatory response through inhibition of NF- κ B and MAPKs activation. *Food and Chemical Toxicology* 50, 3498–3504. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.007
- Häkkinen, S. T., Cankar, K., Nohynek, L., Suomalainen, M., van Arkel, J., Siika-Aho, M., et al. (2022). Enzyme-treated chicory for cosmetics: application assessment and techno-economic analysis. *AMB Express* 12, 152. doi: 10.1186/s13568-022-01494-8
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., and Ross, R. P. (2018). The Lactobacillus casei Group: History and Health Related Applications. *Front. Microbiol.* 9, 2107. doi: 10.3389/fmicb.2018.02107
- Hole, A. S., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J., and Sahlstrøm, S. (2012). Improved Bioavailability of Dietary Phenolic Acids in Whole Grain Barley and Oat Groat following Fermentation with Probiotic Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus johnsonii, and Lactobacillus reuteri. *J. Agric. Food Chem.* 60, 6369–6375. doi: 10.1021/jf300410h

- Huang, W., Mao, S., Zhang, L., Lu, B., Zheng, L., Zhou, F., et al. (2017). Phenolic compounds, antioxidant potential and antiproliferative potential of 10 common edible flowers from China assessed using a simulated *in vitro* digestion–dialysis process combined with cellular assays. *J Sci Food Agric* 97, 4760–4769. doi: 10.1002/jsfa.8345
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y.-C., Choi, I., and Kim, G.-B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry* 160, 346–356. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.112
- Ignat, M. V., Coldea, T. E., Salanță, L. C., and Mudura, E. (2021). Plants of the Spontaneous Flora with Beneficial Action in the Management of Diabetes, Hepatic Disorders, and Cardiovascular Disease. *Plants* 10, 216. doi: 10.3390/plants10020216
- Iyer, S. S., and Cheng, G. (2012). Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol* 32, 23–63. doi: 10.1615/CritRevImmunol.v32.i1.30
- Jackson, K. M. P., Rathinasabapathy, T., Esposito, D., and Komarnytsky, S. (2017). Structural constraints and importance of caffeic acid moiety for anti-hyperglycemic effects of caffeoylquinic acids from chicory. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 1601118. doi: 10.1002/mnfr.201601118
- Janda, K., Gutowska, I., Geszke-Moritz, M., and Jakubczyk, K. (2021). The Common Chicory (*Cichorium intybus* L.) as a Source of Extracts with Health-Promoting Properties—A Review. *Molecules* 26, 1814. doi: 10.3390/molecules26061814
- Jeong, D., Kim, D.-H., Oh, Y.-T., Chon, J.-W., Kim, H., Jeong, D.-K., et al. (2017). Production of Bioactive Yoghurt containing *Cichorium intybus* L. (Chicory) Extract - Preliminary Study. *J. Milk Sci. Biotechnol.* 35, 9–15. doi: 10.22424/jmsb.2017.35.1.009
- Joglekar, P., Conlan, S., Lee-Lin, S.-Q., Deming, C., Kashaf, S. S., NISC Comparative Sequencing Program, et al. (2023). Integrated genomic and functional analyses of human skin-associated *Staphylococcus* reveals extensive inter- and intra-species diversity. doi: 10.1101/2023.06.22.546190
- Kagkli, D. M., Corich, V., Bovo, B., Lante, A., and Giacomini, A. (2016). Antiradical and antimicrobial properties of fermented red chicory (*Cichorium intybus* L.) by-products. *Ann Microbiol* 66, 1377–1386. doi: 10.1007/s13213-016-1225-3
- Kaur, N., and Gupta, A. K. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci* 27, 703–714. doi: 10.1007/BF02708379
- Keshk, W. A., Soliman, N. A., Ali, D. A., and Elseady, W. S. (2019). Mechanistic evaluation of AMPK/SIRT1/FXR signaling axis, inflammation, and redox status in thioacetamide-induced liver cirrhosis: The role of *Cichorium intybus* linn (chicory)-supplemented diet. *Journal of Food Biochemistry* 43, e12938. doi: 10.1111/jfbc.12938

- Kim, D.-H., Jeong, D., Oh, Y.-T., Kim, H.-S., Kim, Y.-G., Song, K.-Y., et al. (2017). Manufacture of Functional Koumiss supplemented with *Cichorium intybus* L. (chicory) Extract - Preliminary Study. *J. Milk Sci. Biotechnol.* 35, 1–7. doi: 10.22424/jmsb.2017.35.1.001
- Kim, S.-B., Kang, B.-H., Kwon, H.-S., and Kang, J.-H. (2011). Antiinflammatory and Antiallergic Activity of Fermented Turmeric by *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203. *Microbiology and Biotechnology Letters* 39, 266–273.
- Kothari, D., Lee, W.-D., Jung, E. S., Niu, K.-M., Lee, C. H., and Kim, S.-K. (2020). Controlled Fermentation Using Autochthonous *Lactobacillus plantarum* Improves Antimicrobial Potential of Chinese Chives against Poultry Pathogens. *Antibiotics* 9, 386. doi: 10.3390/antibiotics9070386
- Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Lopez Garcia, I., Kookos, I. K., et al. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chem. Soc. Rev.* 43, 2587. doi: 10.1039/c3cs60293a
- Kwaw, E., Ma, Y., Tchabo, W., Apaliya, M. T., Wu, M., Sackey, A. S., et al. (2018). Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food Chemistry* 250, 148–154. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.009
- Kwoji, I. D., Okpeku, M., Adeleke, M. A., and Aiyegoro, O. A. (2022). Formulation of Chemically Defined Media and Growth Evaluation of *Ligilactobacillus salivarius* ZJ614 and *Limosilactobacillus reuteri* ZJ625. *Front. Microbiol.* 13, 865493. doi: 10.3389/fmicb.2022.865493
- La Chicorée (2024). *France Inter*. Available at: <https://www.radiofrance.fr/franceinter/podcasts/le-marche-de-francois-regis-gaudry/le-marche-de-frg-du-dimanche-17-mars-2024-3284227> (Accessed April 29, 2024).
- Latella, R., Calzoni, E., Urbanelli, L., Cerrotti, G., Porcellati, S., Emiliani, C., et al. (2024). Isolation of Extracellular Vesicles from Agri-Food Wastes: A Novel Perspective in the Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products. *Foods* 13, 1492. doi: 10.3390/foods13101492
- Le, B., Anh, P., and Yang, S. (2020). Enhancement of the Anti-Inflammatory Effect of Mustard Kimchi on RAW 264.7 Macrophages by the *Lactobacillus plantarum* Fermentation-Mediated Generation of Phenolic Compound Derivatives. *Foods* 9, 181. doi: 10.3390/foods9020181
- Le chicon, l'endive du Nord (2024). *Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire*. Available at: <https://agriculture.gouv.fr/le-chicon-lendive-du-nord> (Accessed April 25, 2024).

- Le Rouzic, M., Bruniaux, P., Raveschot, C., Krier, F., Phalip, V., Ravallec, R., et al. (2022). “*Lactobacillus* Use for Plant Fermentation: New Ways for Plant-Based Product Valorization,” in *Lactobacillus - A Multifunctional Genus [Working Title]*, (IntechOpen). doi: 10.5772/intechopen.104958
- Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* 25, 1–18. doi: 10.18637/jss.v025.i01
- Lee, H. J., Cha, K. H., Kim, C. Y., Nho, C. W., and Pan, C.-H. (2014). Bioavailability of Hydroxycinnamic Acids from *Crepidiastrum denticulatum* Using Simulated Digestion and Caco-2 Intestinal Cells. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5290–5295. doi: 10.1021/jf500319h
- Legrand, G., Delporte, M., Khelifi, C., Harant, A., Vuylsteker, C., Mörchen, M., et al. (2016). Identification and Characterization of Five BAHD Acyltransferases Involved in Hydroxycinnamoyl Ester Metabolism in Chicory. *Front Plant Sci* 7, 741. doi: 10.3389/fpls.2016.00741
- Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., and Fang, Z. (2021). Hydroxycinnamic acids on gut microbiota and health. *Comp Rev Food Sci Food Safe* 20, 710–737. doi: 10.1111/1541-4337.12663
- Lepczyński, A., Herosimczyk, A., Ożgo, M., Marynowska, M., Pawlikowska, M., Barszcz, M., et al. (2017). Dietary chicory root and chicory inulin trigger changes in energetic metabolism, stress prevention and cytoskeletal proteins in the liver of growing pigs – a proteomic study. *Animal Physiology Nutrition* 101. doi: 10.1111/jpn.12595
- Li, C. X., Wang, F. R., Zhang, B., Deng, Z. Y., and Li, H. Y. (2023). Stability and antioxidant activity of phenolic compounds during in vitro digestion. *J Food Sci* 88, 696–716. doi: 10.1111/1750-3841.16440
- Li, G.-Y. (2014). Hepatoprotective effect of *Cichorium intybus* L., a traditional Uighur medicine, against carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *WJG* 20, 4753. doi: 10.3748/wjg.v20.i16.4753
- Li, G.-Y., Zheng, Y.-X., Sun, F.-Z., Huang, J., Lou, M.-M., Gu, J.-K., et al. (2015). In Silico Analysis and Experimental Validation of Active Compounds from *Cichorium intybus* L. Ameliorating Liver Injury. *Int J Mol Sci* 16, 22190–22204. doi: 10.3390/ijms160922190
- Li, J., Moe, B., Liu, Y., and Li, X.-F. (2018a). Halobenzoquinone-Induced Alteration of Gene Expression Associated with Oxidative Stress Signaling Pathways. *Environ. Sci. Technol.* 52, 6576–6584. doi: 10.1021/acs.est.7b06428
- Li, Y., Liu, C., Zhang, Y., Mi, S., and Wang, N. (2011). Pharmacokinetics of ferulic acid and potential interactions with Honghua and clopidogrel in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 562–567. doi: 10.1016/j.jep.2011.06.011

- Li, Z., Teng, J., Lyu, Y., Hu, X., Zhao, Y., and Wang, M. (2018b). Enhanced Antioxidant Activity for Apple Juice Fermented with *Lactobacillus plantarum* ATCC14917. *Molecules* 24, 51. doi: 10.3390/molecules24010051
- Li, Z., Teng, J., Lyu, Y., Hu, X., Zhao, Y., and Wang, M. (2018c). Enhanced Antioxidant Activity for Apple Juice Fermented with *Lactobacillus plantarum* ATCC14917. *Molecules* 24, 51. doi: 10.3390/molecules24010051
- Liu, Y., Cheng, H., Liu, H., Ma, R., Ma, J., and Fang, H. (2019). Fermentation by Multiple Bacterial Strains Improves the Production of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Goji Juice. *Molecules* 24, 3519. doi: 10.3390/molecules24193519
- Liu, Y.-W., Liong, M.-T., and Tsai, Y.-C. (2018). New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis. *J Microbiol.* 56, 601–613. doi: 10.1007/s12275-018-8079-2
- Llorach, R., Tomás-Barberán, F. A., and Ferreres, F. (2004). Lettuce and Chicory Byproducts as a Source of Antioxidant Phenolic Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5109–5116. doi: 10.1021/jf040055a
- Lopes, L. D., Pereira E Silva, M. D. C., Weisberg, A. J., Davis, E. W., Yan, Q., Varize, C. D. S., et al. (2018). Genome variations between rhizosphere and bulk soil ecotypes of a *Pseudomonas koreensis* population. *Environmental Microbiology* 20, 4401–4414. doi: 10.1111/1462-2920.14363
- Lu, H., Tian, Z., Cui, Y., Liu, Z., and Ma, X. (2020). Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. *Comp Rev Food Sci Food Safe* 19, 3130–3158. doi: 10.1111/1541-4337.12620
- Luntrarau, C. M., Apostol, L., Oprea, O. B., Neagu, M., Popescu, A. F., Tomescu, J. A., et al. (2022). Reclaim and Valorization of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) By-Product: Antioxidant Activity and Chemical Characterization. *Foods* 11, 462. doi: 10.3390/foods11030462
- Mackowiak, B., Fu, Y., Maccioni, L., and Gao, B. (2024). Alcohol-associated liver disease. *Journal of Clinical Investigation* 134, e176345. doi: 10.1172/JCI176345
- Magiera, A., Czerwińska, M. E., Owczarek, A., Marchelak, A., Granica, S., and Olszewska, M. A. (2022). Polyphenols and Maillard Reaction Products in Dried *Prunus spinosa* Fruits: Quality Aspects and Contribution to Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity in Human Immune Cells Ex Vivo. *Molecules* 27, 3302. doi: 10.3390/molecules27103302
- Mahato, N., Sinha, M., Sharma, K., Koteswararao, R., and Cho, M. H. (2019). Modern Extraction and Purification Techniques for Obtaining High Purity Food-Grade Bioactive Compounds and Value-Added Co-Products from Citrus Wastes. *Foods* 8, 523. doi: 10.3390/foods8110523

- Majee, C., Mazumder, R., Choudhary, A. N., and Salahuddin, null (2023). An Insight into the Hepatoprotective Activity and Structure-activity Relationships of Flavonoids. *Mini Rev Med Chem* 23, 131–149. doi: 10.2174/1389557522666220602141142
- Malarz, J., Stojakowska, A., and Kisiel, W. (2013). Long-Term Cultured Hairy Roots of Chicory—A Rich Source of Hydroxycinnamates and 8-Deoxylactucin Glucoside. *Appl Biochem Biotechnol* 171, 1589–1601. doi: 10.1007/s12010-013-0446-1
- Mandato, C., Di Nuzzi, A., and Vajro, P. (2017). Nutrition and Liver Disease. *Nutrients* 10, 9. doi: 10.3390/nu10010009
- Mares, D., Romagnoli, C., Tosi, B., Andreotti, E., Chillemi, G., and Poli, F. (2005). Chicory extracts from *Cichorium intybus* L. as potential antifungals. *Mycopathologia* 160, 85–91. doi: 10.1007/s11046-004-6635-2
- Mauro, C. S. I., and Garcia, S. (2019). Coconut milk beverage fermented by *Lactobacillus reuteri*: optimization process and stability during refrigerated storage. *J Food Sci Technol* 56, 854–864. doi: 10.1007/s13197-018-3545-8
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* 140, 771–776. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006
- Melnichuk, N., Braia, M. J., Anselmi, P. A., Meini, M.-R., and Romanini, D. (2020). Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. *Waste Management* 106, 155–161. doi: 10.1016/j.wasman.2020.03.025
- Mendonça, J. D. S., Guimarães, R. D. C. A., Zorgetto-Pinheiro, V. A., Fernandes, C. D. P., Marcelino, G., Bogo, D., et al. (2022). Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. *Molecules* 27, 3563. doi: 10.3390/molecules27113563
- Meng, X., Lv, H., Ding, X., Jian, T., Guo, D., Feng, X., et al. (2022). Sesquiterpene lactones with anti-inflammatory and cytotoxic activities from the roots of *Cichorium intybus*. *Phytochemistry* 203, 113377. doi: 10.1016/j.phytochem.2022.113377
- Mesías, M., Wagner, M., George, S., and Morales, F. J. (2016). Impact of conventional sterilization and ohmic heating on the amino acid profile in vegetable baby foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 34, 24–28. doi: 10.1016/j.ifset.2015.12.031
- Meyer, T. (2018). Degradation of hydroxycinnamic acids as signal of plant perception: regulation and role in the *Agrobacterium fabrum* ecology.
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., et al. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 81, e00036-17. doi: 10.1128/MMBR.00036-17

- Moldovan, C.-V., Savu, M., Dussert, E., Aboubacar, H., Sarbu, L. G., Matiut, S., et al. (2022). Synthetic Flavonoid BrCl-Flav—An Alternative Solution to Combat ESKAPE Pathogens. *Antibiotics* 11, 1389. doi: 10.3390/antibiotics11101389
- Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Hadinejad, M., Emam-Djomeh, Z., and Mirzapour, M. (2013). Effect of Fermentation of Pomegranate Juice by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* on the Antioxidant Activity and Metabolism of Sugars, Organic Acids and Phenolic Compounds. *Food Biotechnology* 27, 1–13. doi: 10.1080/08905436.2012.724037
- Mullaly, S. C., and Kubes, P. (2006). The Role of TLR2 In Vivo following Challenge with *Staphylococcus aureus* and Prototypic Ligands. *The Journal of Immunology* 177, 8154–8163. doi: 10.4049/jimmunol.177.11.8154
- Muñoz, R., De Las Rivas, B., López De Felipe, F., Reverón, I., Santamaría, L., Esteban-Torres, M., et al. (2017). “Biotransformation of Phenolics by *Lactobacillus plantarum* in Fermented Foods,” in *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, (Elsevier), 63–83. doi: 10.1016/B978-0-12-802309-9.00004-2
- Munteanu, I. G., and Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *IJMS* 22, 3380. doi: 10.3390/ijms22073380
- Naibaho, J., Wojdyło, A., Korzeniowska, M., Laaksonen, O., Föste, M., Kütt, M.-L., et al. (2022). Antioxidant activities and polyphenolic identification by UPLC-MS/MS of autoclaved brewers’ spent grain. *LWT* 163, 113612. doi: 10.1016/j.lwt.2022.113612
- Naligama, K. N., and Halmillawewa, A. P. (2022). Pectobacterium carotovorum Phage vB_PcaM_P7_Pc Is a New Member of the Genus *Certrevirus*. *Microbiol Spectr* 10, e03126-22. doi: 10.1128/spectrum.03126-22
- Natividad, J. M. M., and Verdu, E. F. (2013). Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacological Research* 69, 42–51. doi: 10.1016/j.phrs.2012.10.007
- Nayeri Fasaee, B., Ashrafi Tamai, I., and Joghataei, SM. (2023). First Isolation of *Bacillus licheniformis* from Bovine Mastitis in Iran. *ARI*, 1690–1697. doi: 10.32592/ARI.2023.78.6.1690
- Negus, D., Foster, G., and Hoyles, L. (2023). *Lelliottia amnigena* recovered from the lung of a harbour porpoise, and comparative analyses with *Lelliottia* spp. *Access Microbiology* 5. doi: 10.1099/acmi.0.000694.v3
- Neshat, S. Y., Quiroz, V. M., Wang, Y., Tamayo, S., and Doloff, J. C. (2021). Liver Disease: Induction, Progression, Immunological Mechanisms, and Therapeutic Interventions. *IJMS* 22, 6777. doi: 10.3390/ijms22136777

- Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., et al. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol* 20, 375–388. doi: 10.1038/s41577-020-0285-6
- Ngouénam, J. R., Momo Kenfack, C. H., Foko Kouam, E. M., Kaktcham, P. M., Maharjan, R., and Ngoufack, F. Z. (2021). Lactic acid production ability of *Lactobacillus* sp. from four tropical fruits using their by-products as carbon source. *Heliyon* 7, e07079. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07079
- Nicoloff, H., Hubert, J.-C., and Bringel, F. (2000). In *Lactobacillus plantarum*, Carbamoyl Phosphate Is Synthesized by Two Carbamoyl-Phosphate Synthetases (CPS): Carbon Dioxide Differentiates the Arginine-Repressed from the Pyrimidine-Regulated CPS. *J Bacteriol* 182, 3416–3422. doi: 10.1128/JB.182.12.3416-3422.2000
- Nikolić, M., and Stevović, S. (2015). Family Asteraceae as a sustainable planning tool in phytoremediation and its relevance in urban areas. *Urban Forestry & Urban Greening* 14, 782–789. doi: 10.1016/j.ufug.2015.08.002
- Nwafor, I. C., Shale, K., and Achilonu, M. C. (2017). Chemical Composition and Nutritive Benefits of Chicory (*Cichorium intybus*) as an Ideal Complementary and/or Alternative Livestock Feed Supplement. *ScientificWorldJournal* 2017, 7343928. doi: 10.1155/2017/7343928
- Paço, A., Brás, T., Santos, J. O., Sampaio, P., Gomes, A. C., and Duarte, M. F. (2022). Anti-Inflammatory and Immunoregulatory Action of Sesquiterpene Lactones. *Molecules* 27, 1142. doi: 10.3390/molecules27031142
- Pallin, A., Agback, P., Jonsson, H., and Roos, S. (2016). Evaluation of growth, metabolism and production of potentially bioactive components during fermentation of barley with *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiology* 57, 159–171. doi: 10.1016/j.fm.2016.02.011
- Panja, P. (2018). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science* 23, 173–182. doi: 10.1016/j.cofs.2017.11.012
- Peña-Espinoza, M., Boas, U., Williams, A. R., Thamsborg, S. M., Simonsen, H. T., and Enemark, H. L. (2015). Sesquiterpene lactone containing extracts from two cultivars of forage chicory (*Cichorium intybus*) show distinctive chemical profiles and in vitro activity against *Ostertagia ostertagi*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 5, 191–200. doi: 10.1016/j.ijpddr.2015.10.002
- Peña-Espinoza, M., Williams, A. R., Thamsborg, S. M., Simonsen, H. T., and Enemark, H. L. (2017). Anthelmintic effects of forage chicory (*Cichorium intybus*) against free-living and parasitic stages of *Cooperia oncophora*. *Veterinary Parasitology* 243, 204–207. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.07.008

- Peng, Y., Ma, Y., Luo, Z., Jiang, Y., Xu, Z., and Yu, R. (2023). Lactobacillus reuteri in digestive system diseases: focus on clinical trials and mechanisms. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1254198. doi: 10.3389/fcimb.2023.1254198
- Penven-Turpault, A., Baron, R., Etienne, M., Delannoy, C., and Bergé, J.-P. (2017). “Utilisation des sous-produits de la pêche et de l’aquaculture pour l’alimentation en aquaculture,” 132–141. doi: 10.2305/IUCN.CH.2017.02.fr
- Perović, J., Tumbas Šaponjac, V., Kojić, J., Krulj, J., Moreno, D. A., García-Viguera, C., et al. (2021). Chicory (*Cichorium intybus* L.) as a food ingredient – Nutritional composition, bioactivity, safety, and health claims: A review. *Food Chemistry* 336, 127676. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127676
- Petrov, K., Popova, L., and Petrova, P. (2017). High lactic acid and fructose production via Mn²⁺-mediated conversion of inulin by *Lactobacillus paracasei*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 4433–4445. doi: 10.1007/s00253-017-8238-0
- Petrova, P., Velikova, P., Popova, L., and Petrov, K. (2015). Direct conversion of chicory flour into L(+)-lactic acid by the highly effective inulinase producer *Lactobacillus paracasei* DSM 23505. *Bioresour Technol* 186, 329–333. doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.077
- Pontonio, E., Dingo, C., Gobbetti, M., and Rizzello, C. G. (2019). Maize Milling By-Products: From Food Wastes to Functional Ingredients Through Lactic Acid Bacteria Fermentation. *Front. Microbiol.* 10, 561. doi: 10.3389/fmicb.2019.00561
- Pouille, C. L., Ouaza, S., Roels, E., Behra, J., Tourret, M., Molinié, R., et al. (2022). Chicory: Understanding the Effects and Effectors of This Functional Food. *Nutrients* 14, 957. doi: 10.3390/nu14050957
- Pouille, P. C. (2022). Effets de la chicorée sur la santé animale.
- Pradal, D., Vauchel, P., Decossin, S., Dhulster, P., and Dimitrov, K. (2016). Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrason Sonochem* 32, 137–146. doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.03.001
- Radić, K., Vinković Vrček, I., Pavičić, I., and Čepo, D. V. (2020). Cellular Antioxidant Activity of Olive Pomace Extracts: Impact of Gastrointestinal Digestion and Cyclodextrin Encapsulation. *Molecules* 25, 5027. doi: 10.3390/molecules25215027
- Ramires, F. A., Bavaro, A. R., D’Antuono, I., Linsalata, V., D’Amico, L., Baruzzi, F., et al. (2023). Liquid submerged fermentation by selected microbial strains for onion skins valorization and its effects on polyphenols. *World J Microbiol Biotechnol* 39, 258. doi: 10.1007/s11274-023-03708-y

- Ramírez-Pérez, J. I., Álvarez-Gutiérrez, P. E., Luján-Hidalgo, M. C., Ovando-Chacón, S. L., Soria-Guerra, R. E., Ruiz-Cabrera, M. Á., et al. (2022). Effect of linear and branched fructans on growth and probiotic characteristics of seven *Lactobacillus* spp. isolated from an autochthonous beverage from Chiapas, Mexico. *Arch Microbiol* 204, 364. doi: 10.1007/s00203-022-02984-w
- Rasouli, H., Farzaei, M. H., and Khodarahmi, R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 1–42. doi: 10.1080/10942912.2017.1354017
- Réussir la culture de l'endive (2024). Available at: <https://www.fermedesaintemarthe.com/reussir-la-culture-de-lendive-p-21889> (Accessed December 8, 2023).
- Ricci, A., Bernini, V., Maoloni, A., Cirlini, M., Galaverna, G., Neviani, E., et al. (2019). Vegetable By-Product Lacto-Fermentation as a New Source of Antimicrobial Compounds. *Microorganisms* 7, 607. doi: 10.3390/microorganisms7120607
- Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gómez-Cordovés, C., et al. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 132, 79–90. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025
- Rodríguez, H., Landete, J. M., Rivas, B. D. L., and Muñoz, R. (2008). Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Food Chemistry* 107, 1393–1398. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.09.067
- Rodríguez Valerón, N., Mak, T., Jahn, L. J., Arboleña, J. C., and Sørensen, P. M. (2023). Derivation of Kokumi γ -Glutamyl Peptides and Volatile Aroma Compounds from Fermented Cereal Processing By-Products for Reducing Bitterness of Plant-Based Ingredients. *Foods* 12, 4297. doi: 10.3390/foods12234297
- Rodríguez-Daza, M. C., Pulido-Mateos, E. C., Lupien-Meilleur, J., Guyonnet, D., Desjardins, Y., and Roy, D. (2021). Polyphenol-Mediated Gut Microbiota Modulation: Toward Prebiotics and Further. *Front. Nutr.* 8, 689456. doi: 10.3389/fnut.2021.689456
- Roe, K. (2021). An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scandinavian Journal of Immunology* 93, e12970. doi: 10.1111/sji.12970
- Rolnik, A., and Olas, B. (2021). The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. *Int J Mol Sci* 22, 3009. doi: 10.3390/ijms22063009
- Rui, H., Zhang, L., Li, Z., and Pan, Y. (2009). Extraction and characteristics of seed kernel oil from white pitaya. *Journal of Food Engineering* 93, 482–486. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2009.02.016

- Ruiz Rodríguez, L. G., Zamora Gasga, V. M., Pescuma, M., Van Nieuwenhove, C., Mozzi, F., and Sánchez Burgos, J. A. (2021). Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages. *Food Research International* 140, 109854. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109854
- Saeed, M., Abd El-Hac, M. E., Alagawany, M., A. Arain, M., Arif, M., A. Mirza, M., et al. (2017). Chicory (*Cichorium intybus*) Herb: Chemical Composition, Pharmacology, Nutritional and Healthical Applications. *International J. of Pharmacology* 13, 351–360. doi: 10.3923/ijp.2017.351.360
- Samanta, A. K., Jayapal, N., Senani, S., Kolte, A. P., and Sridhar, M. (2013). Prebiotic inulin: Useful dietary adjuncts to manipulate the livestock gut microflora. *Braz. J. Microbiol.* 44, 1–14. doi: 10.1590/S1517-83822013005000023
- Sánchez-Velázquez, O. A., Mulero, M., Cuevas-Rodríguez, E. O., Mondor, M., Arcand, Y., and Hernández-Álvarez, A. J. (2021). *In vitro* gastrointestinal digestion impact on stability, bioaccessibility and antioxidant activity of polyphenols from wild and commercial blackberries (*Rubus* spp.). *Food Funct.* 12, 7358–7378. doi: 10.1039/D1FO00986A
- Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., and Drider, D. (2017). *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics Antimicrob Proteins* 9, 111–122. doi: 10.1007/s12602-017-9264-z
- Šesták, Z. (2002). Bohm, B.A., Stuessy, T.F.: Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae). *Biologia Plantarum*. doi: 10.1023/A:1015137932348
- Shahidi, F. (1997). *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*. The American Oil Chemists Society.
- Shi, S., Dong, J., Cheng, X., Hu, J., Liu, Y., He, G., et al. (2022). Biological characteristics and whole-genome analysis of the potential probiotic, *Lactobacillus reuteri* S5. *Lett Appl Microbiol* 74, 593–603. doi: 10.1111/lam.13644
- Shoaib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H. R., et al. (2016). Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydr Polym* 147, 444–454. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.04.020
- Siddiq, A., Qureshi, R., Raja, N. I., Khan, I. A., Ahmad, M. Z., Rafique, S., et al. (2024). Liver-boosting potential: chicory compound-mediated silver nanoparticles for hepatoprotection—biochemical and histopathological insights. *Front. Pharmacol.* 15, 1325359. doi: 10.3389/fphar.2024.1325359
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 82, 291–295. doi: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024

- Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., et al. (2022). Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23, 499–515. doi: 10.1038/s41580-022-00456-z
- Sies, H., and Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 363–383. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3
- Singh, M., Kumar, S., Banakar, P. S., Vinay, V. V., Das, A., Tyagi, N., et al. (2021). Synbiotic formulation of Cichorium intybus root powder with Lactobacillus acidophilus NCDC15 and Lactobacillus reuteri BFE7 improves growth performance in Murrah buffalo calves via altering selective gut health indices. *Trop Anim Health Prod* 53, 291. doi: 10.1007/s11250-021-02733-z
- Singh, N., Baby, D., Rajguru, J. P., Patil, P. B., Thakkannavar, S. S., and Pujari, V. B. (2019). Inflammation and Cancer. *Annals of African Medicine* 18, 121. doi: 10.4103/aam.aam_56_18
- Soliman, H., ElDesouky, M., Hozayen, W., Ahmed, R., and Khaliefa, A. (2016). Hepatoprotective effects of parsley, basil, and chicory aqueous extracts against dexamethasone-induced in experimental rats. *J Intercult Ethnopharmacol* 5, 65. doi: 10.5455/jice.20160124113555
- Staudigl, P., Haltrich, D., and Peterbauer, C. K. (2014). L -Arabinose Isomerase and D -Xylose Isomerase from *Lactobacillus reuteri* : Characterization, Coexpression in the Food Grade Host *Lactobacillus plantarum* , and Application in the Conversion of D -Galactose and D -Glucose. *J. Agric. Food Chem.* 62, 1617–1624. doi: 10.1021/jf404785m
- Stewart, M. L., Savarino, V., and Slavin, J. L. (2009). Assessment of dietary fiber fermentation: Effect of *Lactobacillus reuteri* and reproducibility of short-chain fatty acid concentrations. *Molecular Nutrition Food Res* 53. doi: 10.1002/mnfr.200700523
- Sun, Y., Tao, W., Huang, H., Ye, X., and Sun, P. (2019). Flavonoids, phenolic acids, carotenoids and antioxidant activity of fresh eating citrus fruits, using the coupled in vitro digestion and human intestinal HepG2 cells model. *Food Chemistry* 279, 321–327. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.12.019
- Tailliez, P. (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques* 6, 35–41. doi: 10.1016/S1294-5501(04)94231-8
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022
- Taofiq, O., González-Paramás, A., Barreiro, M., and Ferreira, I. (2017). Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules* 22, 281. doi: 10.3390/molecules22020281

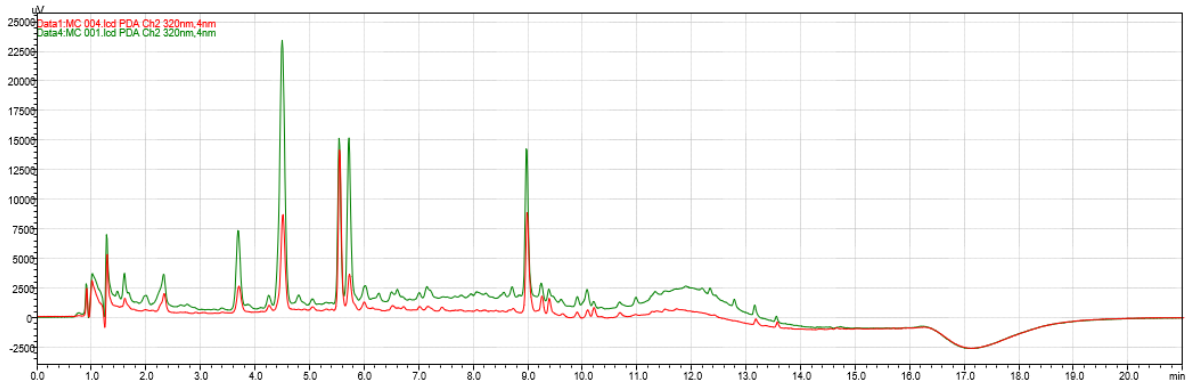
- Tenenbaum, M., Deracinois, B., Dugardin, C., Auger, J., Baniel, A., Boulier, A., et al. (2024). Digested casein phosphopeptides impact intestinal calcium transport *in vitro*. *Food Funct.* 15, 8104–8115. doi: 10.1039/D4FO01637H
- Trefts, E., Gannon, M., and Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology* 27, R1147–R1151. doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2, 1231–1246. doi: 10.3390/nu2121231
- Tsuda, S., Egawa, T., Ma, X., Oshima, R., Kurogi, E., and Hayashi, T. (2012). Coffee polyphenol caffeic acid but not chlorogenic acid increases 5'AMP-activated protein kinase and insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscle. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 1403–1409. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.09.001
- Tuśnio, A., Taciak, M., Barszcz, M., Paradziej-Łukowicz, J., Olędzka, I., Wiczkowski, W., et al. (2014). Thermal sterilization affects the content of selected compounds in diets for laboratory animals. *J. Anim. Feed Sci.* 23, 351–360. doi: 10.22358/jafs/65672/2014
- Twarogowska, A., Van Poucke, C., and Van Droogenbroeck, B. (2020). Upcycling of Belgian endive (*Cichorium intybus* var. *foliosum*) by-products. Chemical composition and functional properties of dietary fibre root powders. *Food Chemistry* 332, 127444. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127444
- Tyagi, A., Shabbir, U., Chelliah, R., Daliri, E. B.-M., Chen, X., and Oh, D.-H. (2021). Limosilactobacillus reuteri Fermented Brown Rice: A Product with Enhanced Bioactive Compounds and Antioxidant Potential. *Antioxidants* 10, 1077. doi: 10.3390/antiox10071077
- Ude, V. C., Brown, D. M., Viale, L., Kanase, N., Stone, V., and Johnston, H. J. (2017). Impact of copper oxide nanomaterials on differentiated and undifferentiated Caco-2 intestinal epithelial cells; assessment of cytotoxicity, barrier integrity, cytokine production and nanomaterial penetration. *Part Fibre Toxicol* 14, 31. doi: 10.1186/s12989-017-0211-7
- Uematsu, S., and Akira, S. (2008). “Toll-Like Receptors (TLRs) and Their Ligands,” in *Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity*, eds. S. Bauer and G. Hartmann (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 1–20. doi: 10.1007/978-3-540-72167-3_1
- Uerlings, J., Schroyen, M., Bautil, A., Courtin, C., Richel, A., Sureda, E. A., et al. (2020). *In vitro* prebiotic potential of agricultural by-products on intestinal fermentation, gut barrier and inflammatory status of piglets. *Br J Nutr* 123, 293–307. doi: 10.1017/S0007114519002873

- Van Arkel, J., Twarogowska, A., Cornelis, Y., De Marez, T., Engel, J., Maenhout, P., et al. (2022). Effect of Root Storage and Forcing on the Carbohydrate and Secondary Metabolite Composition of Belgian Endive (*Cichorium intybus* L. Var. *foliosum*). *ACS Food Sci. Technol.* 2, 1546–1557. doi: 10.1021/acsfoodscitech.2c00182
- Verhulst, E. P., Brunton, N. P., and Rai, D. K. (2023). Polyphenols in Agricultural Grassland Crops and Their Health-Promoting Activities—A Review. *Foods* 12, 4122. doi: 10.3390/foods12224122
- Verni, M., Rizzello, C. G., and Coda, R. (2019). Fermentation Biotechnology Applied to Cereal Industry By-Products: Nutritional and Functional Insights. *Front. Nutr.* 6, 42. doi: 10.3389/fnut.2019.00042
- Wada, H., Saito, K., Kanda, T., Kobayashi, I., Fujii, H., Fujigaki, S., et al. (2001). Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Plays a Protective Role in Acute Viral Myocarditis in Mice: A Study Using Mice Lacking TNF- α . *Circulation* 103, 743–749. doi: 10.1161/01.CIR.103.5.743
- Wan, X., Guo, H., Liang, Y., Zhou, C., Liu, Z., Li, K., et al. (2020). The physiological functions and pharmaceutical applications of inulin: A review. *Carbohydrate Polymers* 246, 116589. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116589
- Wang, G. N., Li, Y. P., Yuan, S. K., Zhang, H., Ren, J., Ren, X., et al. (2022). The intestinal absorption mechanism of chicoric acid and its bioavailability improvement with chitosan. *Heliyon* 8, e09955. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09955
- Wang, L., Zhang, H., and Lei, H. (2021). Phenolics Profile, Antioxidant Activity and Flavor Volatiles of Pear Juice: Influence of Lactic Acid Fermentation Using Three *Lactobacillus* Strains in Monoculture and Binary Mixture. *Foods* 11, 11. doi: 10.3390/foods11010011
- Wanyo, P., Meeso, N., and Siriamornpun, S. (2014). Effects of different treatments on the antioxidant properties and phenolic compounds of rice bran and rice husk. *Food Chemistry* 157, 457–463. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.061
- Wei, Y., Sturges, C. I., and Palmer, K. L. (2023). Human Serum Supplementation Promotes *Streptococcus mitis* Growth and Induces Specific Transcriptomic Responses. *Microbiol Spectr* 11, e05129-22. doi: 10.1128/spectrum.05129-22
- Wicherska-Pawłowska, K., Wróbel, T., and Rybka, J. (2021). Toll-Like Receptors (TLRs), NOD-Like Receptors (NLRs), and RIG-I-Like Receptors (RLRs) in Innate Immunity. TLRs, NLRs, and RLRs Ligands as Immunotherapeutic Agents for Hematopoietic Diseases. *IJMS* 22, 13397. doi: 10.3390/ijms222413397
- Willeman, H., Hance, P., Fertin, A., Voedts, N., Duhal, N., Goossens, J.-F., et al. (2014). A Method for the Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Sesquiterpene Lactone Content in Industrial Chicory Root Foodstuffs. *The Scientific World Journal* 2014, 1–11. doi: 10.1155/2014/583180

- Wolfe, K. L., Kang, X., He, X., Dong, M., Zhang, Q., and Liu, R. H. (2008). Cellular Antioxidant Activity of Common Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 56, 8418–8426. doi: 10.1021/jf801381y
- Woolsey, I. D., Valente, A. H., Williams, A. R., Thamsborg, S. M., Simonsen, H. T., and Enemark, H. L. (2019). Anti-protozoal activity of extracts from chicory (*Cichorium intybus*) against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. *Sci Rep* 9, 20414. doi: 10.1038/s41598-019-56619-0
- Wu, S., Fang, J.-Y., Ng, C.-C., Wang, C.-Y., and Shyu, Y.-T. (2013). Anti-inflammatory activity of Lactobacillus-fermented adlay-soymilk in LPS-induced macrophages through suppression of NF- κ B pathways. *Food Research International* 52, 262–268. doi: 10.1016/j.foodres.2013.02.053
- Xing, J., Wang, G., Zhang, Q., Liu, X., Gu, Z., Zhang, H., et al. (2015). Determining Antioxidant Activities of Lactobacilli Cell-Free Supernatants by Cellular Antioxidant Assay: A Comparison with Traditional Methods. *PLoS ONE* 10, e0119058. doi: 10.1371/journal.pone.0119058
- Xu, Q., Zang, Y., Zhou, J., Liu, P., Li, X., Yong, Q., et al. (2016). Highly efficient production of D-lactic acid from chicory-derived inulin by *Lactobacillus bulgaricus*. *Bioprocess Biosyst Eng* 39, 1749–1757. doi: 10.1007/s00449-016-1650-5
- Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., and Matar, C. (2018). The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients* 10, 1618. doi: 10.3390/nu10111618
- Yang, K., Xu, M., Zhong, F., and Zhu, J. (2018). Rapid differentiation of *Lactobacillus* species via metabolic profiling. *Journal of Microbiological Methods* 154, 147–155. doi: 10.1016/j.mimet.2018.10.013
- Yang, S., and Lian, G. (2020). ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Mol Cell Biochem* 467, 1–12. doi: 10.1007/s11010-019-03667-9
- Yeung, C.-Y., Lee, H.-C., Lin, S.-P., Yang, Y.-C., Huang, F.-Y., and Chuang, C.-K. (2006). Negative effect of heat sterilization on the free amino acid concentrations in infant formula. *Eur J Clin Nutr* 60, 136–141. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602279
- Yu, C., Wang, D., Yang, Z., and Wang, T. (2022). Pharmacological Effects of Polyphenol Phytochemicals on the Intestinal Inflammation via Targeting TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *IJMS* 23, 6939. doi: 10.3390/ijms23136939
- Yum, S.-J., Lee, H.-R., Yu, S. Y., Seo, D. W., Kwon, J. H., Kim, S. M., et al. (2023). Characterization of the Bacterial Communities in *Cichorium intybus* According to Cultivation and Storage Conditions. *Microorganisms* 11, 1560. doi: 10.3390/microorganisms11061560

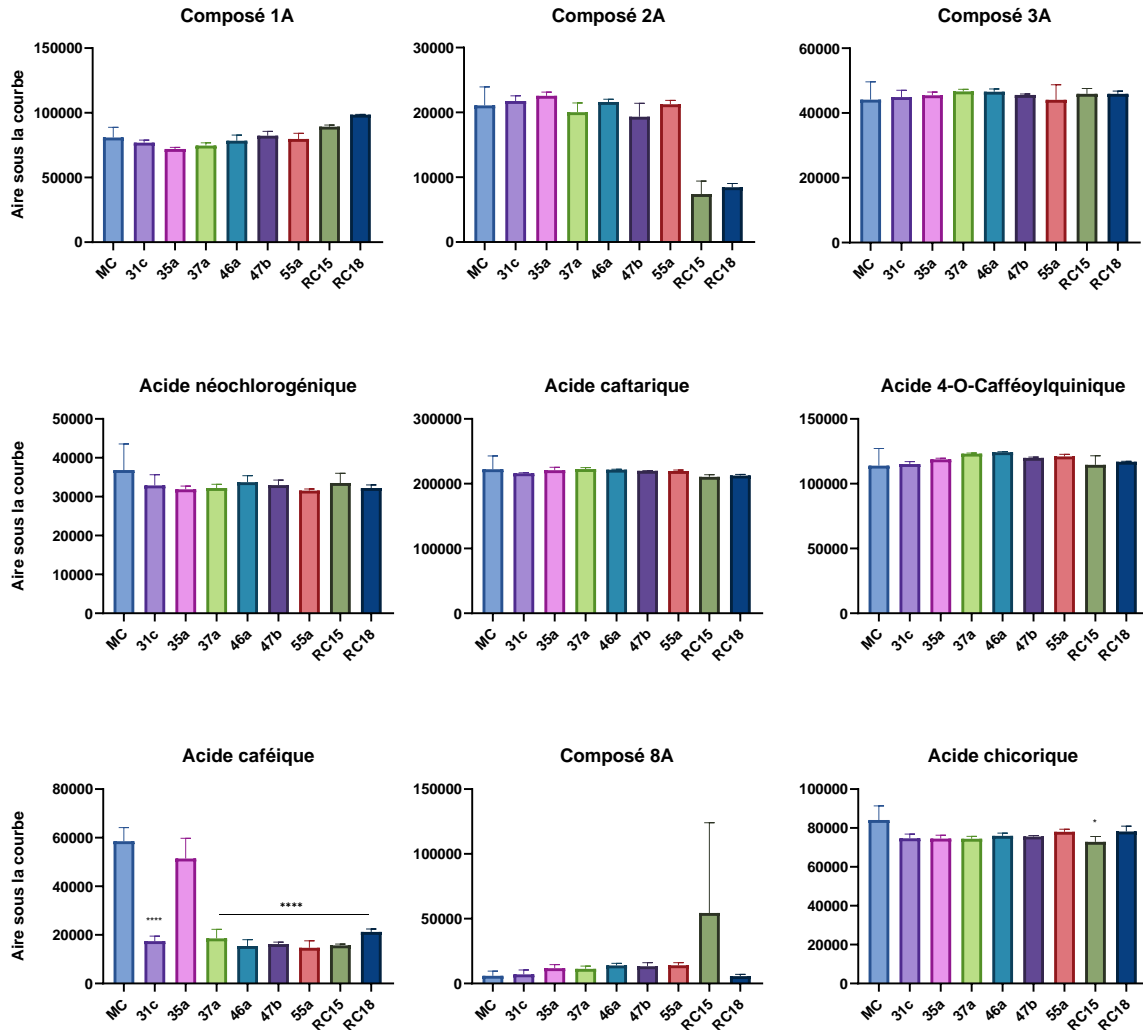
- Zhang, H.-L., Dai, L.-H., Wu, Y.-H., Yu, X.-P., Zhang, Y.-Y., Guan, R.-F., et al. (2014). Evaluation of Hepatocyteprotective and Anti-hepatitis B Virus Properties of Cichoric Acid from *Cichorium intybus* Leaves in Cell Culture. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 37, 1214–1220. doi: 10.1248/bpb.b14-00137
- Zhang, J., Liu, D., Zhang, C., Niu, H., Xin, X., Chen, J., et al. (2024). The impact of *Levilactobacillus brevis* YSJ3 and *Lactiplantibacillus plantarum* JLSC2-6 co-culture on gamma-aminobutyric acid yield, volatile and non-volatile metabolites, antioxidant activity, and bacterial community in fermented cauliflower byproducts. *Food Chemistry* 432, 137169. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.137169
- Zhang, J.-M., and An, J. (2007). Cytokines, Inflammation, and Pain. *International Anesthesiology Clinics* 45, 27–37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e
- Zhang, Z.-P., Ma, J., He, Y.-Y., Lu, J., and Ren, D.-F. (2018). Antioxidant and hypoglycemic effects of *Diospyros lotus* fruit fermented with *Microbacterium flavum* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 125, 682–687. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.01.005
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., et al. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70, 2782–2858. doi: 10.1099/ijsem.0.004107
- Zheng, Z., Xu, Q., Liu, P., Zhou, F., and Ouyang, J. (2018). Enhanced Inulin Saccharification by Self-Produced Inulinase from a Newly Isolated *Penicillium* sp. and its Application in d-Lactic Acid Production. *Appl Biochem Biotechnol* 186, 122–131. doi: 10.1007/s12010-018-2730-6
- Zhou, Y., Wang, R., Zhang, Y., Yang, Y., Sun, X., Zhang, Q., et al. (2020). Biotransformation of phenolics and metabolites and the change in antioxidant activity in kiwifruit induced by *Lactobacillus plantarum* fermentation. *J Sci Food Agric* 100, 3283–3290. doi: 10.1002/jsfa.10272
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., and Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev* 94, 909–950. doi: 10.1152/physrev.00026.2013

Annexes



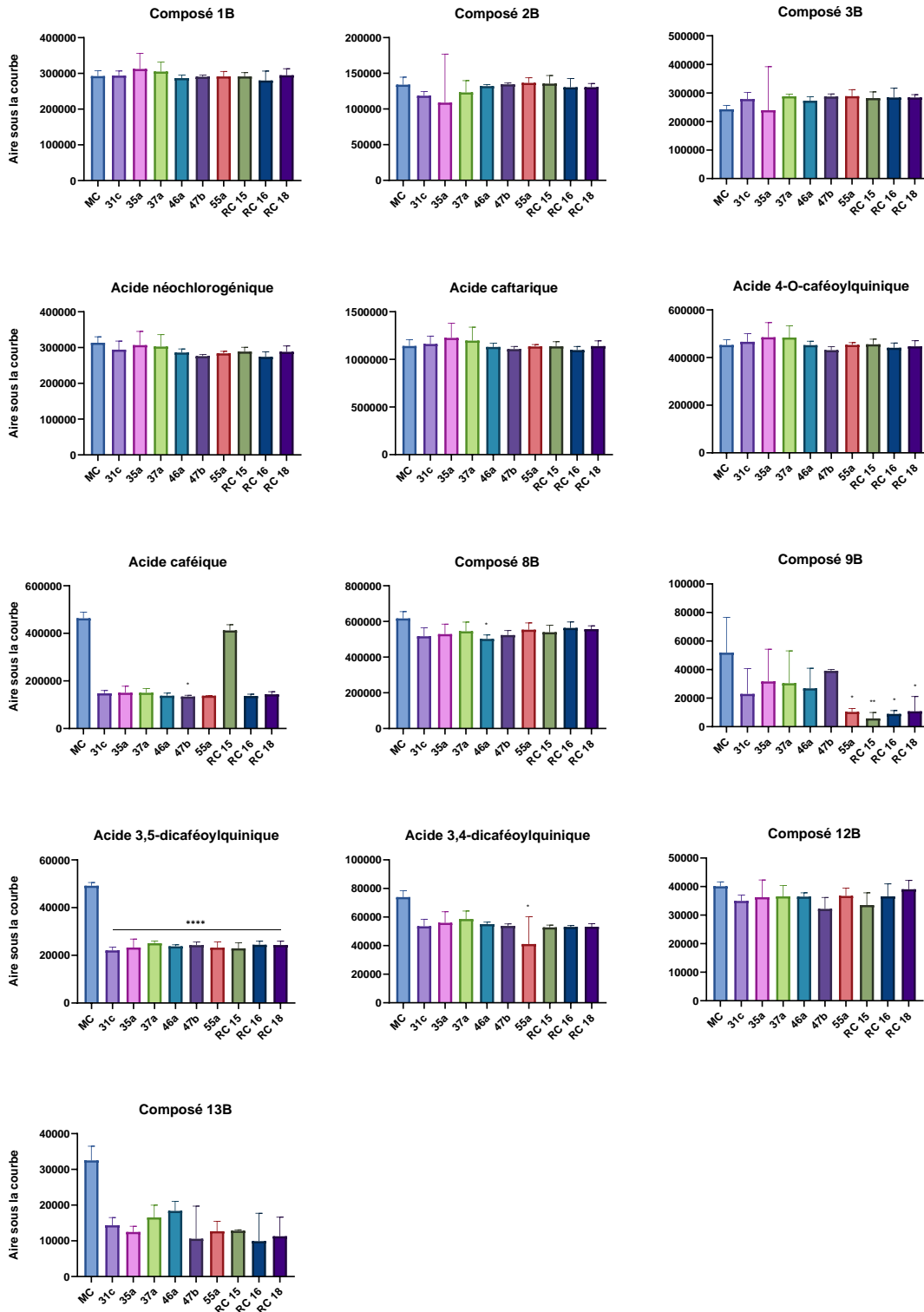
Annexe 1 : Impact de la stérilisation par autoclave sur les profils phénoliques des épluchures d'endives.

En vert : épluchures d'endives non autoclavées, en rouge : épluchures d'endives autoclavées. Le milieu est composé d'épluchures d'endives broyées au blender et à l'ULTRA-TURRAX® en PBS et filtré.



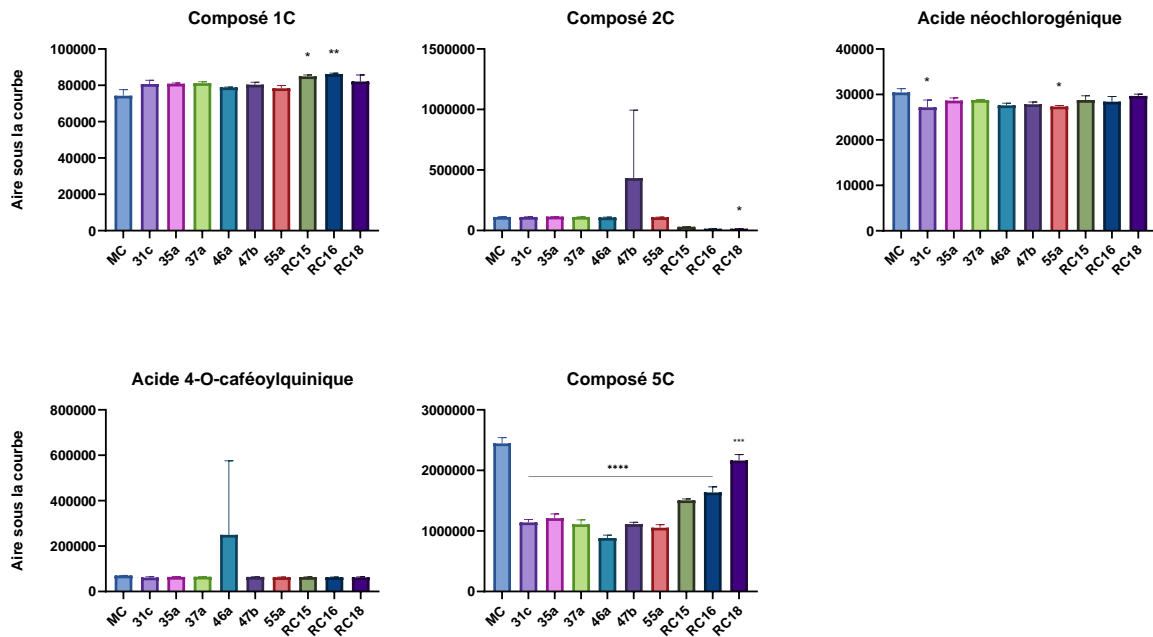
Annexe 2 : Caractérisation des surnageants de fermentations d'épluchures d'endives réalisées en Deepwell.

Quantité relative des composés identifiés dans les surnageants de fermentation des épluchures d'endives, obtenus à partir des fermentations réalisées en Deepwell. Statistiques : les valeurs sont les moyennes \pm écarts-types (N=3). Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn ont été effectués en comparant les valeurs obtenues aux macérations contrôles, $p^* < 0,05$, $p^{****} < 0,0001$.



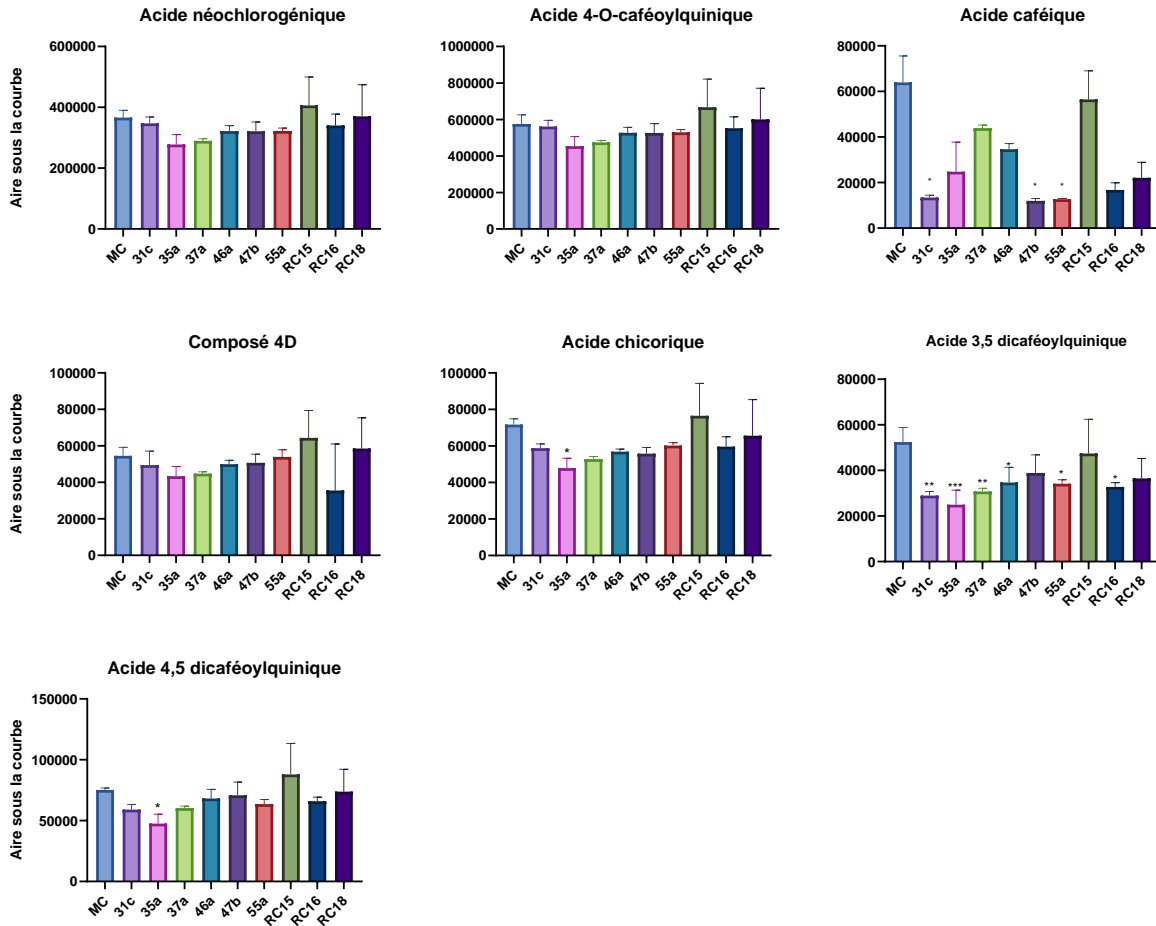
Annexe 3 : Caractérisation des surnageants de fermentations d'épluchures de Carmines® réalisées en Deepwell.

Quantité relative des composés identifiés dans les surnageants de fermentation des épluchures de Carmines®, obtenus à partir des fermentations réalisées en Deepwell. Statistiques : les valeurs sont les moyennes ± écarts-types (N=3). Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn a été effectué en comparant les valeurs obtenues aux macérations contrôles, p * <0,05, p ** <0,01, p **** <0,0001.



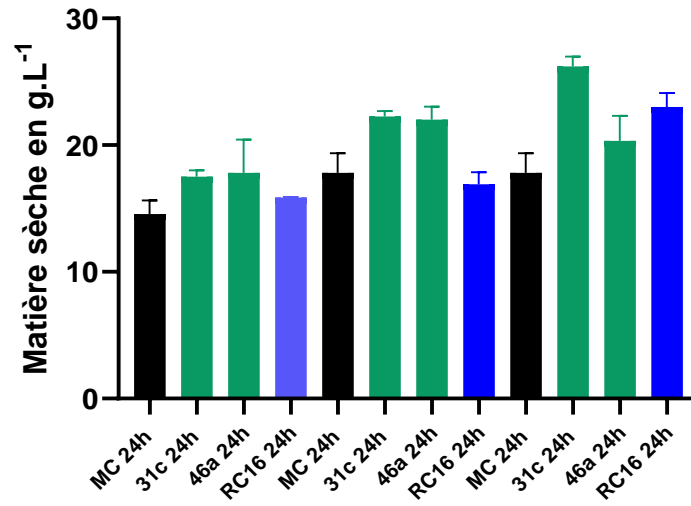
Annexe 4 : Caractérisation des surnageants de fermentations de marc de chicorée réalisées en Deepwell.

Quantité relative des composés identifiés dans les surnageants de fermentation du marc de chicorée, obtenus à partir des fermentations réalisées en Deepwell. Statistiques : les valeurs sont les moyennes \pm écarts-types (N=3). Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn a été effectué en comparant les valeurs obtenues aux macérations contrôles, p * <0,05, p ** <0,01, p **** <0,0001.



Annexe 5 : Caractérisation des surnageants de fermentations des fines de cossettes non torréfiées réalisées en Deepwell.

Quantité relative des composés identifiés dans les surnageants de fermentation des fines de cossettes non torréfiées, obtenus à partir des fermentations réalisées en Deepwell. Statistiques : les valeurs sont les moyennes \pm écarts-types (N=3). Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn a été effectué en comparant les valeurs obtenues aux macérations contrôles, $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$.



Annexe 6 : Masses sèches des surnageants de fermentations réalisées en bioréacteurs.

Masses sèches réalisées à l'aide d'un dessiccateur automatique, (N=3).

Annexe 7 :

Chapter

Lactobacillus Use for Plant Fermentation: New Ways for Plant-Based Product Valorization

Morgan Le Rouzic, Pauline Bruniaux, Cyril Raveschot, François Krier, Vincent Phalip, Rozenn Ravallec, Benoit Cudennec and François Coutte

Abstract

Today, plant production is increasing, but most industrial processes generate a lot of waste and by-products for which, in the current context, it is a priority to recycle or valorize them. One of the cheapest valorization routes is fermentation, in particular lactic fermentation by *Lactobacillus* species, which produces lactic acid and other molecules of industrial interest such as bioactive compounds such as anthocyanin, organic acid, peptides, or phenol, which are widely found in the plant matrix, mainly in cereals, grass, fruits, and vegetables. Bioactive compounds may exert beneficial health effects, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, or prebiotic activities. In addition, lactic acid fermentation can improve existing products and lead to new applications in food, livestock feeding and biotechnology, such as the production of lactic acid, protein, or silage. This chapter reviews the use of *Lactobacillus* strains in the fermentation process of many plant bioresources or by-products through their different bioactivities, active molecules, and applications.

Keywords: *lactobacillus* genera, lactic acid fermentation, by-product valorization, bioactivities, health benefits

1. Introduction

The world's population of 7.6 billion people is still growing and is expected to reach 8.3 billion by 2025 and almost 10 billion by 2050 [1]. Concomitantly, the Earth's resources are depleting. According to the different scenarios, global food demand is expected to increase by 40–68% by 2050 [2]. Among food resources, plants are of particular interests, as the global production of plant-based products is constantly increasing while producing significant waste. In this context, recycling or revalorizing these by-products is a priority [1].

The main objectives of using plant by-products are to revalorize wastes, reduce pollution, and limit resource depletion. Fermentation is one of the least polluting methods. Plant by-products fermentation contributes to sustainable development; in

Lactobacillus – A Multifunctional Genus

fact, this type of valorization is part of some objectives of the United Nations 2030 Agenda, notably the third objective: good health and well-being and the twelfth objective: responsible consumption and production. The consumption of fermented plant by-products therefore allows responsible consumption. The fermentation of plant by-product leads to bioactivities related to human health such as antioxidant, anti-inflammatory, or antimicrobial activities that contribute to good health and well-being [3]. Plant-based foods are sources of many bioactive compounds such as fibers, vitamins, minerals, or phenolic compounds. These nutrients are necessary for the survival and growth of organisms [4]. In many countries, the health benefits of certain plant and their traditional use have been recognized for decades [5]. Since industries have been exploiting plant-based foods, many agro-industrial by-products that still contain valuable compounds have been generated. Many companies are now seeking to recycle waste from their fruit and vegetable activities in order to address environmental and economic issues. For example, cereal waste reached about 40,000–45,000 tons per year in Europe [6]. The by-products are mainly used for livestock feed or methanisation but have great potential to generate food or dietary supplements for human use [6, 7]. Another example concerns the waste from the citrus industry, which amounts to 50 million tons per year and is the most important waste from fruits exploitation. The management of by-products represents a real food waste problem and raises major issues [8]. Therefore, in recent years, there has been a growing interest in the valorization of plant by-products.

In China, for 9000 years, humans have empirically exploited the fermentation process for numerous applications [9]. Studied since the nineteenth century, lactic acid fermentation has been an essential process for food processing and preservation for many millennia [10]. Humans took advantage of it for their food, notably by developing bread, beer, wine, cheese, or vinegar. Subsequently, fermentation with lactic acid bacteria has been largely studied to improve the nutritional and functional properties of plants. Due to their richness in nutrients, water, and natural ferments, plants such as fruits and vegetables represent an optimal substrate for *Lactobacillus* [11]. Lactic acid bacteria constitute a diverse group of Gram-positive, catalase-negative bacteria producing lactic acid as the main end product. Many food products fermented by lactic acid bacteria are obtained with organisms belonging to the genus *Lactobacillus* [12]. With more than 200 species of *Lactobacillus* bacteria [11], this genus is certainly the main and most diverse group of lactic acid bacteria. A study published in 2020 re-evaluated the genetic relatedness and phylogeny of *Lactobacillus* species. Based on a polyphasic approach such as whole-genome comparison, core genome phylogeny, physiological criteria, and ecology of the organisms, the genus *Lactobacillus* was reclassified into 25 genera (2 preexisting genus and 23 new genera). This work showed the great and extensive diversity of the *Lactobacillaceae* family [13]. *Lactobacillus* species are commonly used in fermented food. Depending on the species, their enzymatic activities including amylase, lactate dehydrogenase, peptidase, proteinase, α - and β -glucosidases, decarboxylase, lactate dehydrogenase, peptidase, phenolic acid decarboxylase, phenol reductase, proteinase or tannase are very useful in food fermentation [14]. These enzymes can degrade the plant cell wall matrix, resulting in the release of many bioactive compounds, which may or may not be modified structurally by the action of other enzymes in the bacteria.

Today, several ecological and economic issues are at the heart of lactic fermentation research. The optimization of yield, cost, and energy consumption and the valorization of plant-derived products represent challenges for the industry [15]. To meet this demand, the use of new substrates and the genetic engineering of

Lactobacillus Use for Plant Fermentation: New Ways for Plant-Based Product Valorization
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.104958>

fermentation strains are being studied as potential solutions [11]. Moreover, it is now known that lactic fermentation increases the content of bioactive compounds. Indeed, this fermentation process is well known to strengthen the immune and antioxidant (AO) effect of medicinal plants by increasing the bioavailability of active compounds, but also through the production (or the bioconversion) of plant metabolites into new bioactive molecules [16]. To increase the bioactivities and organoleptic characteristics of fermented products, *Lactobacillus* converts metabolizable molecules with their enzymes, in particular *L. plantarum*, which is one of the most used *Lactobacillus* as a fermentation starter. This degradation increases the bioavailability of molecules and improves their absorption [17]. A fermentation starter is usually a consortium of bacteria that helps the fermentation process to start. Today, the use of starter cultures in food fermentation is one of the necessary ingredients for good production. In addition, LAB used as starter in the food industry provide safe product with good nutritional and organoleptic qualities. LAB are used as starter for many products, including fruit, vegetables, and cereal [18]. As illustrated in **Figure 1**, the production of biomolecules by lactic fermentation of plant by-products can induce other bioactivities. This chapter refers to antioxidant (AO), anti-inflammatory (AI), antimicrobial, prebiotic activities, and others. These can be used in human food and beverage, livestock feeding, or biotechnology mainly to produce lactic acid. Those activities and applications will be detailed in this chapter.

2. Bioactivities resulting from the fermentation of plant products or by-products by *Lactobacillus* genera

2.1 Antioxidant activity

Many *Lactobacillus* enzymes can generate compounds with strong AO activity from plant by-products. For example, β -galactosidase releases isoflavone and oleuropein aglycone while tannases generate propylgallate [16].

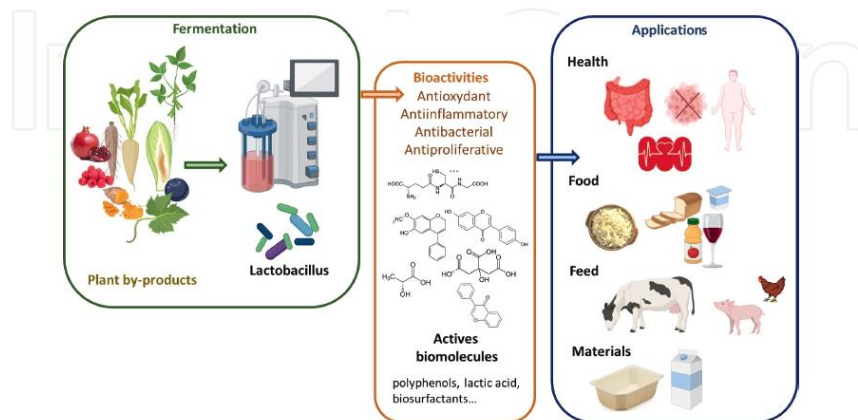


Figure 1. Summary of the biomolecules, bioactivities generated by the fermentation by *Lactobacillus* strains of plant products or by-products, and their application domains.

Lactobacillus – A Multifunctional Genus

Glycosylated polyphenols such as tannins, lignans, isoflavones, flavonols, and anthocyanins are widespread in plant products. Absorption in the intestine depends mainly on their degree of glycosylation. Some strains of *Lactobacillus*, such as *L. plantarum*, possess glycosidases that are crucial for the absorption of glycosylated polyphenols and consequently for the resulting AO activity [19]. In most cases, the AO activity is studied with classical biochemical antioxidant assays such as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), hydroxyl or alkyl radical scavenging activities, the ferric-reducing antioxidant power (FRAP), superoxide dismutase (SOD) -like activity, β -carotene bleaching, and oxygen radical absorbance capacity (ORAC). In addition to *in vitro* biochemical tests, other studies have investigated the antioxidant capacity of fermented products with *in vitro* cell-based assays. Reference [16] demonstrated that the fermentation of *L. plantarum* increased the AO properties of a kiwi extract. They correlated this result with increased amounts of protocatechic and chlorogenic acid in the fermented products, which were less represented in the starting extract [20]. Gallic acid production was also observed with the fermentation of red chicory leaves by *L. plantarum* et *L. hilgardii* thanks to tannases [21]. In addition, co-fermentation by *L. gassieri* and *Bifidobacterium animalis* resulted in the release of caffeic acid and conjugated chlorogenic acid after fermentation of sunflower seeds through the action of cinnamoyl esterase. Tannins are also the product of biomass fermentation by *Lactobacillus*. Tannases hydrolyze the ester bond, and gallate decarboxylase converts gallic acid to pyrogallol; thus, *Lactobacillus* generates gallic acid, glucose, and pyrogallol [22].

Several studies have illustrated the fermentation of plants such as Indian chilli pepper, grape pomace, dandelion beverage, and cereal-based plant beverages by *Lactobacillus spp.*, resulting in polyphenol compounds (caffeic acid, succinate, pyruvate, pyroglutamate) with AO capacity [23–25]. In [26], they evidenced that rice bran and wheat bran fermented with *L. plantarum* possessed AO capacity through their hydroxyl and oxygen radical scavenging activities. Furthermore, the purified fractions exerted reactive oxygen species (ROS) scavenging activity in HUVEC cells and decreased the senescence of the cultured cells, also conferring an antiaging activity to the fermented fractions. These activities were attributed to the acids and ketones [26]. Co-cultivation of *L. johnsonii* and *Bacillus coagulans* was undertaken in [27] to produce a soybean meal with improved AO properties. Interestingly, the co-cultivation resulted in a significant increase in total phenolic content [27]. Fruits are also an excellent matrix for fermentation due to their high content of dietary fiber, sugars, vitamins, minerals, and phenols. Furthermore, lactic fermentation preserves and improves food safety, nutritional value and preserves the organoleptic quality. In particular, when plants are fermented by *Lactobacillus* endophyte, it preserves of color, firmness, AO activity, growth of fermentation starters and inhibits pathogens in media. Many studies have been conducted on the lactic fermentation of polyphenol-rich berries and red fruits. *L. casei* has been studied for the fermentation of blueberry pulp [28]. In another example studied in [29], mulberry juice fermented in coculture by three different strains (*L. plantarum*, *L. acidophilus*, and *L. paracasei*) showed a higher AO capacity [29].

In reference [30], they investigated the fermentation of cherry silverberry fruits (*Elaeagnus multiflora* Thunb.) fermented with pure cultures of *L. plantarum* KCTC 33131 and *L. casei* KCTC 13086 alone or in mixed culture. In reference [31], they studied the fermentation by *L. plantarum* FNC 0027 of Jamaican cherry (*Muntingia calabura* Linn.), which induces the production of phenolic compounds and the inhibition of diabetic-related enzymes (α -glucosidase, α -amylase, and amyloglucosidase). They demonstrated the production of gallic acid, 5,7 dihydroxyflavone, and dihydrokaempferol [31].

4

Lactobacillus Use for Plant Fermentation: New Ways for Plant-Based Product Valorization
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.104958>

The valorization of argan press cake was also carried out by lactic acid fermentation using a specifically isolated strain of *L. plantarum* Argan-L1. Argan press cake is a waste of oil production containing polyphenols and saponins. The authors demonstrated that sucrose from argan press cake was easily converted to lactic acid during the fermentation process. Furthermore, the fermented extract presented an increased AO capacity, but the total phenolic compound was slightly decreased [32].

L. plantarum KCCM 11613P isolated from Kimchi allowed the production of ginsenosides after fermentation of Korean red ginseng (*Panax ginseng*) [33]. In reference [34], it was shown that fermented soymilk products exhibited improved AO capacity associated with increased isoflavone aglycone content. In addition, fermented extracts inhibited the DNA oxidation induced by the Fenton reagent [34]. All these studies show the interest in using *Lactobacillus* to increase the antioxidant properties of fermented products. Moreover, this antioxidant activity is often associated with the anti-inflammatory activity of certain extracts. Fermentation of other plant matrices can induce antioxidant activity of the products, as shown in **Table 1**.

2.2 Anti-inflammatory activity

Vegetables, fruits, and plants (tomato, cucumber, pear, apple, mandarin, parsley, carrot, celery, onion, burdock, kale, spinach, aloe vera, civet, grape, jujube, cabbage, and perilla) fermented by *L. plantarum* offer interesting AI molecules [51]. These molecules include organic acids (OAs) such as lactic acid, 3-phenyl-lactate, indole-3-lactate, β -hydroxybutyrate, gamma-aminobutyric acid (GABA), and glycerol. When investigating the AI (and AO) capacity of these compounds, the parameters studied were the levels of nitric oxide (NO), IL-6 (interleukins) and tumor-necrosis factor-alpha (TNF-alpha), and the DPPH test on RAW cells [52]. Another study showed the AI properties of a fermented plant extract (*Artemisia capillaris*) in RAW 264.7 cells, which stimulated NO and IL-10 secretion without cytotoxic effects [53]. Thus, the fermentation of *Aronia melanocarpa* extract by *L. plantarum* was investigated to produce GABA, polyphenol, and flavonoid compounds. The fermented extract was shown to exert AI effects inhibiting the production of proinflammatory cytokines in RAW 264.7 cells and modulating the immune response in mice [54]. Furthermore, several molecules derived from the fermentation of red fruit juices have been studied for their AI effects. For example, anthocyanins from these products are thought to produce the TNF-alpha and proinflammatory cytokines [23].

Fermented Asian products were highly investigated for their AI properties. For example, a specific strain of *L. plantarum* is involved in the fermentation of the traditional Korean fermented vegetable food, the kimchi. It has been shown to secrete exopolysaccharides able to protect against rotavirus-induced diarrhea [55]. Turmeric, another plant originating from Asia, has been also extensively studied for its AI properties and particularly after fermentation. The development of turmeric extracts with potential health applications, particularly for inflammation, is increased.

The production of curcuminoid molecules, such as curcumin, has been enhanced by fermentation of turmeric (*Curcuma longa*) by *L. johnsonii*. The turmeric extracts showed AI and antiallergic effects in atopic dermatitis mice and induced a decrease in serum immunoglobulin E and proinflammatory cytokines in lipopolysaccharide-induced inflammation (LPS) [56]. Supplementation of turmeric extract fermented by *L. rhamnosus* (GG-ATCC 53103) and *Bifidobacterium animalis* (BB12) strains maintained bacterial growth of the gut microbiota in case of inflammation.

Lactobacillus – A Multifunctional Genus

By-product used	<i>Lactobacillus</i> spp.	FP	Product generated	Bio activity	Remark	Reference
Apple juice	<i>L. plantarum</i>	LF	PC	AO		[35]
Apple juice	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> , then <i>L. plantarum</i>	LF	PC, OA	AO		[36]
Margosa (<i>Momordica charantia</i> L.)	<i>L. plantarum</i> NCU116	LF	SCFA LA PC	AO	Juice's sterilization exerted adverse effects	[37]
Porcelain plant (<i>Graptopetalum paraguayense</i> E. Wálther)	<i>L. plantarum</i> BCRC 10357	LF	PC	AO	Assayed during the maturity of the leaves	[38]
Milled wheat	<i>L. plantarum</i> + <i>Streptococcus thermophilus</i>	LF Co	PC	AO, AM, PB	Anti-burning properties	[39]
Apple by-products	<i>L. plantarum</i>	LF	PC	AO, barrier integrity	Caco-2	[40]
Mango	<i>L. plantarum</i> + <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	SB Co	Mango slurry, PC	AO		[41]
Liquorice root	<i>L. plantarum</i>	SBF	PC	AO		[42]
Jussara pulp (<i>Euterpe edulis</i>)	<i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i>	LF Co	OA; protocatechic acid	AO	Conversion of anthocyanins	[43]
Acerola	<i>L. acidophilus</i> + <i>Bifidobacterium longum</i>	BF	beverage	PB	↗resistance of PB to gastrointestinal digestion	[44]
Cauliflower & white beans mix	<i>L. plantarum</i> 299	SBF	Riboflavin, Folate, Vitamin B12, AA		Nutritional value	[45]
Wheat germ	<i>L. plantarum</i> + <i>L. rossiae</i>	LF	Bread rich in PC, phytases	AO	↘ anti-nutritional factor, ↗ protein digestibility	[46]
Date juice	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhammosus</i>	LF	LA		Nitrogen source optimization	[47]
Date juice	<i>L. sp.</i> KCP01	LF	LA		Medium optimization	[48]

6

Lactobacillus Use for Plant Fermentation; New Ways for Plant-Based Product Valorization
 DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.104958>

By-product used	<i>Lactobacillus</i> spp.	FP	Product generated	Bio activity	Remark	Reference
Solid carob	<i>L. rhamnosus</i>	BF	LA	Many diseases	Immobilization in alginate beads	[49]
Banana, papaya, pineapple, orange	<i>L. plantarum</i>	BF	LA		Best LAs production for banana et pineapple	[50]

AF: Anti-inflammatory; AM: antimicrobial; AO: AO; BF: batch fermentation; Co: coculture; EPS: exopolysaccharides; FP: fermentation process; IL: interleukins; IM: immune-modulatory; LA: lactic acid; LF: liquid fermentation; NO: nitric oxide; OA: organic acids; DB: prebiotic effect; PC: phenolic compounds; SBF: solid batch fermentation; SCEA: short-chain fatty acid; and SF: solid fermentation.

Table 1.
 Other studies that complement the in vitro examples cited in this chapter.

Lactobacillus – A Multifunctional Genus

It also reduced the inflammatory state by limiting the production of proinflammatory cytokines IL-8 [57]. Another study showed that the fermentation of turmeric by *L. fermentum* has increased the curcumin yield by 9.76%. The AI activity was demonstrated in RAW 264.7 cells by modifying the nitrite level, the expression of TNF-alpha and TLR-4, and the activation of the JNK pathway. These phenolic compounds also showed a protective effect against the activation of TLR-4 receptor cascade, TNF-alpha, and nitric oxide production. In addition, the extract limited the proinflammatory response and low-grade oxidative stress induced by LPS [58].

2.3 Antimicrobial activity

The molecules produced during the fermentation of plant biomasses by *Lactobacillus* can also exhibit antimicrobial activities. The production of antimicrobial molecules by *Lactobacillus* has already been described, including lactobrevin and lactobacillin [59]. For example, in [60], an interesting concept of valorization of okara by solid-state fermentation was presented with a coculture of the yeast *Yarrowia lipolytica* and *Lactobacillus casei*. Okara is an oleaginous by-product of plant milk production. The authors used fermentation to generate molecules with antimicrobial activity (up to 33% reduction of *Bacillus subtilis* development and a modest effect on *Aspergillus niger* one) [60].

In reference [61], a metabolic study on *Allium tuberosum* to produce a food additive with antimicrobial activity against poultry pathogens was conducted. Endophytic *Lactobacillus* have been isolated from Chinese chives. Among those *Lactobacillus* strains, *L. plantarum* can produce flavonols with antimicrobial activity [61]. In [62], fermentation of quinoa by the strain *L. plantarum* CDL 778 leads to a higher production of antifungal compounds. It was also observed that during the fermentation of sweet lemon juice (*Citrus limetta*), the antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* was increased. These activities were correlated with the increase in lactic acid content and the decrease of citric acid, total phenolic compounds, and sugar content [63]. Moreover, fermentation of the red sorghum cereal allows the conversion of flavanones into eriodyctiol and naringenin, which have shown an interesting antimicrobial activity [22].

2.4 Prebiotic activity

Several studies have shown that fermented fruits and vegetables have prebiotic effects. The compounds produced by the fermentation of plants induce a modification of the intestinal microbiota. These fermented extracts offer great prospects. Studies highlighted their health potential for humans but also animals. Indeed, two fermented extracts obtained from algae and chicory, plantain, alfalfa, and broad leaf dock presented prebiotic and AO effects. This study was conducted on weaned lambs, and the results showed improved resistance to infection and survival for both extracts. Similar studies have shown the same effects for thyme and rosemary [64]. In reference [65], the prebiotic potential was determined, and the AI effect of chicory root and pulp compared with inulin, as a positive control, on the intestinal barrier on IPEC-J2 cells. These tests were performed with five fermented by-products (chicory roots, chicory and citrus pulp, rye bran, and soybean bark) by different *Lactobacillus* spp. An increase of *Lactobacillus* spp. was observed for all substrates except for chicory roots. The latter was very fermentable and produced a butyrate ratio similar to that of inulin, while chicory pulp had a higher ratio than inulin. For acetate, chicory and citrus pulp and soybean bark had a higher ratio than inulin. These short-chain fatty acids (SCFAs) derived from dietary

8

Lactobacillus Use for Plant Fermentation: New Ways for Plant-Based Product Valorization
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.104958>

fiber fermentation contribute to maintain intestinal health. Rye bran caused a significant stimulation of the growth of *Bifidobacterium spp.* Rye bran and soybean bark have a positive effect on the gut microbiota. Fermented chicory roots and pulp promote the upregulation of tiny junction genes and maintain the integrity of the gut barrier. Finally, fermented chicory pulp inhibits proinflammatory cytokines such as TNF- α and triggers the metabolic pathway that inhibits inflammatory cytokine production [65].

2.5 Other bioactivities related to medicine

Many bioactivities could result from the lactic fermentation of plant by-products. In reference [66], they associated the AO activity with potential hypoglycemic effects of *Diospyros lotus* fruit fermented by *L. plantarum* and *Microbacterium flavum*. They observed an inhibition of the α -glucosidase activity *in vitro*. In addition, the authors showed that catechinic, tannic, and ellagic acid levels were enhanced during fermentation [66]. Similarly, several studies were interested in the capacity of *Lactobacillus* fermented products to exert a positive effect in the prevention of obesity and associated metabolic diseases. In [67], cabbage-apple juice fermented by *L. plantarum* exerted anti-obesity and hypolipidemic effects *in vivo* in high-fat diet-fed rats was highlighted [67].

Moreover, soy products fermented with *Lactobacillus spp.* have interesting biomolecular contents and present antitumoral effects. Indeed, these fermented soybean extracts could inhibit, *in vitro*, the growth of several cancerous cell models: fibrosarcoma and adenocarcinoma of the breast. It also reduces the risk of breast cancer, significantly influencing survival, apoptosis, and tumor inhibition rates in mice. Clinical studies were also conducted to investigate the effects of fermented soybean extract on chemotherapy-induced immunosuppression. The results showed that the populations of immune cells with activity against tumor cells, the natural killer cells, are significantly increased [23]. Using cell-based experiments, other work has investigated putative health effects associated with AO activity. Indeed, the authors showed promising antiproliferative and apoptotic effects of the extracts on the HeLa cancer cell line. In another study, the authors showed that blueberries fermented by *L. plantarum* exhibited anticancer activities. Their results suggest that polyphenols, in high concentrations in blueberries, were metabolized during fermentation into active phenols such as catechol [68].

3. Applications

3.1 Food products

Product of the lactic fermentation, bread has been, for a longtime, an important foodstuff of the diet of many cultures. The bread fermentation process has often been optimized and revisited to better meet consumer needs or to address economic and social issues. The fermentation of wheat leaven by *L. plantarum* allows the conversion of ferulic acid into vinyl guaiacol, ethyl guaiacol, and dihydro ferulic acid. This conversion improves the quality of the final bread product [22].

Corn flour is another example of a bread raw material, and its application in bakery illustrates the potential of lactic fermentation. In addition to the different ingredients of wheat bread, maize meal improves the nutritional profile after being fermented with *L. plantarum* T6B10 and *Weissella onfusa* BAN8. Indeed, an increase in amino acid (AA) and protein content, AO activity, and inhibition of lipases and phytic acid were

Lactobacillus – A Multifunctional Genus

observed. This leads to an increase in dietary fiber, digestibility, and improves the texture, taste, and nutritional value of bread [69]. The same outcome was observed with the fermentation of brans from hullless barley, emmer and pigmented wheat varieties with the same *Lactobacillus* under the same conditions [70]. Another study highlighted the replacement of wheat flour substitute for breadmaking, a sourdough obtained from fermented djulis (*Chenopodium formosanum*) by *L. casei*. The bread produced contained higher levels of total phenolic and flavonoid compounds and increased hardness and chewiness compared with conventional bread. The addition of djulis sourdough also extended the shelf life by approximately 2 days [71].

A process to valorize semolina pasta with hemp flour, chickpea grains, and milling by-products by fermenting them with *L. plantarum* and *L. rossiae* has been proposed [72]. However, it is necessary to note that enzymatic pretreatment of the substrates must be carried out beforehand. This could affect the economic viability of the process. At a laboratory scale, they obtained extensive protein degradation and consequently digestibility, a 50% reduction in tannin concentration and also in phytic acid concentration [72]. *L. plantarum*, which has high proteolytic activities, was used for the fermentation of quinoa instead of wheat. Quinoa is an interesting cereal for celiac patients because it is gluten-free. The study revealed that quinoa is more easily fermented by lactic acid bacteria than wheat. These high proteolytic activities of the strain were evidenced by the increase of the total peptides and free AA contents from quinoa slurries compared with wheat slurries [62]. In reference [70], the potential use of oat extract from cereal processing with high protein content as an alternative to yoghurt was questioned. Fermentation of this by-product with *L. delbrüchii* subsp. *Bulgarius* and *Streptococcus thermophilus* followed by starch gelatinization by heating generated two kinds of gels with interesting rheological and organoleptic properties. Authors placed their studies in the context of plant-based products substituting dairy ones for health and environmental reasons. They discussed the consumer acceptance of these products but claimed that sensory descriptors such as soft, sweet, and smooth are highlighted by the sensory panel [73]. Another example of food products fermentation value is the fermentation of olive by *L. plantarum*. Kachouri et al. have shown that the phenolic content of olive oil increases after fermentation by this strain [74]. Other studies have shown that the fermentation of the common Spanish table olive improves preservation and the taste. Indeed, *L. plantarum* ferments olive brine, leading to a reduction in the oleuropein content of the olives [75–79]. In addition, wastewater from olive production, which is another olive coproduct, has been exploited in [80]. When fermented by *L. plantarum*, the content of phenolic compounds becomes more interesting. The antioxidant activity was tested by DPPH and ABTS assay. This coproduct has a 50% higher antioxidant activity after fermentation by *L. plantarum* [80].

In order to innovate in the food market, research is being carried out into the development of plant-based drinks rich in active compounds and with health benefits for consumers. Functional plant beverages fermented with *Lactobacillus* are being widely studied. Aqueous extracts of plants such as soy, pea, coconut, or rice represent alternatives to nondairy milk. Lactic acid fermentation of these beverages could improve the protein content, solubility, and availability of AA. Some strains of *Lactobacillus* are also responsible for the biosynthesis of vitamins during fermentation (vitamin K, vitamin B). Anti-nutritional compounds such as phytates are hydrolyzed during fermentation by some phytase-producing strains, which improves the digestibility and mineral content of the final product [81]. However, optimizing flavors and nutritional quality remains a challenge today because the latter are often criticized for their low nutritional quality and bland taste caused by their short shelf life. A color change

Lactobacillus Use for Plant Fermentation: New Ways for Plant-Based Product Valorization
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.104958>

has been observed by Do and Fan in fruit or carrot juices fermented by *Lactobacillus* strains, indicating that carotenoids are modified to cis-carotenoid isomers responsible for color change during fermentation by *Lactobacillus* [82]. Rheological studies have also been performed. Indeed, in [83], the effects of different *Lactobacillus* species on volatile and nonvolatile flavor compounds in juices fermentation were studied. The main objective of this research was to identify the marker metabolites generated by different species of *Lactobacillus* strains, which contribute to the flavor and reveal the roles of various *Lactobacillus* species in the formation of flavor compounds. The main markers were 2,3-butanedione, hexenal, acetic acid, formic acid as volatile compounds and lactic acid, malic acid, citric acid as nonvolatile compounds [83].

In another application for the beverage sector, one of the main ideas is to provide fermented products with prebiotic effects from a different matrix of vegetable juice as raw material. Consumers' demand for non-dairy prebiotic foods is constantly increasing due to drawbacks related to dairy foods such as allergy, lactose intolerance, as well as lifestyle change or religious beliefs. In this context, reference [71] presents a development of a functional drink based on soy and quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) obtained by fermentation by *Lactobacillus casei* LC-1. This drink presents a prebiotic effect stimulating the gut microbiota and reducing the following bacterial populations: *Clostridium spp*, *Bacteroides spp*, *Enterobacteria*, and *Enterococcus spp* [84]. Cabbage juice and fresh cabbage, fermented by *Lactobacillus*, are also being studied for the development of probiotic products. When mixed with other vegetables (carrots, onion, cucumber), white and red cabbage fermented with *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, or *L. delbrueckii* shows a good fermentation profile and potential as a functional probiotic drink as demonstrated by Hyunah et al. [85–88]. Dunkley and Hekmat evaluated the sensory properties and worked to assess the growth and viability of *L. rhamnosus* GR-1 in carrot juice, carrot apple juice, carrot orange juice, and carrot beetroot juice over 72 h of fermentation and 30 days of refrigerated storage at 4°C. The conclusion was that carrot, carrot apple, carrot orange, and carrot beetroot juice fermented with *L. rhamnosus* GR-1 proved to be a satisfactory alternative to dairy-based prebiotic products. All juices achieved viable counts above the minimum counts required to be classified as prebiotic. The results of sensory evaluation also indicated a market potential for prebiotic vegetable juice. The development of prebiotic vegetable juice using *L. rhamnosus* GR-1 as a probiotic agent will provide consumers a viable non-dairy alternative that can provide many health benefits [89]. Co- or triculture can be used to enhance activities. Bergamot juice was fermented by three *Lactobacillus* (*L. plantarum* 107 subsp *plantarum* PTCC 1896, *L. plantarum* AF1, *L. plantarum* LP3) in triculture. This combination resulted in a higher AO activity. Bergamot juice fermented could also be used as a functional drink [90].

Other by-products are recycled, especially in the brewery sector. One study aimed to produce a polyphenol-rich beverage from brewers' spent grain. Fermentation by *L. plantarum* ATCC 8014 was realized, followed by tests on phenolic compound content and AO activity. Phenol content and AO have increased during fermentation. The beverage was more concentrated in phenolic compounds than before fermentation, and its bioactive compounds were more stable [91]. More recently, coffee cherry pulp has been used in infusion to obtain an AO drink called cascara. To improve the AO activity of this beverage, it was fermented by endophytic *L. casei* [92]. A turmeric-based functional drink was also obtained by co-fermentation with *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lacti*, and *L. plantarum*. The AO capacity was measured by titration of total phenolic compounds, and the prebiotic effect was also highlighted by *in vitro* and *in vivo* tests.

Lactobacillus – A Multifunctional Genus

Kombucha is a sweet infusion of green tea leaves usually fermented with Kombu, a fungus. One study shows that replacing Kombu with *L. casei* and *L. plantarum*, which are derived from kefir, enhances the production of glucuronic acid, leading to greater antimicrobial and antioxidant activities [93]. Another study showed that a mixture of LAB from kefir and kombucha (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, and *L. plantarum*) increases the glucuronic acid concentration, antimicrobial and antioxidant activities and allows the use of Kombucha as a health drink [94]. Hou et al. demonstrated the link between antimicrobial activities of kombucha with polyphenols and LAB, especially against *Escherichia coli*, *Salmonella tify*, *Vibrio cholerae*, and *Shigella dysenteriae* [95]. Green tea used in Kombucha may have activity when fermented by *L. plantarum*. Indeed, fermented extract derived from *Camellia sinensis* is able to mitigate ethanol-induced liver damage. *In vitro* and *in vivo* tests on hepatic cells (HepG2,) and murin model exposed to fermented green tea extract show after exposure of ethanol a better viability and an increase of hepatic alcohol dehydrogenase [96].

3.2 Livestock feeding

The products of plant fermentation by *Lactobacillus* strains can be used in many fields ranging from livestock feeding, such as ruminant by decreasing gas production [97]. *Lactobacillus* strains can also be used for silage preparation. Silages are grass or other green fodder that is compacted and stored under airtight conditions, typically in a silo, for use as livestock feeding in the winter. Many studies focus on using *Lactobacillus* strains to improve the quality of the silage. In reference [98], the effect of *L. brevis* and *L. parafarraginis* used as inoculants and the microbial communities of corn stover silage were studied. After 20 days, the two *Lactobacillus* strains were predominant, and a reduction in lactic acid content coupled with an increase in acetic acid and 1,2-propanediol contents was observed. An improvement in the silage quality and reproducibility of the ensiling process were observed [98]. Recently in [99], the effect of *L. plantarum* addition on the nutritive value of dwarf elephant grass (*Pennisetum purpureum* cv Mott) silage was presented. The aim was to examine the effects of different *L. plantarum* addition on the physical quality, pH, and nutritional value (dry matter, organic matter, crude protein, crude fiber). After incubation, a good silage quality (fresh and acidic odor, good texture, and no fungi) and a pH around 4 were observed. *L. plantarum* addition accelerates ensilage fermentation [99]. In [100], an increase in silage quality by adding waste molasses to *L. plantarum* MTD1 was observed. In the same context, the addition of cellulase was studied to evaluate the effects on the chemical composition, bacterial communities, stability of mixed silage made with high-moisture amaranth and rice straw fermented by *L. plantarum*.

Cellulases increased the abundance of *Lactobacillus* bacteria and reduced the abundance of other lactic acid bacteria. It decreased pH, acetic acid content, ammonia nitrogen content and increased lactic acid concentration after 7 days of ensiling [101]. In conclusion, silage treated with both *Lactobacillus* bacteria and cellulase showed the best silage quality. Optimizing the digestibility of feeds and thus increasing their nutritional value are a challenge for the livestock feeding industry. In another study, the fermentation product of a mixture of ginger and turmeric extract by *Lactobacillus* spp. was supplemented to chickens. Biological analyses of AO enzymes and analysis of gut microbiota and lymphoid organs showed a prebiotic effect, an AO effect, and an improvement in resistance to bacterial infections [102].

Lactobacillus Use for Plant Fermentation: New Ways for Plant-Based Product Valorization
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.104958>

3.3 Lactic acid production from plant biomass

The use of low-cost by-products is of primary interest as it reduces production costs compared with the use of complex culture media made with pure and refined products. Consequently, many by-products have been tested in the last few years, in association with screening of the best microbial strains, the best fermentation process, and the best conditions to make them work together [103]. Lactic acid is one of the most widely used organic acids for a long time in various industries, such as food, cosmetics, pharmaceutical, and textile industries, and flavor, conservation, AO, and antimicrobial activity [104]. In the last decade, it has also become an essential platform molecule in the biomaterials sector to produce poly-lactic acid (PLA), a bio-based polymer. This new interest has led to an explosion in worldwide demand. One of the characteristics of polylactic acid is its thermal resistance, a critical parameter for manufacturing thermoformed materials (packaging, film, etc.). *Lactobacillus* have been traditionally used for lactic acid production [105, 106]. When using large-scale fermentation bioprocesses, the biomass feedstock must be carefully selected as it accounts for almost half of the biopolymers production costs [105]. To address this production cost issue, scientists and industrials have been focused on lignocellulosic biomass as a fermentation substrate for lactic acid production. Nevertheless, in order to be easily usable, saccharification pretreatments are needed to break down the cellulose into fermentable carbohydrates. Moreover, *Lactobacillus* are classified as either homofermentative or heterofermentative. *L. delbrueckii* is a homofermentative strain commonly used for the production of lactic acid [107]. Homofermentative strains of *Lactobacillus* cannot use pentose carbohydrates from hemicellulose, but heterofermentative ones, such as *L. brevis*, can use these carbohydrates through the phosphoketolase pathway [106].

In reference [105], the fermentation of 11 different carbohydrates from seaweed or plant biomass as a carbon source to produce L-lactic acid with seven different *Lactobacillus* species was investigated. A comparative analysis of the expected yield of lactic acid production revealed that seaweeds provided comparable production rates to lignocellulosic biomasses [105]. In another study, beet molasse was used to produce lactic acid using *L. delbrueckii* IFO 3202 during batch and continuous fermentation, dilution rate of 0.5 h^{-1} was determined to be the best one and allowed to reach a maximum productivity of $11 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Authors have demonstrated the importance of medium supplementation by yeast extract, as Lactobacilli are tedious microorganisms that require many substrates and substances to grow [108]. Nevertheless, it is estimated that the addition of yeast extract can contribute up to 30% of the cost of producing lactic acid [109]. Zhang & Vadlani studied the production of D-lactic acid by a homofermentative strain, *L. delbrueckii* ATCC 9649, through a sequential hydrolysis and fermentation process (SHF) and a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF). In this work, first, the saccharification of pulp and corn stover was done, and then carbohydrates generated from hydrolysis were used by *L. delbrueckii* and converted to D-lactic acid with high purity (99.8 %). The authors highlighted that the SHF process, compared with the SSF process, avoids substrate inhibition and increases the productivity and the yield of D-lactic acid [107]. The same researchers' team has then engineered a strain of *L. plantarum*, introducing gene encoding isomerase and xylulokinase, for the overproduction of D-lactic acid from corn stover and soybean meal extract. In this work, the authors optimized the culture medium through response surface methodology using saccharified corn stover as carbon source and soybean meal extract as a nitrogen source to substitute YE in the

Lactobacillus – A Multifunctional Genus

medium to produce high purity of D-lactic acid (99%). A maximum productivity of $0.82 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ of D-lactic acid was obtained in the optimized medium, 10% higher than with YE as the main nitrogen source [106].

Saccharification and fermentation could be performed at the same time (simultaneous saccharification and fermentation) and have been used for instance by Tu et al. for LA production. With *L. plantarum*, they obtained up to 65.6 g L^{-1} of lactic acid with a cellulose conversion of 69% [110]. Using inulin from chicory, in [111] they obtained a better performance by simultaneous saccharification and fermentation to produce D-lactic acid with *L. bulgaricus*. In their process, they obtained an optically pure molecule (99.9%), which could be interesting for further chemical processes. Productivity is also high with 123 g L^{-1} starting from 120 g L^{-1} of inulin treated by inulinase. The enzymatic treatment yielded inulin, which was used instead of glucose in MRS medium for fermentation [110, 111].

In another example, lactic acid production from fermented orange peels was evaluated by ion-exchange chromatography. The solid fermentations were in mono or coculture, with *L. casei* 2246, *L. plantarum* 285, and *L. paracasei* 4186. This study showed that fermentation resulted in higher lactic acid production with the monoculture *L. casei* 2246 and the coculture *L. casei* 2246 with *L. plantarum* 285. Glucose can also be converted to lactic acid by symbiotic relationship between different lactic acid bacteria. *L. helveticus* is an AA-producing strain (alanine, serine, aspartate, glutamate, aromatic AA, and histidine), whereas *L. delbrueckii* is a lactic-acid-producing strain but produces little of these AAs necessary for its growth. Thus, this co-fermentation optimized the lactic acid yield [104]. Before industrialization of such a process, scale-up has to be demonstrated and downstream processes (purification) to be implemented and considered. However, another technology could also be used for lactic acid production by microorganisms. Indeed, solid-state fermentation was used with cassava bagasse as substrate and *L. delbrueckii* as microorganism [103, 112].

3.4 Other applications of active ingredients produced from fermented plant extracts

Another biotechnology application is the production of proteins, peptides, or AA such as GABA. Indeed, plant by-products are sources of different proteins, which can be hydrolyzed during fermentation by *Lactobacillus* species. These microorganisms, especially *L. plantarum*, have developed a proteolytic system to satisfy their nitrogen requirements. The proteolytic activities and protein hydrolysis patterns are very different from one strain to another. The resulting peptides displayed different biological functions such as angiotensin-converting enzyme inhibition, mineral binding, antidiabetic, satiating, immunomodulating, opioid, AO, or antimicrobial activities [12]. The *L. plantarum* LP-9 strain was used to coproduce GABA and lactic acid from agri-residues such as wheat bran, rice bran, corn bran. The results were compared with the use of cassava (starchy food crop), and the production yields were significant and comparable to this control condition [113]. Co-fermentation of Ginseng root and leaf extract always by *L. plantarum* EJ2014 and *B. subtilis*, also showed GABA production [114]. The fermentation of Kimchi by *L. brevis* BJ20 allows the conversion of glutamic acid into GABA. This process is particularly interesting because GABA has an AO activity demonstrated during the study of DPPH scavenging, superoxide scavenging, and xanthine oxidase inhibition tests [115]. Biotechnology also allows

Lactobacillus Use for Plant Fermentation: New Ways for Plant-Based Product Valorization
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.104958>

production of cosmetic or pharmaceutical products or surfactants. Biosurfactants production was investigated using *L. paracasei* on enzymatically hydrolyzed vineyard pruning waste. This study presented the complete process for this waste valorization using acid hydrolysis, delignification, and enzymatic hydrolysis steps. Authors have demonstrated the impact of the carbon source extraction process on the biosurfactant composition produced by the strain *L. paracasei* A20 [116].

4. Limitations and future challenges

Faced with environmental and societal problems such as pollution, global warming, and overpopulation, crop yields are increasingly challenging to sustain. Moreover, while demand is increasing in developed countries, poor populations are struggling to feed themselves, and undernutrition is high in these countries. This is why the food and agriculture industry must find solutions to meet the needs of all. Among these, better use of plant resources and better exploitation of their by-products are two solutions of interest. In addition, consumers are looking for more natural and healthy products, and industrials are looking for economically viable bio-based solutions. Fruit and vegetable waste and cereal by-products are likely to be reused because of their quantity and richness in nutrients and bacterial strains suitable for lactic fermentation.

When lactic acid bacteria ferment the nutrients in them, the functional and nutritional properties increase, representing significant opportunities for the agri-food, biotechnology, medical, nutraceutical, and cosmetic industries. As presented in this chapter, the fermentation of plant products by *Lactobacillus* allows the production of numerous bioactive molecules for the development of many applications. Nevertheless, to meet the demand, lactic acid fermentation by *Lactobacillus* requires optimization. First of all, the use of plant by-products requires a crucial design of the fermentation process according to the raw material (solid, liquid, semiliquid fermentations). This design could lead to the development and emergence of new processes that should be able to meet industrial viability, economic returns, and consumer needs. Therefore, much work is still needed on these processes to increase the commercialization of new bio-based products from plant by-products. On the other hand, *Lactobacillus* strains are fastidious bacteria in their nutritional requirements and are not necessarily well adapted metabolically for growth from any substrate, and the use of GMOs is a very limiting criterion for many applications (food, cosmetics, etc.). The growth parameters and enzymatic activities of *Lactobacillus* strains have a major impact on applications, particularly when the fermentation substrate is complex. It is therefore necessary to work on the culture conditions and metabolic adaptation of these strains in order to maximize the enzymatic activities and production rates of the molecules of interest. Therefore, many constraints exist, such as the lack of scientific data and hindsight, the control of culture conditions, and the separation and purification processes to recover bioactive compounds. Further efforts are urgently needed to overcome these problems. Nevertheless, one of the advantages of production with *Lactobacillus* is its ability to produce several types of molecules simultaneously, typically lactic acid and other molecules (derived or transformed from the substrate), which makes the fermentation process industrially interesting. Such multiproduct strategies should be promoted in the near future up to industrial scale.

5. Conclusion

Lactic acid fermentation is an ancestral process performed by numerous bacterial strains. Fermentation conditions, substrates, and potential additives represent challenges and constraints for yield optimization, process stabilization, and standardization. Indeed, lactic fermentation by *Lactobacillus* allows the production of many molecules of interest. When these bacteria ferment plant products, they induce biochemical conversions and the production of phenolic compounds, organic acids, and vitamins through their enzymatic activities. This review highlights the different applications related to the production of these compounds. The latter have bioactivities such as AO, AI, prebiotic, antimicrobial, and many others.

In addition, they are of growing interest to the food industry for their ability to increase nutritional value but also for their use as preservatives and modifiers of organoleptic properties. The different studies reviewed here are looking for alternatives to meet environmental and social consumer demand. In order to reduce production costs and the carbon footprint of the process, genetic engineering and the revalorization of plant by-products appear to be interesting avenues of research to improve the yield of compounds of interest. However, there is still a lack of scientific data on the control of fermentation by *Lactobacillus*. Further studies are needed to identify the biochemical reactions and metabolism of *Lactobacillus* involved in the production of bioactive compounds. In addition, studies are needed to further investigate the mechanisms involved in the bioactivities of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the financial support for the Charles Viollette Industrial Chair provided by the Lille European Metropolis (MEL) and the Isite of the University of Lille.

Acronyms and abbreviations

AA	Amino acids
ABTS	Acid 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
AI	Anti inflammatory
AM	Anti-microbial
AO	Antioxidant
BF	Batch fermentation
Co	Coculture
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPPH	2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl
EPS	Exopolysaccharides
FP	Fermentation process
FRAP	Ferric reducing antioxydant power
GABA	Gamma-aminobutyric acid
IL-6, Il-10	Interleukins
IM	Immuno-modulatory
LA	Lactic acid
LF	Liquid fermentation

Lactobacillus Use for Plant Fermentation: New Ways for Plant-Based Product Valorization
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.104958>

LPS	Lipopolysaccharide
NO	Nitric oxide
OA	Organic acids
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PC	Phenolic compounds
PB	Prebiotic effect
ROS	Reactive oxygen species
SBF	Solid batch fermentation
SF	Solid fermentation
SFCA	Short-chain fatty acid
TNF-alpha	Tumor-necrosis factor-alpha

Author details

Morgan Le Rouzic^{1,2†}, Pauline Bruniaux^{1,3†}, Cyril Raveschot³, François Krier¹, Vincent Phalip¹, Rozenn Ravallec¹, Benoit Cudennec¹ and François Coutte^{1*}

1 Université de Lille, UMRt BioEcoAgro 1158-INRAE, Institut Charles Viollette, France


2 Eurabiotech, Loos, France

3 VF-Bioscience, Loos, France

*Address all correspondence to: francois.coutte@univ-lille.fr

† Both authors have contributed equally to this work.

IntechOpen

© 2022 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 

17

Lactobacillus – A Multifunctional Genus

References

- [1] Lugtenberg BJJ, Malfanova N, Kamilova F, Berg G. Plant growth promotion by Microbes. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. 2013;559-573
- [2] Hérault B. La demande alimentaire en 2050 : chiffres, incertitudes et marges de manœuvre. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du territoire; 2011. Report No.: 27
- [3] Department of Economic and Social Affairs, Sustainable Development. THE 17 GOALS | Sustainable Development [Internet]. Organisation des Nations Unies. Available from: <https://sdgs.un.org/fr/goals>
- [4] Septembre-Malaterre A, Remize F, Poucheret P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International*. 2018;104: 86-99
- [5] Dogan K, Tornuk F. Improvement of bioavailability of bioactive compounds of medicinal herbs by drying and fermentation with *Lactobacillus plantarum*. *Functional Foods in Health and Disease*. 2019;9(12):735-748
- [6] Ravindran R, Jaiswal AK. Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in Biotechnology*. 2016;34(1):58-69
- [7] Görgüç A, Gençdağ E, Yılmaz FM. Bioactive peptides derived from plant origin by-products: Biological activities and techno-functional utilizations in food developments—A review. *Food Research International*. 2020;136:109504
- [8] Bustamante D, Tortajada M, Ramón D, Rojas A. Production of D-lactic acid by the fermentation of orange peel waste hydrolysate by lactic acid bacteria. *Fermentation*. 2020;6(1):1
- [9] Wang J, Jiang L, Sun H. Early evidence for beer drinking in a 9000-year-old platform mound in southern China. *PLoS One*. 2021;16(8):e0255833
- [10] Capurso L. Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A Review. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2019;53(Supplement 1):S1-S41
- [11] Hill D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C, Ross RP. The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:2107
- [12] Raveschot C, Cudennec B, Coutte F, Flahaut C, Fremont M, Drider D, et al. Production of bioactive peptides by *Lactobacillus* species: From gene to application. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:2354
- [13] Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020;70(4):2782-2858
- [14] Muñoz R, de las Rivas B, de Felipe FL, Reverón I, Santamaría L, Esteban-Torres M, et al. Biotransformation of phenolics by *Lactobacillus plantarum* in fermented foods. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. 2017. pp. 63-83

Lactobacillus – A Multifunctional Genus

- blueberry pomace with antioxidant properties improves fecal microbiota community structure and short chain fatty acids production in an in vitro mode. *LWT*. 2020;**125**:109260
- [29] Kwaw E, Ma Y, Tchabo W, Apaliya MT, Wu M, Sackey AS, et al. Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food Chemistry*. 2018;**250**:148-154
- [30] Lizardo RCM, Cho HD, Won YS, Seo KI. Fermentation with mono- and mixed cultures of *Lactobacillus plantarum* and *L. casei* enhances the phytochemical content and biological activities of cherry silverberry (*Elaeagnus multiflora* Thunb.) fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2020;**100**(9):3687-3696
- [31] Frediansyah A, Romadhoni F, Nurhayati R, Wibowo AT. Fermentation of jamaican cherries juice using *Lactobacillus plantarum* elevates antioxidant potential and inhibitory activity against type II diabetes-related enzymes. *Molecules*. 2021;**26**(10):2868
- [32] Goto M, Kuda T, Shikano A, Charrouf Z, Yamauchi K, Yokozawa M, et al. Induction of superoxide anion radical-scavenging c. *LWT*. 2019;**100**:56-61
- [33] Jung J, Jang HJ, Eom SJ, Choi NS, Lee N-K, Paik H-D. Fermentation of red ginseng extract by the probiotic *Lactobacillus plantarum* KCCM 11613P: ginsenoside conversion and antioxidant effects. *Journal of Ginseng Research*. 2019;**43**(1):20-26
- [34] Marazza JA, Nazareno MA, de Giori GS, Garro MS. Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Functional Foods*. 2012;**4**(3):594-601
- [35] Li Z, Teng J, Lyu Y, Hu X, Zhao Y, Wang M. Enhanced antioxidant activity for apple juice fermented with *Lactobacillus plantarum* ATCC14917. *Molecules*. 2019;**24**(1):51
- [36] Li H, Huang J, Wang Y, Wang X, Ren Y, Yue T, et al. Study on the nutritional characteristics and antioxidant activity of dealcoholized sequentially fermented apple juice with *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* fermentation. *Food Chemistry*. 2021;**363**:130351
- [37] Gao H, Wen J-J, Hu J-L, Nie Q-X, Chen H-H, Nie S-P, et al. Momordica charantia juice with *Lactobacillus plantarum* fermentation: Chemical composition, antioxidant properties and aroma profile. *Food Bioscience*. 2019;**29**:62-72
- [38] Wu S-C, Su Y-S, Cheng H-Y. Antioxidant properties of *Lactobacillus*-fermented and non-fermented *Graptopetalum paraguayense* E. Walther at different stages of maturity. *Food Chemistry*. 2011;**129**(3):804-809
- [39] Reque PM, Pinilla CMB, Tinello F, Corich V, Lante A, Giacomini A, et al. Biochemical and functional properties of wheat middlings bioprocessed by lactic acid bacteria. *Journal of Food Biochemistry*. 2020;**44**(7):e13262
- [40] Tlais AZA, Da Ros A, Filannino P, Vincentini O, Gobbetti M, Di Cagno R. Biotechnological re-cycling of apple by-products: A reservoir model to produce a dietary supplement fortified with biogenic phenolic compounds. *Food Chemistry*. 2021;**336**:127616
- [41] Jin X, Chen W, Chen H, Chen W, Zhong Q. Combination of *Lactobacillus*

Lactobacillus Use for Plant Fermentation: New Ways for Plant-Based Product Valorization
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.104958>

- plantarum and *Saccharomyces cerevisiae* DV10 as Starter Culture to Produce Mango Slurry: Microbiological, Chemical Parameters and Antioxidant Activity. *Molecules*. 2019;**24**(23):4349
- [42] Mousavi ZE, Mousavi M. The effect of fermentation by *Lactobacillus plantarum* on the physicochemical and functional properties of liquorice root extract. *LWT*. 2019;**105**:164-168
- [43] Braga ARC, de Mesquita LMS, PLG M, Habu S, de Rosso VV. *Lactobacillus* fermentation of jussara pulp leads to the enzymatic conversion of anthocyanins increasing antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018;**69**:162-170
- [44] Vieira ADS, Battistini C, Bedani R, Saad SMI. Acerola by-product may improve the in vitro gastrointestinal resistance of probiotic strains in a plant-based fermented beverage. *LWT*. 2021;**141**:110858
- [45] Thompson HO, Önning G, Holmgren K, Strandler HS, Hultberg M. Fermentation of Cauliflower and White Beans with *Lactobacillus plantarum*—Impact on Levels of Riboflavin, Folate, Vitamin B12, and Amino Acid Composition. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2020;**75**(2):236-242
- [46] Rizzello CG, Nionelli L, Coda R, De Angelis M, Gobbetti M. Effect of sourdough fermentation on stabilisation, and chemical and nutritional characteristics of wheat germ. *Food Chemistry*. 2010;**119**(3):1079-1089
- [47] Nancib A, Nancib N, Meziane-Cherif D, Boubendir A, Fick M, Boudrant J. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology*. 2005;**96**(1):63-67
- [48] Chauhan K, Trivedi U, Patel KC. Statistical screening of medium components by Plackett–Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. *Bioresource Technology*. 2007;**98**(1):98-103
- [49] Bahry H, Abdalla R, Pons A, Taha S, Vial C. Optimization of lactic acid production using immobilized *Lactobacillus Rhamnosus* and carob pod waste from the Lebanese food industry. *Journal of Biotechnology*. 2019;**306**:81-88
- [50] Ngouénam JR, Momo Kenfack CH, Foko Kouam EM, Kaktcham PM, Maharjan R, Ngoufack FZ. Lactic acid production ability of *Lactobacillus* sp. from four tropical fruits using their by-products as carbon source. *Heliyon*. 2021;**7**(5):e07079
- [51] Kim J, Choi K-B, Park JH, Kim KH. Metabolite profile changes and increased antioxidative and antiinflammatory activities of mixed vegetables after fermentation by *Lactobacillus plantarum*. *PLOS ONE*. 2019;**14**(5):e0217180
- [52] Shahbazi R, Sharifzad F, Bagheri R, Alsadi N, Yasavoli-Sharahi H, Matar C. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of fermented plant foods. *Nutrients*. 2021;**13**(5):1516
- [53] Chon H, Kim G, Kim S. Comparison of aqueous plant extracts before and after fermentation with *Lactobacillus paracasei* LS-2 on cytokine induction and antioxidant activity. *Natural Product Communications*. 2010;**5**(8):1934578X1000500827
- [54] Ali MS, Lee E-B, Lee S-J, Lee S-P, Boby N, Suk K, et al. *Aronia melanocarpa* extract fermented by *Lactobacillus plantarum* EJ2014 modulates immune response in mice. *Antioxidants*. 2021;**10**(8):1276

Lactobacillus – A Multifunctional Genus

- [55] Kim K, Lee G, Thanh HD, Kim J-H, Konkitt M, Yoon S, et al. Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* LRCC5310 offers protection against rotavirus-induced diarrhea and regulates inflammatory response. *Journal of Dairy Science*. 2018;**101**(7):5702-5712
- [56] Kim S-B, Kang B-H, Kwon H-S, Kang J-H. Antiinflammatory and antiallergic activity of fermented turmeric by *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 2011;**39**(3):266-273
- [57] Ghiamati Yazdi F, Soleimani-Zad S, van den Worm E, Folkerts G. Turmeric extract: Potential use as a prebiotic and anti-inflammatory compound? *Plant Foods Hum Nutr*. 2019;**74**(3):293-299
- [58] Yong CC, Yoon Y, Yoo HS, Oh S. Effect of lactobacillus fermentation on the anti-inflammatory potential of turmeric. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019;**29**(10):1561-1569
- [59] Ayivi RD, Gyawali R, Krastanov A, Aljaloud SO, Worku M, Tahergorabi R, et al. Lactic acid bacteria: Food safety and human health applications. *Dairy*. 2020;**1**(3):202-232
- [60] Cotârleț M, Stănciuc N, Bahrin GE. *Yarrowia lipolytica* and *Lactobacillus paracasei* solid state fermentation as a valuable biotechnological tool for the Pork Lard and Okara's biotransformation. *Microorganisms*. 2020;**8**(8):1098
- [61] Kothari D, Lee W-D, Jung ES, Niu K-M, Lee CH, Kim S-K. Controlled fermentation using autochthonous *Lactobacillus plantarum* improves antimicrobial potential of chinese chives against poultry pathogens. *Antibiotics*. 2020;**9**(7):386
- [62] Dallagnol AM, Pescuma M, De Valdez GF, Rollán G. Fermentation of quinoa and wheat slurries by *Lactobacillus plantarum* CRL 778: Proteolytic activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;**97**(7):3129-3140
- [63] Hashemi SMB, Mousavi Khaneghah A, Barba FJ, Nemati Z, Sohrabi Shokofti S, Alizadeh F. Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Functional Foods*. 2017;**38**:409-414
- [64] Beck MR, Garrett K, Marshall CJ, Olejar K, Bunt CR, Maxwell TMR, et al. *Lactobacillus* fermented plant extracts provided to yearling ewes improves their lambs' antioxidant status at weaning. *Animal Feed Science and Technology*. 2021;**281**:115103
- [65] Uerlings J, Schroyen M, Bautil A, Courtin C, Richel A, Sureda EA, et al. In vitro prebiotic potential of agricultural by-products on intestinal fermentation, gut barrier and inflammatory status of piglets. *British Journal of Nutrition*. 2020;**123**(3):293-307
- [66] Zhang Z-P, Ma J, He Y-Y, Lu J, Ren D-F. Antioxidant and hypoglycemic effects of diospyros lotus fruit fermented with *Microbacterium flavum* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2018;**125**(6):682-687
- [67] Park S, Son H-K, Chang H-C, Lee J-J. Effects of cabbage-apple juice fermented by *Lactobacillus plantarum* EM on lipid profile improvement and obesity amelioration in rats. *Nutrients*. 2020;**12**(4):1135
- [68] Ryu J-Y, Kang HR, Cho SK. Changes over the fermentation period in phenolic compounds and antioxidant and anticancer activities of blueberries fermented by *Lactobacillus*

Lactobacillus Use for Plant Fermentation: New Ways for Plant-Based Product Valorization
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.104958>

- plantarum. *Journal of Food Science*. 2019;**84**(8):2347-2356
- [69] Pontonio E, Dingo C, Gobetti M, Rizzello CG. Maize milling by-products: From food wastes to functional ingredients through lactic acid bacteria fermentation. *Frontiers in Microbiology*. 2019;**10**:561
- [70] Pontonio E, Dingo C, Di Cagno R, Blandino M, Gobetti M, Rizzello CG. Brans from hull-less barley, emmer and pigmented wheat varieties: From by-products to bread nutritional improvers using selected lactic acid bacteria and xylanase. *International Journal of Food Microbiology*. 2020;**313**:108384
- [71] Chen H-Y, Hsieh C-W, Chen P-C, Lin S-P, Lin Y-F, Cheng K-C. Development and optimization of djulis sourdough bread fermented by lactic acid bacteria for antioxidant capacity. *Molecules*. 2021;**26**(18):5658
- [72] Schettino R, Pontonio E, Rizzello CG. Use of fermented hemp, chickpea and milling by-products to improve the nutritional value of semolina pasta. *Foods*. 2019;**8**(12):604
- [73] Brückner-Gühmann M, Banovic M, Drusch S. Towards an increased plant protein intake: Rheological properties, sensory perception and consumer acceptability of lactic acid fermented, oat-based gels. *Food Hydrocolloids*. 2019;**96**:201-208
- [74] Kachouri F, Hamdi M. Use *Lactobacillus plantarum* in olive oil process and improvement of phenolic compounds content. *Journal of Food Engineering*. 2006;**77**(3):746-752
- [75] Ruiz-Barba J, Brenes-Balbuena M, Jiménez-Díaz R, García-García P, Garrido-Fernández A. Inhibition of *Lactobacillus plantarum* by polyphenols extracted from two different kinds of olive brine. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993;**74**(1):15-19
- [76] Leal-Sánchez MV, Ruiz-Barba JL, Sánchez AH, Rejano L, Jiménez-Díaz R, Garrido A. Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology*. 2003;**20**(4):421-430
- [77] Landete JM, Curiel JA, Rodríguez H, de las Rivas B, Muñoz R. Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Chemistry*. 2008;**107**(1):320-326
- [78] Ciafardini G, Marsilio V, Lanza B, Pozzi N. Hydrolysis of Oleuropein by *Lactobacillus plantarum* Strains Associated with Olive Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994;**60**(11):4142-4147
- [79] Ruiz-Barba JL, Cathcart DP, Warner PJ, Jiménez-Díaz R. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a Bacteriocin Producer, as a Starter Culture in Spanish-Style Green Olive Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994;**60**(6):2059-2064
- [80] Kachouri F, Setti K, Ksontini H, Mechmeche M, Hamdi M. Improvement of antioxidant activity of olive mill wastewater phenolic compounds by *Lactobacillus plantarum* fermentation. *Desalination and Water Treatment*. 2016;**57**(56):27125-27137
- [81] Tangyu M, Muller J, Bolten CJ, Wittmann C. Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Applied and Microbiology Biotechnology*. 2019;**103**(23-24):9263-9275
- [82] Do TVT, Fan L. Probiotic viability, qualitative characteristics, and

Lactobacillus – A Multifunctional Genus

- sensory acceptability of vegetable juice mixture fermented with lactobacillus strains. *Food and Nutrition Sciences*. 2019;**10**(04):412
- [83] Cui S, Zhao N, Lu W, Zhao F, Zheng S, Wang W, et al. Effect of different *Lactobacillus* species on volatile and nonvolatile flavor compounds in juices fermentation. *Food Science & Nutrition*. 2019;**7**(7):2214-2223
- [84] Bianchi F, Rossi EA, Gomes RG, Sivieri K. Potentially synbiotic fermented beverage with aqueous extracts of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and soy. *Food Science and Technology International*. 2015;**21**(6):403-415
- [85] Yoon KY, Woodams EE, Hang YD. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*. 2006;**97**(12):1427-1430
- [86] Lavinia BC, Manea I, Bratu MG, Avram D, Nicolescu CL. Evaluation of the cabbage and cucumber juices as substrate for *Lactobacillus acidophilus* LA-5. *Romanian Biotechnological Letters*. 2012;**17**(4):12
- [87] Karovičová J, Drdák M, Greif G, Hybenová E. The choice of strains of *Lactobacillus* species for the lactic acid fermentation of vegetable juices. *European Food Research and Technology*. 1999;**210**(1):53-56
- [88] Jang H, Kim M. Characteristics of vegetable juice fermented with *Lactobacillus plantarum* MKHA15 and *Leuconostoc mesenteroides* MKSR. *Journal of the Korean Dietetic Association*. 2019;**25**(4):281-294
- [89] Dunkley KE, Hekmat S. Development of probiotic vegetable juice using *Lactobacillus Rhamnosus* GR-1. *Nutrition & Food Science*. 2020;**50**(5):955-968
- [90] Hashemi SMB, Jafarpour D. Fermentation of bergamot juice with *Lactobacillus plantarum* strains in pure and mixed fermentations: Chemical composition, antioxidant activity and sensorial properties. *LWT*. 2020;**131**:109803
- [91] Gupta S, Jaiswal AK, Abu-Ghannam N. Optimization of fermentation conditions for the utilization of brewing waste to develop a nutraceutical rich liquid product. *Industrial Crops and Products*. 2013;**44**:272-282
- [92] Oktaviani L, Astuti DI, Rosmiati M, Abduh MY. Fermentation of coffee pulp using indigenous lactic acid bacteria with simultaneous aeration to produce cascara with a high antioxidant activity. *Heliyon*. 2020;**6**(7):e04462
- [93] Nguyen NK, Dong NTN, Nguyen HT, Le PH. Lactic acid bacteria: promising supplements for enhancing the biological activities of kombucha. *SpringerPlus*. 2015;**4**(1):91
- [94] Nguyen NK, Dong NTN, Le PH, Nguyen HT. Evaluation of the glucuronic acid production and other biological activities of fermented sweeten-black tea by kombucha layer and the co-culture with different *Lactobacillus* sp. strains. *International Journal Of Modern Engineering Research*. 2014;**4**(5):12-17
- [95] Hou J, Luo R, Ni H, Li K, Mgomi FC, Fan L, et al. Antimicrobial potential of kombucha against foodborne pathogens: A review. *qas*. 2021;**13**(3):53-61
- [96] Park JH, Kim Y, Kim SH. Green tea extract (*Camellia sinensis*) fermented by *Lactobacillus fermentum* attenuates alcohol-induced liver damage. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2012;**76**(12):2294-2300
- [97] Cherdthong A, Suntara C, Khota W. *Lactobacillus casei* TH14 and additives

Lactobacillus Use for Plant Fermentation: New Ways for Plant-Based Product Valorization
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.104958>

- could modulate the quality, gas kinetics and the in vitro digestibility of ensilaged rice straw. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2020;**104**(6):1690-1703
- [98] Xu Z, He H, Zhang S, Kong J. Effects of inoculants *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus parafarraginis* on the fermentation characteristics and microbial communities of corn stover silage. *Scientific Reports*. 2017;**7**(1):13614
- [99] Irsyammawati A, Ndaru PH. The effect of *Lactobacillus plantarum* addition and fermentation periods on nutritive value dwarf elephant grass (*pennisetum purpureum* cv mott) silage. *IOP Conference Series: Earth Environmental Science*. 2020;**478**:012049
- [100] Zhao J, Dong Z, Li J, Chen L, Bai Y, Jia Y, et al. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* MTD1 and waste molasses as fermentation modifier to increase silage quality and reduce ruminal greenhouse gas emissions of rice straw. *Science of The Total Environment*. 2019;**688**:143-152
- [101] Mu L, Xie Z, Hu L, Chen G, Zhang Z. *Lactobacillus plantarum* and molasses alter dynamic chemical composition, microbial community, and aerobic stability of mixed (amaranth and rice straw) silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021;**101**(12):5225-5235
- [102] Risdianto D, Suthama N, Suprijatna E, Sunarso S. Inclusion effect of ginger and turmeric mixture combined with *Lactobacillus* spp. isolated from rumen fluid of cattle on health status and growth of broiler. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 2019;**44**(4):423
- [103] Dedenaro G, Costa S, Rugiero I, Pedrini P, Tamburini E. Valorization of agri-food waste via fermentation: Production of l-lactic acid as a building block for the synthesis of biopolymers. *Applied Sciences*. 2016;**6**(12):379
- [104] Ricci A, Diaz AB, Caro I, Bernini V, Galaverna G, Lazzi C, et al. Orange peels: From by-product to resource through lactic acid fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019;**99**(15):6761-6767
- [105] Hwang HJ, Lee SY, Kim SM, Lee SB. Fermentation of seaweed sugars by *Lactobacillus* species and the potential of seaweed as a biomass feedstock. *Biotechnol Bioproc E*. 2011;**16**(6):1231-1239
- [106] Zhang Y, Vadlani PV, Kumar A, Hardwidge PR, Govind R, Tanaka T, et al. Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Microbiology Biotechnology*. 2016;**100**(1):279-288
- [107] Zhang Y, Vadlani PV. d-Lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via *Lactobacillus delbrueckii* fermentation. *Bioprocess and Biosystem Engineering*. 2013;**36**(12):1897-1904
- [108] Göksungur Y, Güvenç U. Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 1997;**69**(4):399-404
- [109] Li Z, Ding S, Li Z, Tan T. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation with corn steep liquor-supplemented acid-hydrolysate of soybean meal. *Biotechnology Journal*. 2006;**1**(12):1453-1458
- [110] Tu W-L, Hsu T-C, Wang C-A, Guo G-L, Chao Y. Using novel *Lactobacillus plantarum* to produce lactic acid from lignocellulosic biomass in an integrated

Lactobacillus – A Multifunctional Genus

simultaneous saccharification and fermentation process. *BioResources*. 2019;**14**(2):3873-3885

[111] Xu Q, Zang Y, Zhou J, Liu P, Li X, Yong Q, et al. Highly efficient production of d-lactic acid from chicory-derived inulin by *Lactobacillus bulgaricus*. *Bioprocess and Biosystem Engineering*. 2016;**39**(11):1749-1757

[112] John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Solid-state fermentation for l-lactic acid product. *Process Biochemistry*. 2006;**41**(4):759-763

[113] Sharma P, Sharma A, Singh J, Singh N, Singh S, Tomar GS, et al. Co-production of gamma amino butyric acid (GABA) and lactic acid using *Lactobacillus plantarum* LP-9 from agro-residues. *Environmental Technology & Innovation*. 2021;**23**:101650

[114] Park J-H, Garcia CV, Lee S-P. Fortification of poly- γ -glutamic acid and γ -aminobutyric acid in homogenized hydroponic ginseng co-fermented by *Bacillus subtilis* ha and *Lactobacillus plantarum* EJ2014. *Preventive Nutrition and Food Science*. 2019;**24**(4):485-491

[115] Lee B-J, Kim J-S, Kang YM, Lim J-H, Kim Y-M, Lee M-S, et al. Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods. *Food Chemistry*. 2010;**122**(1):271-276

[116] Vecino X, Rodríguez-López L, Gudiña EJ, Cruz JM, Moldes AB, Rodrigues LR. Vineyard pruning waste as an alternative carbon source to produce novel biosurfactants by *Lactobacillus paracasei*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2017;**55**:40-49

Résumé

Les chicorées (*Cichorium intybus*), telles que l'endive et la chicorée dite industrielle, sont majoritairement cultivées dans les Hauts-de-France. Ces plantes présentent de nombreux bienfaits pour la santé humaine, notamment des propriétés antidiabétiques, anti-inflammatoires, hépato-protectrices, antioxydantes, et prébiotiques. Ces activités sont attribuées à des composés tels que l'inuline, les polyphénols et les lactones sesquiterpènes. La production de chicorées génère plus de 400 000 tonnes de co-produits par an, habituellement destinés à l'alimentation animale. Afin de mieux valoriser ces co-produits, la fermentation lactique représente une approche intéressante. En effet, les bactéries lactiques possèdent des enzymes capables de dégrader les matrices végétales, améliorant ainsi leurs bioactivités. Ce projet de thèse a pour objectif le développement d'un ingrédient santé à partir de la fermentation lactique des co-produits de chicorées. Le premier axe a porté sur le développement d'un procédé de fermentation des co-produits de chicorée par les souches de *Lactobacillus* issues de la collection de VF Bioscience ou du biote de l'endive. Les couples souches/co-produits, les conditions de fermentation ainsi que l'amélioration de la croissance des *Lactobacillus* ont été étudiés. De même, les activités antioxydantes, hépato-protectrices et anti-inflammatoires des produits de fermentation ont été évaluées par des tests biochimiques et cellulaires. Le second axe s'est concentré sur l'étude de l'impact de la digestion gastro-intestinale et du passage de la barrière intestinale sur les activités des produits de la fermentation, ainsi que sur leur caractérisation à chaque étape du processus. Pour ce faire, les produits de la fermentation ont été digérés *in vitro* et mis au contact avec une coculture de cellules Caco-2 et HT29-MTX cultivées sur inserts, afin de simuler la barrière intestinale. Les activités antioxydantes, hépato-protectrices et anti-inflammatoires ont ensuite été évaluées sur différentes lignées cellulaires. Ce projet a montré que la fermentation lactique des co-produits de chicorée permet d'améliorer certaines de leurs bioactivités, et que ces activités sont peu affectées par la digestion gastro-intestinale.

Mots clés : co-produits de chicorée, valorisation, bioactivités, *Lactobacillus*, fermentation.

Abstract

Chicories (*Cichorium intybus*), such as endive and industrial chicory, are primarily cultivated in the Hauts-de-France region. These plants offer numerous health benefits, including antidiabetic, anti-inflammatory, hepatoprotective, antioxidant, and prebiotic properties. These activities are attributed to compounds such as inulin, polyphenols, and sesquiterpene lactones. Chicory production generates over 400,000 tons of co-products annually, which are usually intended for animal feed. To better valorize these co-products, lactic fermentation presents an interesting approach. Indeed, lactic acid bacteria possess enzymes capable of degrading plant matrices, thereby improving their bioactivities. The aim of this doctoral project is to develop a health ingredient from the lactic fermentation of chicory co-products. The first axis focused on developing a fermentation process for chicory co-products using *Lactobacillus* strains from the VF Bioscience collection or from the endive microbiota. The strain/co-product combinations, fermentation conditions, and optimization of *Lactobacillus* growth were studied. Additionally, the antioxidant, hepatoprotective, and anti-inflammatory activities of the fermentation products were evaluated through biochemical and cellular assays. The second axis focused on studying the impact of gastrointestinal digestion and the passage through the intestinal barrier on the activities of the fermentation products, as well as their characterization at each stage of the process. To do this, the fermentation products were digested *in vitro* and exposed to a co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells grown on inserts to simulate the intestinal barrier. Antioxidant, hepatoprotective, and anti-inflammatory activities were then evaluated on various cell lines. This project demonstrated that the lactic fermentation of chicory co-products enhances some of their bioactivities and that these activities are minimally affected by gastrointestinal digestion.

Key words: chicory by-products, valorization, bioactivities, *Lactobacillus*, fermentation.