الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : 3137

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Microbiologie Appliquée et Sciences Alimentaires

كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم :الميكروبيولوجيا التطبيقية وعلوم التغذية

Mémoire de Fin d'Études

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Sciences de La Nature et de la Vie**
Filière: Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Evaluation de l'effet de l'encapsulation sur la survie d'une bactérie lactique dans les conditions gastro-intestinales

Membres de Jury
Président : **Dr.** Mohamed Tahar BOUBEZARI
Examinatrice : **Mme.** Wahiba BENHAMADA
Encadrant : **Pr.** Mohammed SIFOUR

Présenté par
Melle : Anissa BOUROUINA
Melle: Miyada GHEBACHE
Melle: Raouda MERZOUK

Année Universitaire 2021-2022

Numéro d'ordre (bibliothèque) :.....

Remerciement

Nous espérons que les quelques mots que nous nous apprêtons à écrire réussiront à retranscrire fidèlement nos sentiments.

En premier lieu, nous remercions « Allah », le tout puissant, de nous avoir aidé à surmonter toutes les difficultés lors de nos études et qui nous avoir donné la patience, la volonté et le courage afin d'arriver à la finalité de ce travail.

Notre première pensée va tout naturellement à notre encadrant, ***Pr. Mohammed SIFOUR*** *qui nous a fait l'honneur de veiller et diriger ce travail. Nous avons beaucoup apprécié ses conseils et sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

Nous tenons particulièrement à remercier les membres du jury ***Dr. Mohamed Tahar BOUBEZARI*** *et* ***Mme Wahiba BENHAMADA*** *d'avoir accepté de juger ce travail.*

Nous remercions également ***Mme Nabila Brahamia*** *pour son aide.*

Enfin, nous remercions gracieusement toute personne qui a contribuée de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

II.2.5. Protéines de lactosérum 9
II.3. Techniques d'encapsulation 9
II.3.1. Extrusion 9
II.3.2. Emulsion 10
II.3.3 Séchage par pulvérisation 10
II.3.4. Coacervation 11
II.3.5. Revêtement sur lit fluidisé 11
II.3.6. Lyophilisation (Freeze-Drying) 11
II.4. Facteurs influençant l'efficacité d'encapsulation 12
II.5. Les avantages de l'encapsulation 12

III. Co-encapsulation des bactéries probiotiques

III.1. Concept de base 12
III.2. Exemples sur la co-encapsulation 12
III.3. Propolis 13
III.3.1. Propriétés générales 13
III.3.2. Exemples sur la co-encapsulation des probiotiques avec l'extrait de propolis 13

Partie II : Etude expérimentale

I. Matériel 14
I.1.Matériel biologique 14
I.2. Milieux de cultures 14
I.3. Tampons 14
I.4. Produits et Réactifs 14
I.5. Equipements et Appareillage 15
II. Méthodes 15
II.1. Revivification de la souche 15
II.2. Préparation de la souche pour l'encapsulation 15
II.3. L'encapsulation de la souche dans l'alginate de sodium à 2% 16
II.3.1. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 17
II.3.1.1. Tolérance aux acides 17
II.3.1.2. Tolérance aux sels biliaires 17
II.4. Co-encapsulation de la souche bactérienne avec l'extrait éthanolique de la propolis ... 18
II.4.1. Extrait éthanolique de la propolis 18
II.4.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la propolis (CMI) 18
II.4.3. Procédé de la co-encapsulation 18

II.4.4. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques de la souche co-encapsulée 18
II.4.4.1 Tolérance aux acides 18
II.4.4.2 Tolérance aux sels biliaires 19
II.4.5. L'activité antibactérienne de la souche sur les bactéries pathogènes 19
III. Résultats et discussions 20
III.1. Vérification de la pureté de la souche 20
III.2. Caractéristiques des microcapsules 20
III.3. Evaluation des quelques aptitudes probiotiques de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 21
III.3.1. Tolérance aux acides. 23
III.3.2. Tolérance aux sels biliaires. 23
III.4. Co-encapsulation de la souche bactérienne avec EEP 24
III.4.1. Concentration minimale inhibitrice de propolis 24
III.4.2. Caractéristiques des billes encapsulées et co-encapsulées avec EEP 26
III.5. Evaluation des quelques aptitudes probiotiques de la souche co-encapsulée 26
III.5.1. Tolérance aux acides. 26
III.5.2. Tolérance aux sels biliaires. 27
III.6. L'activité antimicrobienne de la souche sur les bactéries pathogènes 29
Conclusion 31
Référence 32
Annexes

Liste des figures

Figure 1: Certains micro-organismes reconnus comme probiotiques 3

Figure 2: Principaux mécanismes d'action des probiotiques 6

Figure 3: Image schématique de la technique d'extrusion pour l'encapsulation des bactéries probiotiques 9

Figure 4: Image schématique de la technique d'émulsification pour l'encapsulation bactérienne 20

Figure 5: Image schématique de la technique de séchage par pulvérisation pour l'encapsulation 11

Figure 6: Protocole de l'encapsulation bactérienne dans l'alginate par extrusion. 19

Figure 7: Protocole de l'activité antibactérienne des cellules encapsulées. 26

Figure8: Aspect des colonies de *lactiplantibacillius* sp. O_7S_1 sur le gélose MRS.....20

Figure 9: Aspect des billes de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 obtenus par la méthode d'extrusion. 23

Figure 10: Effet de l'acidité sur la survie de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 libre et encapsulée dans l'alginate de sodium à 2%. 22

Figure 11: Survie de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 libre et encapsulée dans 2% de l'alginate de sodium incubé à 0,3% de sels biliaires. 28

Figure 12: Zones d'inhibition pour la sensibilité de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 aux différentes concentrations de propolis, T : témoin. 32

Figure 13: Aspect des billes *de Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 obtenus par la méthode d'extrusion. 34

Figure 14: Effet de l'acidité sur la survie de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 encapsulée et co-encapsulée dans l'alginate de sodium à 2%.....36

Figure 15: Survie de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 encapsulée et co-encapsulée dans l'alginate de sodium incubé à 0,3% de sels biliaires.. 38

Liste des tableaux

Tableau 1. Critères de sélection des souches probiotiques.....4

Tableau 2. Sensibilité de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 aux différentes concentrations d'EEP....25

Tableau 3. Activité antibactérienne de la souche *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 encapsulée ou co-encapsulées sur les souches de références..... 29

Liste des abréviations

ALG : Alginate.

CFS : Cell-Free Supernatant.

CMI : Concentration Minimale inhibitrice.

CO_2 : Dioxyde de Carbone.

DO: Densité Optique.

FAO: Food and Agriculture Organization.

IBS: Irritable Bowel Syndrome.

MRS: Man-Rogosa-Sharp.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PBS: Phosphate Buffer Saline.

rpm: rotation par minute.

TGI : Tractus Gastro-Intestinal.

UFC : Unité Formant Colonie.

Introduction

Introduction

Les aliments nutritifs soutiennent les exigences du corps humain, en compensant les limitations de notre physiologie digestive et les restrictions anaboliques. Ces aliments sont également le support idéal pour la croissance des micro-organismes qui ont colonisés notre organisme **(Evivie et *al.*, 2017).** La présence des agents pathogènes provoque de nombreuses maladies causées par l'accumulation de substances toxiques au cours de la digestion. L'administration de certains microorganismes vivants dit « probiotique » en quantités appropriés est très importante pour améliorer les propriétés de la microflore intestinale indigène **(Misra et *al.*, 2021).**

Le concept de probiotiques est en grande partie dû aux travaux de Elie Metchnikoff (1907), qui a constaté que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes réduisent considérablement le nombre de bactéries pathogènes ou productrices de toxines dans le tube digestif **(Shokryazdan et *al.*, 2017 ; Pradhan et *al.*, 2020).**

Les bactéries lactiques ont un large éventail d'habitats y compris le tractus gastro-intestinal (TGI), la cavité buccale et le vagin des mammifères. Par ailleurs, elles ont également la capacité de coloniser les surfaces abiotiques telles que les environnements alimentaires par la formation de biofilms **(Arena et *al.*, 2017 ; Ramos et *al.*, 2020).** La viabilité et la stabilité des bactéries lactiques dans les aliments fermentés et l'environnement gasro-intestinale sont des défis majeurs à l'échelle industrielles, donc il est nécessaire de développer des méthodes pour protéger leurs viabilités **(Kavitake et *al.*,2018).**

La microencapsulation est l'une des techniques les plus utilisées pour améliorer la viabilité des cellules lors de leur passage à travers le TGI **(Li et *al.*, 2015).** Le choix des polymères d'encapsulation est crucial puisqu'il détermine les propriétés des microparticules et donc l'efficacité de protection des bactéries probiotiques des conditions gastriques lors de la digestion **(Kowalska et *al.*, 2022)**.

L'objectif de notre travail consistait d'une part à encapsuler une bactérie lactique *Lactiplontibacillus* sp. O_7S_1 dans l'alginate de sodium à 2% par la méthode d'extrusion, et à étudier la survie *in vitro* des cellules libres et encapsulées dans les conditions hostiles du TGI. D'autre part, nous avons procédé à la co-encapsulation de la même souche avec un extrait éthanolique de la propolis dans la même matrice. Une étude comparative des taux survie de la souche encapsulée avec et sans propolis a été réalisée dans les mêmes conditions.

Synthèse Bibliographique

Synthèse bibliographique

I. Bactéries lactiques probiotiques

I.1. Définition

Les bactéries lactiques sont constituées d'un groupe hétérogène de micro-organismes procaryotes à Gram positif capable de fermenter les sucres en acide lactique et de produire des enzymes protéolytiques **(Kieliszek et *al.*, 2021 ; Levit et *al.*, 2021).** Certaines bactéries lactiques sont des commensaux qui colonisent de manière régulière ou transitoire les muqueuses de l'hôte **(Arena et *al.*, 2017 ; Ramos et *al.*, 2020).**

I.2. Critères de classification

La classification des bactéries lactiques en différents genres est basée sur les critères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Morphologiquement, les bactéries lactiques sont subdivisées en bacilles (*Lactobacillus*) et en cocci (*Streptococcus...*), disposées en tétrades et en chaines courtes ou langues. Ce sont des bactéries non sporulées, généralement catalase négatives et préférant des conditions anaérobies mais elles sont en général aérotolérantes **(Dinçer et Kivanç, 2018 ; Juwana et *al.*, 2020).** Biochimiquement, elles sont classées selon leur mode de fermentation du glucose (homofermentation ou hétérofermentation), la croissance à différentes températures, la capacité de se développer à des concentrations élevées en sel et la tolérance aux acides et aux solutions alcalines **(Motta et Gomes, 2015).**

I.3. Applications des bactéries lactiques

I.3.1. Applications industrielles

- Les bactéries lactiques sont utilisées comme starters ou ferments dans différents processus biologiques, notamment en ce qui concerne les fermentations industrielles des aliments **(Pasolli et *al.*, 2020).**
- Elles produisent naturellement des bactériocines pour la bio-conservation des aliments **(Ayivi et *al.*, 2020).**
- Elles sont utilisées aussi dans la production des composés biologiquement actifs, tels que les acides organiques et d'autres métabolites **(Ayivi et *al.*, 2020 ; Barcenilla et *al.*, 2022).**

I.3. 2. Applications pharmaceutiques

- Les bactéries lactiques sont utilisées dans la production de l'acide lactique, qui est utilisé dans l'industrie pharmaceutique. De plus, les bactériocines des bactéries lactiques sont utilisées comme agents thérapeutiques à usage vétérinaire et médical et également comme produits phytosanitaires pour la protection des plantes **(Timothy et *al.*, 2021).**

- Elles sont également utilisées pour traiter plusieurs maladies telles que la diarrhée, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto-immunes **(Kazi et *al.*, 2022).**

I.4. Probiotiques

La notion « probiotique » a connu plusieurs changements dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. La définition actuelle des probiotiques a été établie en 2002 par la FAO (Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité adéquat, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte » **(FAO/WHO, 2002 ; Sakoui et *al.*, 2022).** Les bactéries lactiques les plus utilisés comme probiotiques chez l'Homme appartenant aux genres *Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus* et *Bifidobacterium* **(Sakoui et *al.*, 2022).** Les principales espèces de bactéries probiotiques sont répertoriées dans la **Figure 1** :

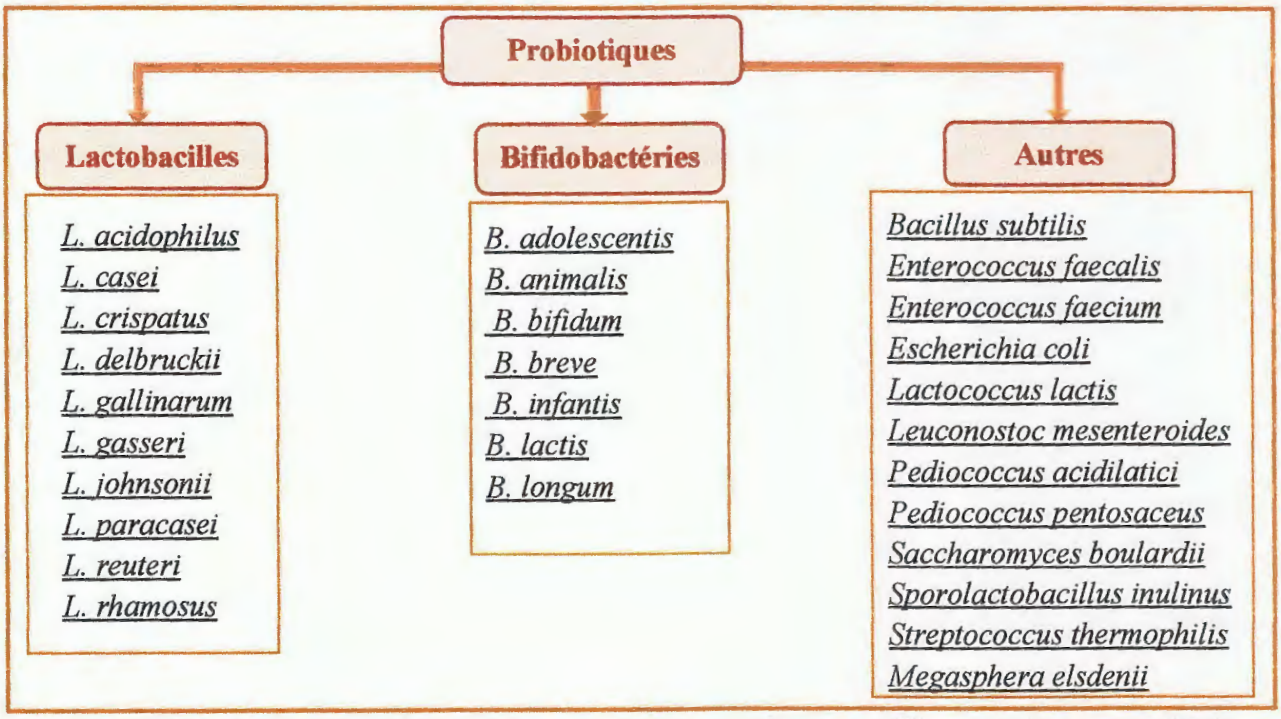

Figure 1: Certains micro-organismes reconnus comme probiotiques **(Kesen et Aiyegoro, 2018).**

I.5. Critères de sélection des probiotiques

Les propriétés des probiotiques varient selon les espèces ou les souches microbiennes. Les critères communs qui peuvent être utilisés pour sélectionner ces souches en tant que probiotiques comprennent les critères fonctionnels, la sécurité et les aspects technologiques (**Sakoui et *al.*, 2022**). Les différents critères de sélection sont illustrés dans le tableau 1 :

Tableau 1. Critères de sélection des souches probiotiques (**Markowiak et Śliżewska., 2017**)

Critères	Propriétés requises
De sécurité	• D'origine humaine ou animale. • Isolés du tractus gastro-intestinal des individus en bonne santé. • Historique d'utilisation sans danger. • Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques. • Absence de la capacité de couper les sels des acides biliaires. • Aucun effet négatif pour la santé humaine. • Absence de gènes responsables de la résistance aux antibiotiques localisés dans des éléments non stables.
Fonctionnels	• Compétitivité vis-à-vis du microbiote habitant l'écosystème intestinal. • Capacité à survivre et à maintenir l'activité métabolique et à se développer sur le site cible. • Résistance aux sels biliaires et aux enzymes digestives. • Résistance au faible pH gastrique. • Activité antagoniste vis-à-vis des agents pathogènes (par exemple, *Helicobacter pylori, Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* ...). • Résistance aux bactériocines et aux acides produits par le microbiote intestinal endogène. • Adhésion et capacité à coloniser certains sites particuliers au sein de l'organisme hôte, avec un taux de survie dans le système gastro-intestinal.
Technologiques	• Production facile de quantités élevées de biomasse et productivité élevée des cultures. • Viabilité et stabilité des propriétés recherchées pendant le processus de préparation (congélation, lyophilisation), et de distribution de produits probiotiques. • Taux de survie élevé lors du stockage dans les produits finis. • Garantie des propriétés sensorielles souhaitées des produits finis (dans le cas de l'industrie alimentaire). • Stabilité génétique.

I.6. Viabilité des probiotiques dans le tube digestif

Les probiotiques doivent survivre dans l'environnement hostile du tractus gastro-intestinal (TGI) du corps humain et ne doivent pas être tués par les mécanismes de défense de l'hôte **(Kim et *al.*, 2021).** Ils doivent également persister dans le tractus digestif qui leur permet d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte **(Mureşan *et al.*, 2017).**

I.6.1. Résistance aux conditions gastriques

Dans l'estomac, le pH est généralement compris entre 1,2 et 2,5 et le temps de vidange gastrique est relativement court (environ 2 heures) **(Shewale et *al.*, 2014).** Dans les différentes parties du TGI, certaines souches probiotiques sont rapidement tuées dans l'estomac tandis que d'autre telles que les souches des genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* peuvent passer à travers l'intestin entier à très forte concentration **(Saarela et *al.*, 2000 ; Shewale et *al.*, 2014 ; Markowiak et Śliżewska, 2017).**

I.6.2. Résistance aux conditions intestinales

Les acides biliaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol et sont conjugués à la glycine ou à la taurine. Ils sont sécrétés par la vésicule biliaire dans le duodénum pour améliorer l'absorption des graisses alimentaires **(Shewale et *al.*, 2014 ; Shokryazdan et *al.*, 2017).** Ils ont ainsi une activité détergente réduite et peuvent être moins toxiques pour les bactéries. La tolérance aux sels biliaires est un facteur primordial pour la survie des probiotiques et nécessaire pour une colonisation facile du TGI **(Shokryazdan et *al.*, 2017).**

I.7. Mécanisme d'action des probiotiques

L'administration des probiotiques a des effets bénéfiques sur l'hôte. Ces effets s'expliquent par divers mécanismes d'action principalement : le renforcement de la barrière épithéliale, l'adhérence accrue à la muqueuse intestinale et l'inhibition de la fixation des agents pathogènes, l'exclusion compétitive pour les sites d'adhésion et les sources nutritionnelles, la sécrétion de substances antimicrobiennes et la modulation du système immunitaire **(Bermudez-Brito et *al.*, 2012).** Ces mécanismes sont représentés sur **la figure 2.**

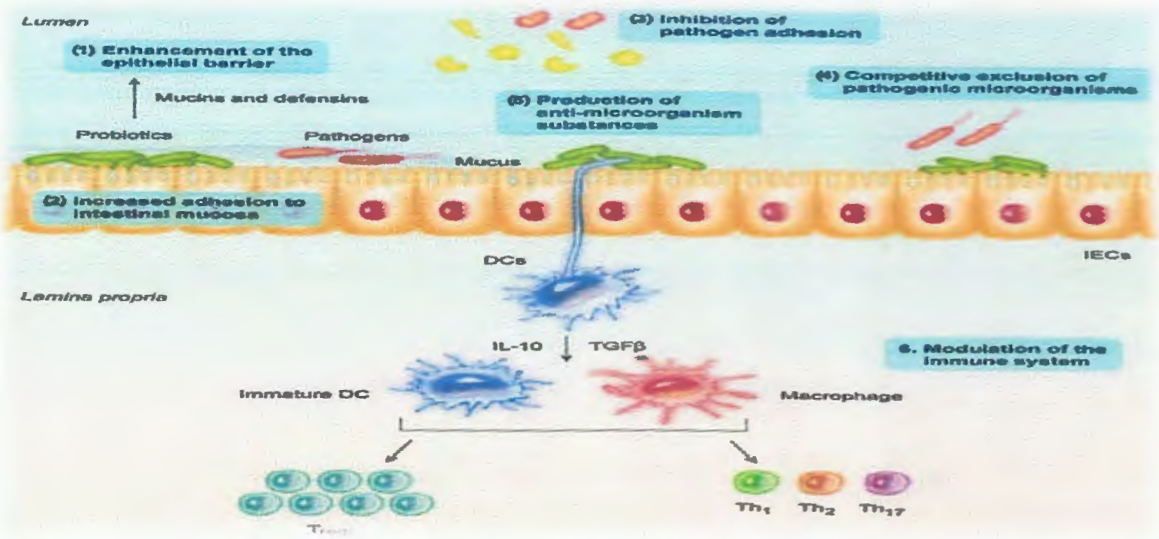

Figure 2: Principaux mécanismes d'action des probiotiques **(Bermudez-Brito et al., 2012).**

I.7.1. Renforcement de la barrière épithéliale

Les probiotiques font un bon travail de maintien de la barrière épithéliale intestinale par augmentation de l'expression des gènes associés à la signalisation des jonctions serrées en gardant leur intégrité intacte **(Wan et *al.*, 2019).**

I.7.2. Adhérence accrue à la muqueuse intestinale

Les cellules épithéliales intestinales sont recouvertes d'une couche de muqueuse glycocalyx. Cette couche protège l'épithélium intestinal des dommages mécaniques et empêche la colonisation des pathogènes **(Bron et *al.*, 2012).** Plusieurs études ont montré que la perte de protéines de la couche S de surface bactérienne causé par un traitement chimique diminue l'adhésion à différentes cellules cibles **(Wang et *al.*, 2018).**

I.7.3. L'exclusion compétitive

L'exclusion compétitive est basée sur une interaction bactérie/bactérie médiée par une compétition nutritionnelle entre l'organisme probiotique et l'organisme pathogène. Cela permet au probiotique d'inhiber la croissance du pathogène **(Ashaolu, 2020).**

I.7.4. Sécrétion de substances antimicrobiennes

Les bactéries lactiques probiotiques peuvent produire une large gamme de molécules capables de réduire le nombre de pathogènes en modifiant leur capacité métabolique ou leur aptitude à produire des toxines (bactériocines, éthanol, diacétyle, CO_2 et H_2O_2) **(Liao et Nyachoti, 2017).**

Le dioxyde de Carbon crée un environnement anaérobie où les bactéries aérobies ne peuvent pas se développer **(Tahlaiti, 2019).**

I.7.5. Modulation du système immunitaire

Les bactéries probiotiques contribuent à l'homéostasie intestinale par une interaction avec le système immunitaire inné ou adaptatif **(Kim et *al.*, 2016).** Des études ont trouvés que *Lactobacillus casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius* et *Lb. brevis* sont parmi les espèces de *Lactobacillus* qui ont une grande capacité pour coloniser l'intestin et moduler le système immunitaire de l'hôte **(Gupta et *al.*, 2018).**

I.8. Effets bénéfiques des bactéries lactiques probiotiques sur la santé humaine

La consommation des probiotiques est associée à une large gamme d'avantages pour la santé de l'hôte :

- Les bactéries lactiques probiotiques interagissent avec les cellules immunitaires de l'intestin ainsi qu'avec les bactéries pathogènes potentiellement nocives, Elles affectent l'écosystème intestinal par la régulation immunitaire de la muqueuse intestinale en agissant sur les cellules hôtes par des voies de signalisation **(Zhang et *al.*, 2019).**
- Elles sont recommandées pour le traitement du syndrome du côlon irritable (IBS), elles soulagent les symptômes, réduisent la douleur chez les patients atteints **(Przerwa et *al.*, 2021).**
- La consommation de probiotiques réduit le risque de diarrhée associé à l'utilisation d'antibiotiques chez les enfants **(Przerwa et *al.*, 2021).**
- L'ingestion des probiotiques contenus dans le lait fermenté fait baisser le taux de cholestérol sanguin **(Sakandar et Zhang, 2021).**
- La capacité des bactéries lactiques à assimiler le cholestérol **(Ostadzadeh et *al.*, 2022).**

II. L'encapsulation

II.1. Définition

L'encapsulation est un procédé par lequel des substances solides, liquides et gazeuses sont incluses dans des microcapsules ou microsphères afin de libérer leur contenu de façon contrôlée. **(Gharibzahedi et Smith, 2021).** Il existe deux systèmes d'encapsulation : le système de réservoir qui s'agit d'une enveloppe autour du matériau du noyau appelé aussi gélule, et le

système matrice, où l'agent actif est dispersé sur le matériau support et peut également être en surface **(Kowalska et *al.*, 2022).**

II.2. Matrices utilisées pour l'encapsulation

La réalisation de la technique d'encapsulation est basée en premier lieu sur la sélection d'une matrice appropriée nécessitant une approche méthodologique absolu **(Kavitake et *al.*, 2018).** Ces matrices sont des polymères d'origines naturels ou synthétiques **(Kowalska et *al.*, 2022)**, dont les plus couramment utilisés sont décrits par la suite.

II.2.1. Alginate

L'alginate est un hétéropolysaccharide linéaire d'origine naturelle, composé de deux unités monosaccharides : l'acide α-L-guluronique et l'acide β-D-mannuronique liées par une liaison glycosidique β (1-4) **(Sarao et Arora, 2017).** Il est extrait des algues brunes ou des espèces bactériennes des genres *Phaeophyceae* et *Pseudomonas*. Il est préféré pour encapsuler les probiotiques en raison de sa simplicité, sa non-toxicité, sa biocompatibilité ainsi que son faible coût **(Zhang et *al.*, 2021).**

II.2.2. Amidon

Les molécules d'amidon sont des glucides naturels constituées d'unités de glucose répétées liées par des liaisons glycosidiques (unités principales : l'amylose et l'amylopectine). Les groupes hydroxyle de l'amidon peuvent être modifiés de diverses manières pour améliorer ses propriétés physiques, chimiques et enzymatiques afin de faciliter son utilisation à des fins pharmaceutiques et biomédicales **(Garcia et *al.*, 2020; Razavi et *al.*, 2021).**

II.2.3. Chitosane

Le chitosane est un polymère cationique obtenu par désacétylation de la chitine, présent en abondance dans les exosquelettes de crustacés, d'insectes, d'arthropodes et de mollusques **(Santos et *al.*, 2020).** Il a été considéré comme un biopolymère polyvalent adapté à de nombreuses applications souhaitées. De plus, c'est un excellent matériau de revêtement pour encapsuler de nombreux ingrédients actifs **(Raza et *al.*, 2020 ; Santos et *al.*, 2020).**

II.2.4. K-Carraghénane

Les κ-carraghénanes sont des polymères de D-galactose-4-sulfate et de 3,6-anhydro-D-galactose qui proviennent des algues rouges **(Ren et *al.*, 2021).** Cependant, l'utilisation de ce polymère

comme matrice d'encapsulation requiert une température comprise entre 40 et 50°C pour la dissolution du polymère, étape qui est incompatible avec la survie des bactéries probiotiques **(Afzaal et *al.*, 2020).**

II.2.5. Protéines de lactosérum

Les protéines de lactosérum sont retrouvées dans la fraction liquide issue de la coagulation du lait lors de la fabrication du fromage. Ces protéines sont très utilisées pour développer des matrices d'encapsulation adaptées pour les bactéries probiotiques à cause de leurs excellentes propriétés de gélification offrant ainsi une protection contre l'acidité rencontrée au niveau de l'estomac **(Andrade et *al.*, 2019).**

II.3. Techniques d'encapsulation

II.3.1. Extrusion

C'est une technique simple, peu coûteuse et largement utilisée pour l'encapsulation des souches probiotiques. En addition, il s'agit d'un processus relativement doux qui assure une grande viabilité des cellules encapsulées. Cette technique implique l'utilisation de solution polymère (solution colloïdale aqueuse) contenant des cultures microbiennes, qui sont extrudées à travers une aiguille de seringue dans une solution de durcissement (généralement une solution de $CaCl_2$) à haute pression entraînant la formation des billes **(Figure 3) (Riseh et *al.*, 2021).**

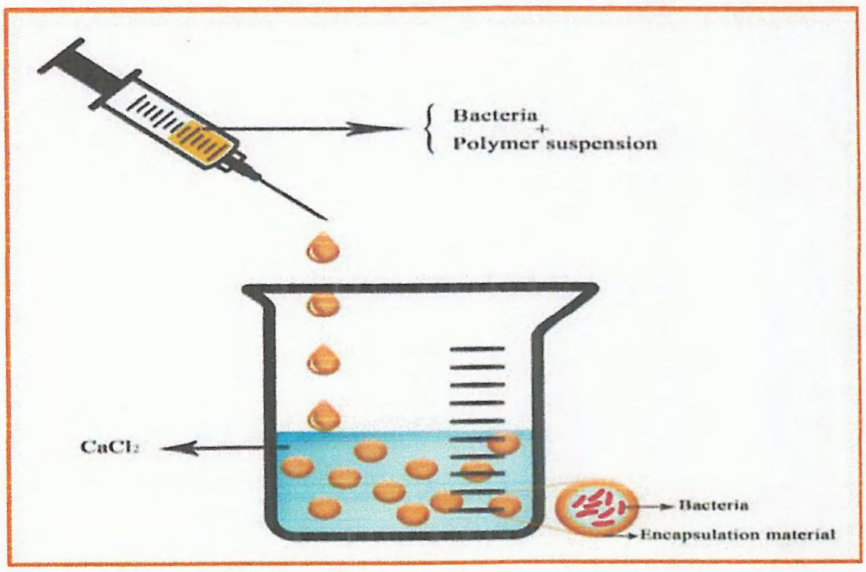

Figure 3:Image schématique de la technique d'extrusion pour l'encapsulation des bactéries probiotiques **(Riseh et *al.*, 2021).**

II.3.2. Emulsion

L'émulsification est une méthode d'interaction chimique entre deux phases, phase discontinue (polymère) et une phase continue (huile d'olive, l'eau...), elle nécessite l'ajoute d'un stabilisant d'émulsion **(Figure 4).** Les microcapsules diffèrent en taille selon le type d'émulsification et la vitesse d'agitation. C'est l'une des techniques qui est largement utilisée pour encapsuler les enzymes malgré que le coût de production est très élevé à cause de la grande quantité d'huile végétale nécessaire **(Yang et *al.*, 2020 ; Choudhury et *al.*, 2021 ; Riseh et *al.*, 2021).**

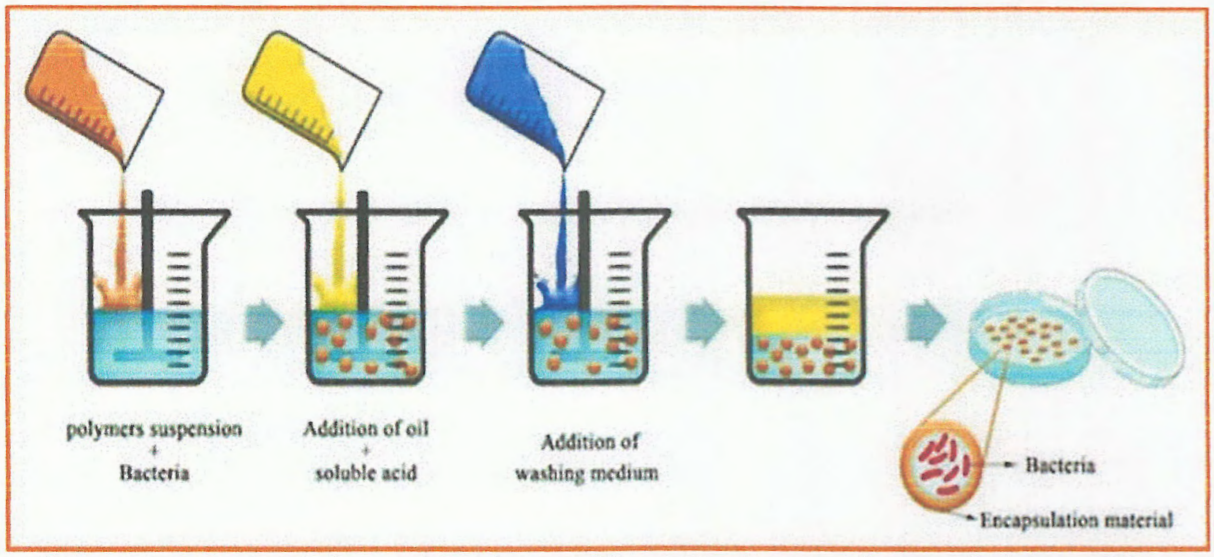

Figure 4:Image schématique de la technique d'émulsification pour l'encapsulation bactérienne **(Riseh et *al.*, 2021).**

II.3.3 Séchage par pulvérisation

Le principe de cette technique consiste à préparer une solution bactérienne après homogénéiser avec le matériau d'encapsulation pour donner une fine émulsion qui va être atomisée dans une chambre de séchage à un débit prédéfini. Lorsque l'eau de l'émulsion est éliminée par application d'énergie thermique, elle donne un ingrédient actif sec enrobé, plus stable à l'humidité, à l'oxygène, et aux autres facteurs de stress environnementaux **(Naveena et Nagaraju, 2020 ; Timilsena et *al.*, 2020).** Le diagramme schématique du processus d'encapsulation basé sur le séchage par pulvérisation est illustré dans la **figure 5.**

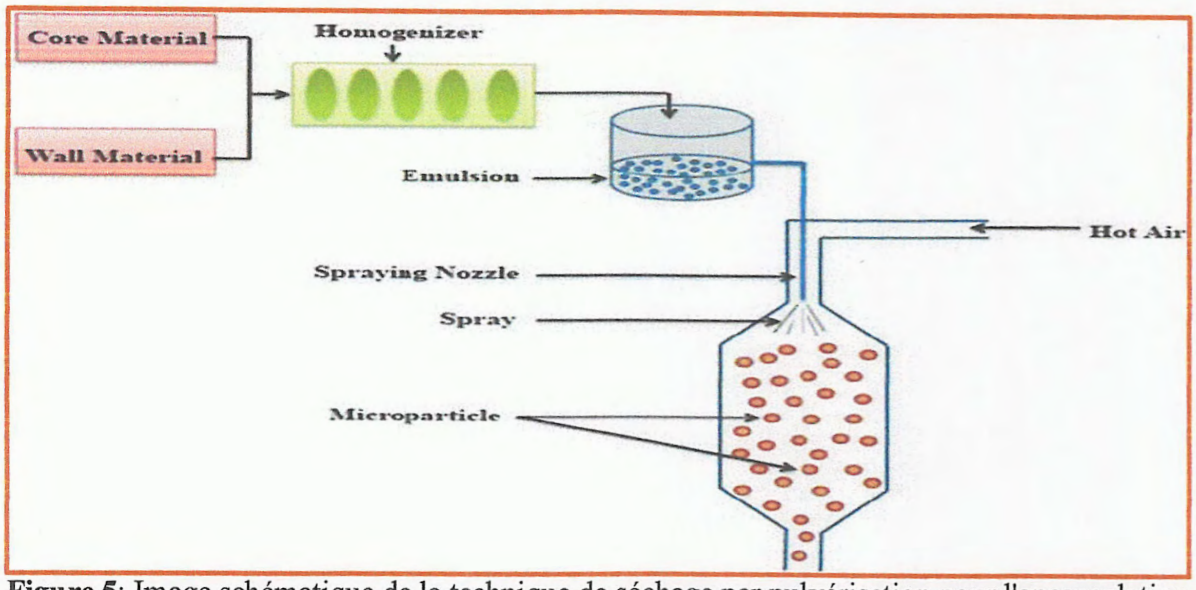

Figure 5: Image schématique de la technique de séchage par pulvérisation pour l'encapsulation **(Bakry et al., 2016).**

II.3.4. Coacervation

C'est une technique qui consiste la séparation en deux phases de certaines solutions colloïdales. L'une des phases, est riche en polymère (coacervat) et une phase pauvre en polymère (phase d'équilibre) **(Wang et *al.*, 2018).**

II.3.5. Revêtement sur lit fluidisé

Cette technologie implique l'utilisation d'un revêtement en lit fluidisé de particules solides **(Mehta et *al.*, 2022)**. Dans cette méthode, les particules contenant la charge utile sont fluidisées, et le matériau de revêtement est pulvérisé sur elles à haute vitesse, formant une couche d'enveloppe qui est séchée par des méthodes d'évaporation de solvant ou de cristallisation **(Ozdel et *al.*, 2020).**

II.3.6. Lyophilisation (Freeze-Drying)

La lyophilisation a été utilisée pour préserver les starters et les bactéries probiotiques **(Obradović et *al.*, 2022).** Le principe est basé sur la sublimation, où les cellules sont d'abord congelées à très basse température puis séchées pour éliminer la glace par sublimation sous vide poussé, et enfin un séchage secondaire pour éliminer l'eau non gelée par désorption **(Fonseca et *al.*, 2021).**

II.4. Facteurs influençant l'efficacité d'encapsulation

La sélection de la technique d'encapsulation, du matériau de la paroi et les paramètres de traitement sont responsables de l'efficacité de l'encapsulation **(Chaudhary et Patel, 2019 ; Mohite et Waghmare, 2020).** Les différents facteurs affectant l'encapsulation sont : la concentration initiale de cellules microbiennes, la modification des matériaux de la capsule, l'enrobage des capsules, les conditions environnementaux et les conditions des facteurs de traitement et la concentration de la solution polymère et le diamètre des billes **(Solanki et *al.*, 2013 ; Lakkis , 2016).**

II.5. Les avantages de l'encapsulation

Les principaux avantages de l'encapsulation peuvent être résumés comme suite **(Mortazavian et *al.*, 2007 ; Fortin, 2011 ; Niño Vásquez et *al.*, 2022)** :

- Elle augmente la viabilité des probiotiques dans les produits jusqu'à consommation et aussi lorsqu'ils sont exposés aux conditions acides, enzymatiques et biliaires du TGI.
- Elle libère le composé actif de manière contrôlée et dans les endroits souhaités.
- Technique efficace pour masquer les goûts et les odeurs désagréables du composé actif ou des matériaux d'encapsulation par la combinaison de différents matériaux d'encapsulation.

III. Co-encapsulation des Bactéries probiotiques

III.1. Concept de base

La co-encapsulation est une technique qui a les mêmes principes de base que l'encapsulation, mais elle a un avantage par rapport à celle-ci. Elle permet la génération de microcapsules avec une durée de conservation plus longue. Elle combine également deux composés actifs ou plus qui réalisent une synergie les uns avec les autres **(Raddatz et Menezes, 2021 ; Niño Vásquez et *al.*, 2022).**

III.2. Exemples sur la co-encapsulation

La principale combinaison étudiée par la plupart des chercheurs est celle des probiotiques avec l'un des autres composés actifs qui visent à améliorer leurs avantages, notamment les suivants :

- La co-encapsulation des probiotiques avec des prébiotiques a été pratiquée comme une nouvelle approche alternative par **(Rashidinejad et *al.*, 2022)** pour améliorer encore

l'administration orale de probiotiques viables vers leur libération ciblée dans l'intestin de l'hôte.

- L'étude de **(Silva et *al.*, 2022)** concentrée sur la co-encapsulation de probiotiques et l'extraits de guarana -un fruit amazonien contenant de la caféine et des composés phénoliques- pour réduire le stress oxydatif des cellules et prolonger leur viabilité dans des conditions de stress.
- Les probiotiques et les myrtilles -un fruit riche en composés phénoliques- ont été co-encapsulés par **(Neuenfeldt et *al.*, 2022)** pour prolonger leur durée de conservation tout en préservant leurs propriétés bioactives et en favorisant leur libération dans le corps humain.

III.3. Propolis

III.3.1. Propriétés générales

Le mot propolis est d'origine grec qui signifie la défense de la ville **(Abdullahi et *al.*, 2020; Stojanović et *al.*, 2020).** C'est un mélange de substances utilisées par les abeilles pour défendre la ruche **(Przybyłek et *al.*, 2019).** Elle peut varier d'un endroit à l'autre en raison des différences géographiques et des espèces d'abeilles **(Abdullahi et *al.*, 2020; Almuhayawi, 2020).** La propolis a une composition chimique différente, mais elle présente des activités similaires telles que les activités antibactériennes, antifongiques, antivirales, antiparasitaires, anti-inflammatoires, antiprolifératives et antioxydantes **(Przybyłek et *al.*, 2019).**

III.3.2. Exemples sur la co-encapsulation des probiotiques avec l'extrait de propolis

La co-encapsulation d'extrait sans cellules (CFS) obtenu à partir de *Lactobacillus reuteri* avec de l'eau de propolis et des extraits éthanoliques (1% de CFS), pour étudier leurs activités antibactériennes améliorées contre quatre bactéries de détérioration des poissons (*Pseudomonas luteola, Enterobacter cloacae, Photobacterium damselae* et *Proteus mirabilis*) a été reporté dans l'étude de **Ucar (2022).** où il a observé que l'utilisation combinée d'extraits de propolis, en particulier d'extrait éthanolique avec CFS obtenu à partir de *L. reuteri* en microencapsulation, a généralement montré un effet antimicrobien plus élevé sur toutes les bactéries testées.

D'autres expériences de **Kuley et *al.* (2021),** ont montré que la co-microencapsulation de surnageant sans cellules obtenue à partir de *L. plantarum* avec de l'extrait éthanolique de propolis, pourrait être potentiellement utilisée comme agent antimicrobien pour surmonter la croissance microbienne dans les aliments.

Étude Expérimentale

Etude expérimentale

L'intégralité de ce travail a été réalisée au niveau de Laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, Mohamed Seddik Benyahia, durant la période de Avril - Juin 2022.

I. Matériel

I.1.Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé pour effectuer ce travail est le suivant :

- **Souche bactérienne étudiée :** Une souche de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 fournie par le Laboratoire de Toxicologie Moléculaire (LTM).
- **Souches cibles :** Trois souches bactériennes ont été utilisées durant le test de l'activité antibactérienne : *Escherichia coli* ATCC 25922 (CHU, Constantine, Algérie), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé, Université de Jijel, Algérie).
- **Composé Bioactif :** Extrait éthanolique de la propolis de la région de Kaous (Laboratoire LTM, Université de Jijel, Algérie).

I.2. Milieux de cultures

Deux milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale. Il s'agit des milieux : Gélose et bouillon MRS (Man-Rogosa-Sharp) et le bouillon nutritif.

I.3. Tampons

PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7,0 (Annexe 1), tampon phosphate pH 7,0 (1M, K_2HPO_4, KH_2PO4), $CaCl_2$ (chlorure de calcium : 0,05M), eau physiologique stérile (0,9 % NaCl).

I.4. Produits et Réactifs

Violet de gentiane, fushine, lugol, alcool, l'huile à immersion, NaOH (hydroxyde de sodium 1N), HCl (l'acide chlorhydrique), alginate de sodium, sels biliaires, éthanol, NaCl (chlorure de sodium), KCl (chlorure de potassium), KH_2PO_4 (phosphate de monopotassium), Na_2HPO_4 (phosphate de sodium dibasique), Eau distillé stérile.

I.5. Equipements et Appareillages

Vortex (VWR, VV3 S40), Centrifugeuse à microtubes (sigma Laborzentrifugen 1-14K), balance de précision (Denvar), balance analytique (Kern ALS 220.4N), bain-marie (Memmert), microscope optique (Paralux), pH mètre à affichage numérique (Hanna instrumment), autoclave (PbiBrand), étuve (Memmert), incubateur (Memmert), incubateur à agitation (ecotron infoRS HT), pied à coulisse numérique, spectrophotomètre (Specord50Plus, Analytikjena), compteur de colonies (Funke Gerber), agitateur magnétique.

II. Méthodes

II.1. Revivification de la souche

La souche *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 a été mise en culture par repiquage dans le bouillon MRS et incubée à 37 °C pendant 24 h. Après croissance, un ensemencement par stries a été effectué à la surface d'une gélose MRS préalablement coulée et solidifiée. La pureté de la souche a été vérifiée après incubation à 37 °C pendant 24 h par observation macroscopique (des colonies de même aspect, de même couleur et de même taille) et microscopique (coloration de Gram). De plus, la capacité de la souche à produire de la catalase a été vérifiée.

II.2. Préparation de la souche pour l'encapsulation

La méthode décrite par **Amira et *al.* (2021)** a été adoptée avec quelques modifications. La souche *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 a été cultivée dans du bouillon MRS à 37 °C pendant 18 h. Les cellules ont ensuite été récoltées par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 minutes. Après centrifugation, les culots ont été lavés deux fois avec une solution du PBS. Les culots ont été remis en suspension dans du PBS (suspension mère). La densité optique de cette dernière a été mesurée à 620nm.

À partir de la suspension mère, une série des dilutions décimales a été effectuée. 100µl des dilutions appropriées ont été ensemencés par étalement sur des géloses MRS. Après incubation à 37 °C pendant 48 h, les colonies ont été dénombrées pour déterminer la charge initiale de la suspension mère.

II.3. L'encapsulation de la souche dans l'alginate de sodium à 2%

Les billes d'alginate contenant les cellules bactériennes ont été préparées selon la méthode décrite par **Amira et *al.* (2021) (Figure 6)**. 45 ml d'alginate de sodium à 2% ont été préparés et stérilisés à l'autoclave (121 °C pendant 15min). L'alginate stérile a été mélangé avec 5 ml de la suspension cellulaire déjà préparée et homogénéiser aseptiquement. Le mélange a été introduit dans une seringue stérile (2,5 ml), La pression manuelle exercée sur le piston de la seringue permettait de faire tomber le contenu de la seringue goutte à goutte dans une solution de coagulation de $CaCl_2$ à 0,05 M préalablement autoclavée et refroidie. Les billes formées ont ensuite été laissées pendant une heure sous agitation douce pour compléter l'ionisation échanger Na^{+}, Ca^{2+}. Après, les billes ont été retirées de la phase aqueuse et lavées deux fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer le chlorure de calcium non lié de la surface des billes. Enfin les billes (l'encapsulât) ont été filtrées puis conservées sur un sérum physiologique à 4 ° C pour une utilisation ultérieure.

Le diamètre et le poids moyens de 5 billes d'alginate ont été déterminés à l'aide d'un pied à coulisse numérique et d'une balance analytique, respectivement.

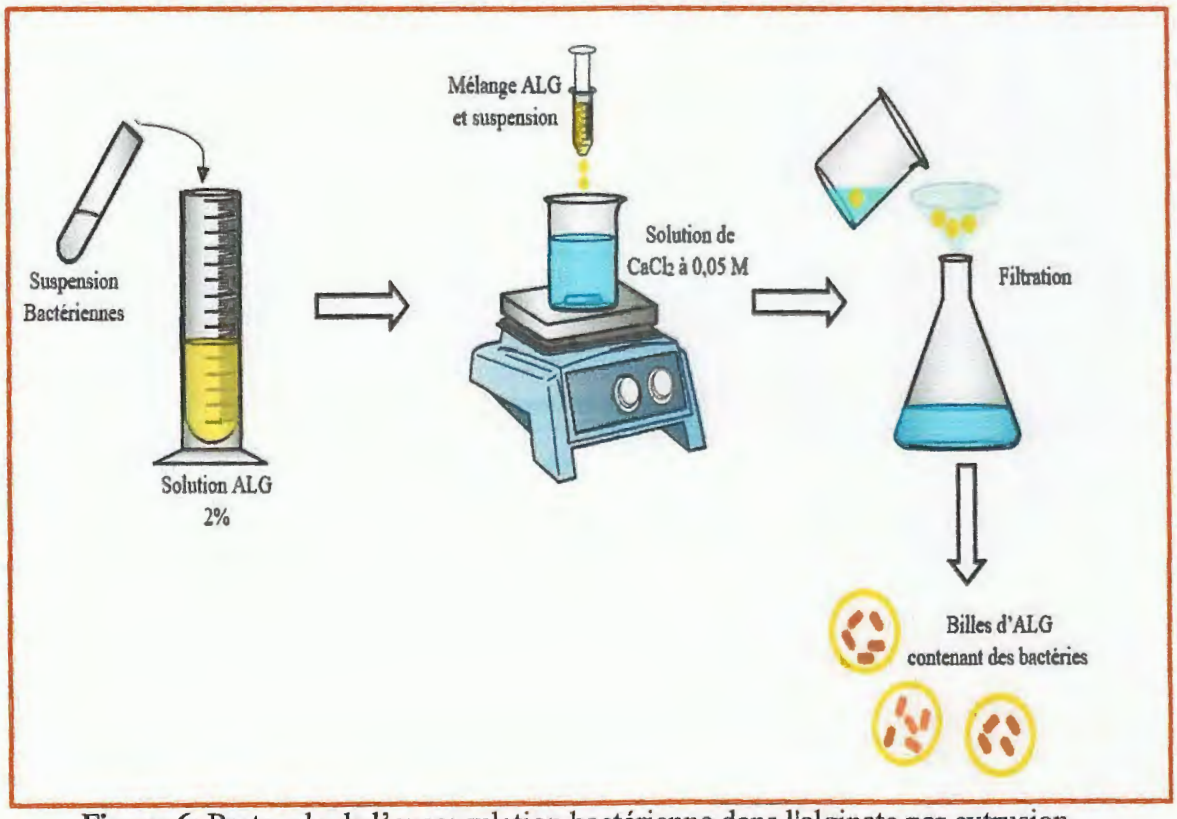

Figure 6: Protocole de l'encapsulation bactérienne dans l'alginate par extrusion.

II.3.1. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1

Cette partie consiste à évaluer la tolérance de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 *in vitro* aux conditions similaires à celles du transit digestif (acidité et sels biliaires).

II.3.1.1. Tolérance aux acides

La capacité de la souche (encapsulée et libre) à survivre dans le milieu acide a été étudiée en se référant à la méthode décrite par **Bosnea et *al.* (2014)**. Brièvement, 1 ml de la suspension mère mentionnée ci-dessus (cellules libres) et 50 billes des bactéries encapsulées (cellules immobilisées) ont été mis en suspension dans 9 ml de PBS ajusté par le HCl à pH 2,0 et pH 7,0. Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 2 h.

Les bactéries ont été libérées des capsules par séquestration des ions calcium dans le tampon phosphate 1M (pH 7,0) selon la méthode décrite par **Ouled-Haddar et *al.* (2016)**. La résistance de la bactérie à ce facteur hostile a été estimée par la lecture de la densité optique à 620nm.

Le pourcentage de survie a été calculé par la comparaison des valeurs de la DO de la culture dans le PBS à différents pH : **(Castro-Rosas et *al.*,2021).**

% de survie = (DO PBS pH 2 / DO PBS pH 7) × 100

II.3.1.2. Tolérance aux sels biliaires

La capacité de la souche (encapsulée et libre) à survivre dans la bile a été étudiée en se référant à la méthode décrite par **Pupa et *al.* (2021)**. Brièvement, 1 ml de la suspension de cellules libres et 50 billes des cellules encapsulées ont été mis en suspension dans 9 ml de PBS additionné à 0.3% de sels biliaires. Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 4 h. Un témoin négatif a été préparé dans les mêmes conditions pour les deux échantillons (cellules encapsulées et cellules libres).

Les bactéries ont été libérées des capsules par séquestration des ions calcium dans le tampon phosphate 1M (pH 7) selon la méthode décrite par **Ouled-Haddar et *al.* (2016).** Le taux de survie a été déterminé par la mesure de la DO à 620nm, en comparant les valeurs de la DO de la culture en présence et en absence de sels biliaires. Il a été calculé comme suit :**(Castro-Rosas et *al.*,2021).**

% de survie = (DO sels biliaires/DO témoin) ×100

II.4. Co-encapsulation de la souche bactérienne avec l'extrait éthanolique de la propolis

II.4.1. Extrait éthanolique de la propolis

L'extrait éthanolique de la propolis (EEP) préparé par la méthode de **Vică et *al.* (2022)** a été fourni par le laboratoire LTM. L'extrait a été filtré à l'aide d'un microfiltre de 0,22µm et il a ensuite subi plusieurs dilutions au 1/2 jusqu'à une concentration de 0,25 µg/ml.

II.4.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrices de la propolis (CMI)

La sensibilité de la souche O_7S_1 vis-à-vis l'extrait de propolis a été déterminée selon la méthode de **Vică et *al.* (2021)**.

En résumé, des géloses MRS préalablement coulées et solidifiées ont été inoculées par une culture jeune de la souche O_7S_1 à l'aide d'écouvillons stériles. Un étalement a été réalisé, ensuite les disques de papier filtre de 6mm de diamètre ont été déposés à la surface à l'aide d'une pince stérile. 10 µl de chaque dilution ont été déposés sur les disques. Après séchage, les boites ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. L'évaluation finale de la sensibilité a été faite en quantifiant (en mm) les zones d'inhibition obtenues. Un disque imbibé d'éthanol a constitué le témoin négatif.

II.4.3. Procédé de la co-encapsulation

Comme précédemment décrit, 45ml d'alginate stérile ont été mélangés avec 4ml de la suspension cellulaire déjà préparée et 1ml de la dilution de l'EEP qui est en dessous de celle qui correspond à la CMI. Pour le témoin, l'EEP a été remplacé par 1ml d'eau distillée stérile. La suite des étapes est comme mentionnée dans la section **II.3.**

II.4.4. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques de la souche co-encapsulée à la propolis

Cette partie consiste à évaluer la tolérance de la souche *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 co-encapsulée avec la propolis *in vitro* aux conditions similaires à celles du tractus digestif (acidité, sels biliaires).

II.4.4.1. Tolérance aux acides

L'étude de la résistance de la souche aux conditions acides a été réalisée par les mêmes étapes précédemment décrites dans la section **II.3.1.1.** à deux détails près : 50 billes des cellules encapsulées et 50 billes des cellules co-encapsulées avec l'EEP ont été mises en suspension dans 9 ml de PBS déjà ajusté à pH 2,0 et pH 7,0.

II.4.4.2. Tolérance aux sels biliaires

L'étude de la tolérance aux sels biliaires a été réalisée par les mêmes étapes précédemment décrites dans la section **II.3.1.2.** à deux détails près : 50 billes des cellules encapsulées et 50 billes des cellules encapsulées avec l'EEP ont été mises en suspension dans 9 ml de PBS additionné à 0,3% de sels biliaires.

II.4.5. L'activité antibactérienne de la souche sur les bactéries pathogènes

L'activité antimicrobienne de cellules encapsulées et co-encapsulées avec l'EEP a été déterminée selon la méthode décrite par **Bartkiene et *al.* (2019)** avec quelques modifications. Les souches pathogènes sont les suivantes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Pour chaque souche pathogène, trois tubes ont été préparés comme suite : dans chaque tube ,1ml de la souche pathogène a été mis en suspension dans 9 ml de bouillon nutritif. Dans l'un des trois tubes nous avons ajouté 15 billes d'alginate avec l'EEP et dans l'autre 15 billes d'alginate sans l'EEP. Le tube témoin contenait la souche seule. Les DO ont été mesurées à 620nm après 24 h d'incubation sous agitation à 37 °C. L'expérience a été réalisée en deux répétitions.

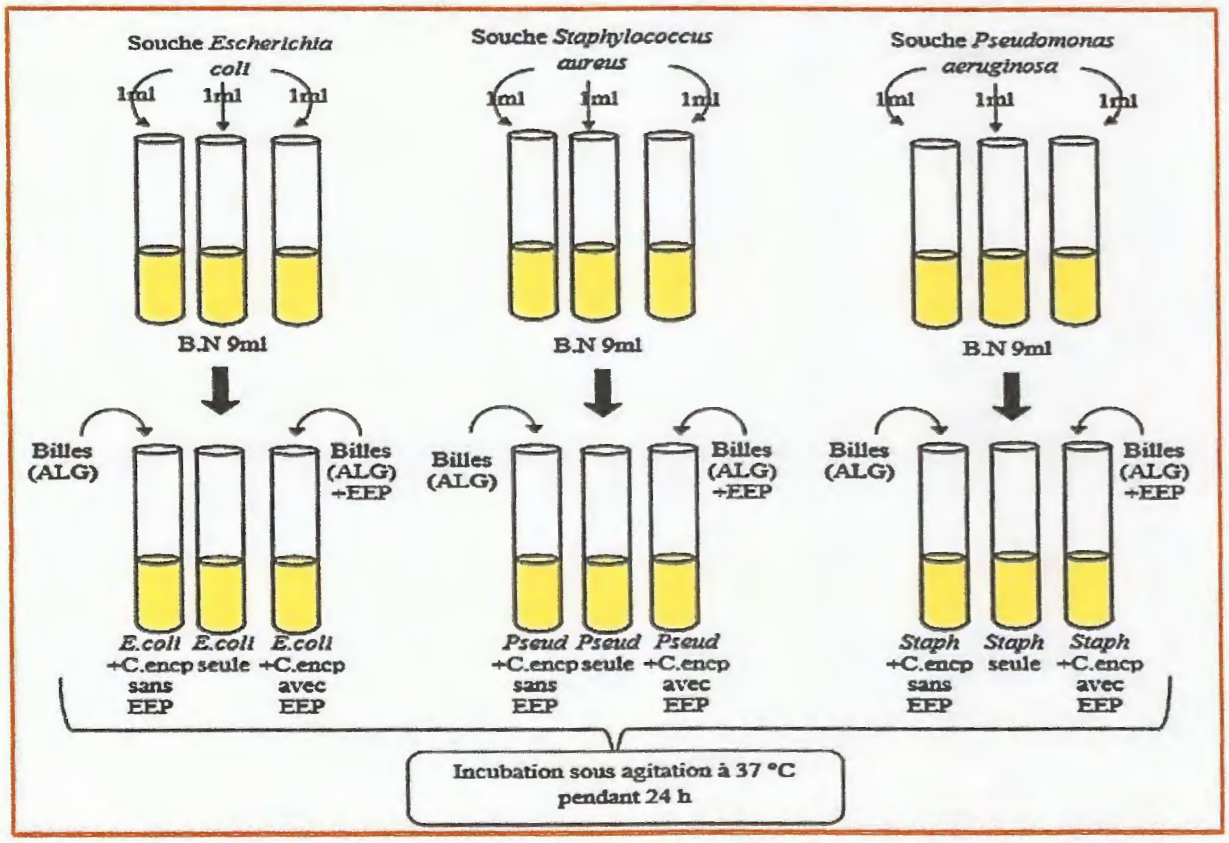

Figure 7. Protocole de l'activité antibactérienne des cellules encapsulées

Résultats

&

Discussions

III. Résultats et discussions

III.1. Vérification de la pureté de la souche

La souche *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 a donné sur gélose MRS de petites colonies blanchâtres et crémeuses ayant le même aspect, la même couleur et la même forme (**Figure8**). L'observation microscopique a révélé des cellules sous forme de bâtonnets violets à Gram positif.

Figure8: Aspect des colonies de *Lactiplantibacillius* sp. O_7S_1 sur la gélose MRS.

La charge initiale de l'inoculum obtenu après 24 h d'incubation à 37 °C a donné une moyenne de 3,19 x 10^8 UFC/ml correspondant à une densité optique de 0,8.

III.2. Caractéristiques des microcapsules

Les microcapsules préparées par la méthode d'extrusion avec de l'alginate à 2% avaient une structure sphérique **(Figure 9)** avec un poids moyen de 0,03 g et de taille moyenne d'environ 3,05 mm. Les billes sont influencées par le diamètre de l'aiguille et la viscosité de gel **(Dallabona et *al.*, 2020)**. Approximativement, 1ml de suspension bactérienne correspondait à 50 billes.

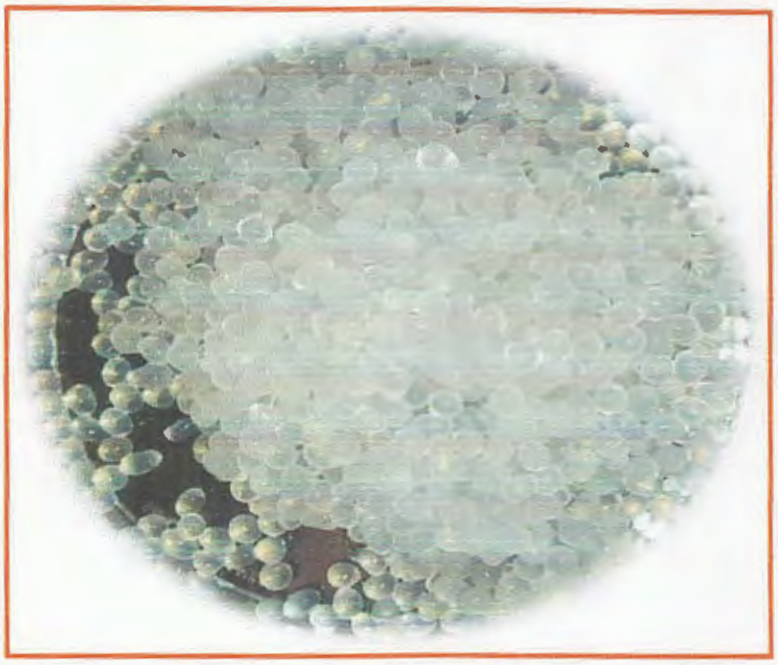

Figure 9: Aspect des billes de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 obtenus par la méthode d'extrusion.

III.3. Evaluation des quelques aptitudes probiotiques de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1

III.3.1. Tolérance aux acides

Le transit dans l'estomac prend entre 5 minutes et 2 heures et une exposition prolongée à un environnement acide est un énorme défi pour les probiotiques **(Han et *al.*, 2021).**

L'effet de l'acidité sur la viabilité de la bactérie libre et encapsulée a été testé à deux valeurs de pH (2,0 et 7,0). Les résultats présentés dans **la figure 10** ont démontré que le taux de survie des cellules de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 à l'état libre était de 53% après une exposition de 2 h aux conditions acides. D'autre part, le taux de survie des cellules encapsulées et soumises aux mêmes conditions était de 59%.

Malgré que le taux de survie a augmenté par environ 6%, on peut dire que l'encapsulation à l'aide d'alginate de sodium (2%) a améliorée la survie des cellules dans des conditions similaires à celles de l'estomac en comparant avec les cellules libres.

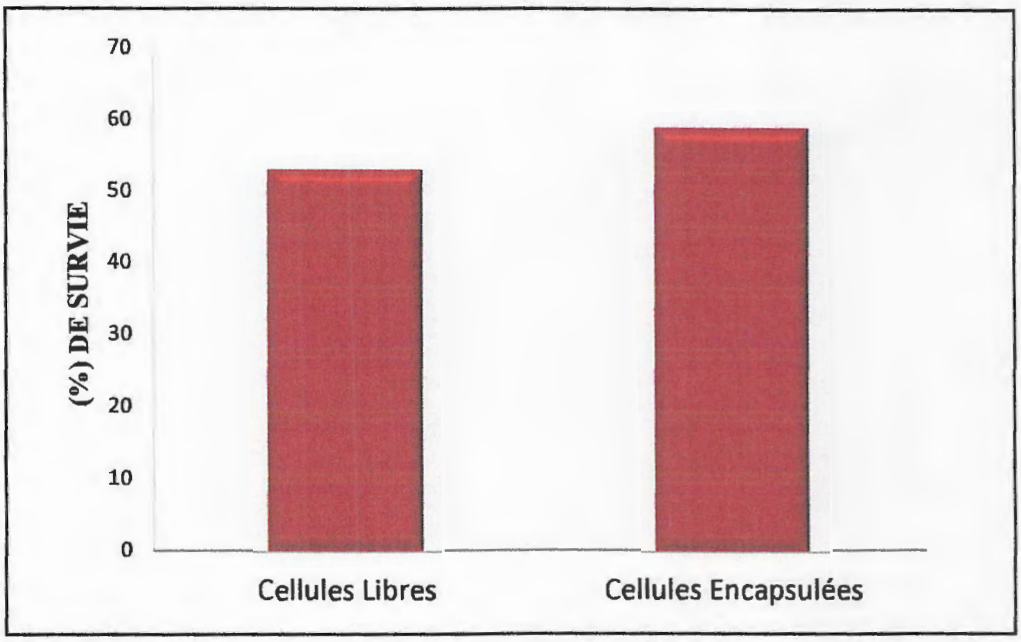

Figure 10: Effet de l'acidité sur la survie de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 libre et encapsulée dans l'alginate de sodium à 2%.

Nos résultats sont proches de ceux de **Amira et *al.* (2021)** réalisés sur *Lb. plantarum* et *Lb. casei* isolés de Klila (fromage traditionnel algérien) libres et encapsulées dans l'alginate de sodium à 2 % par la méthode d'extrusion et qui ont montré que les cellules de *Lb. casei* ont présenté une augmentation significative de taux de survie dans l'environnement acide (pH 2,0).

Des résultats similaires ont été obtenus par **Ouled-Haddar et *al.* (2012)** sur l'évaluation de la survie de *Lb. curvatus* G7 libre et encapsulée dans l'alginate de sodium à 1 % aux conditions acides (pH 2,0) après 2 heures d'incubation. Ils ont montré que la microencapsulation a amélioré la viabilité des cellules bactériennes par un taux de 9,27%.

De plus, **Malmo et *al.* (2021)** ont rapporté l'effet de l'encapsulation dans l'alginate par la technique d'émulsion sur la survie de la souche probiotique *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938 et de la souche non probiotique *Lactiplantibacillus plantarum* 48M dans des conditions gastro-intestinales simulées. D'autre part, **Sultana et *al.* (2000)** ont remarqué que l'encapsulation de bactéries dans des billes d'alginate ne protégeait pas efficacement l'organisme d'une acidité élevée.

III.3.2. Tolérance aux sels biliaires

Les sels biliaires sont l'une des barrières à surmonter par les bactéries probiotiques pour atteindre leur site d'action. Ils ont une forte activité antimicrobienne due à la dégradation des lipides membranaires **(Ouled-Haddar et *al.*, 2016).** Pour cette raison, la tolérance de la bactérie *Lactiplantibacilllus* sp. O_7S_1 aux sels biliaires a été évaluée.

Au reflet de **la figure 11**, nous remarquons que la souche *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 mise au test a un taux de survie de 61% et 75% pour les cellules libres et encapsulées, respectivement. Ce qui indique une bonne résistance aux sels biliaires pour les cellules encapsulées après un temps d'exposition de 4 heures à 0,3% de sels biliaires. En conséquence, une amélioration de la viabilité cellulaire d'environ 14% a été obtenue en utilisant l'encapsulation dans l'alginate de sodium.

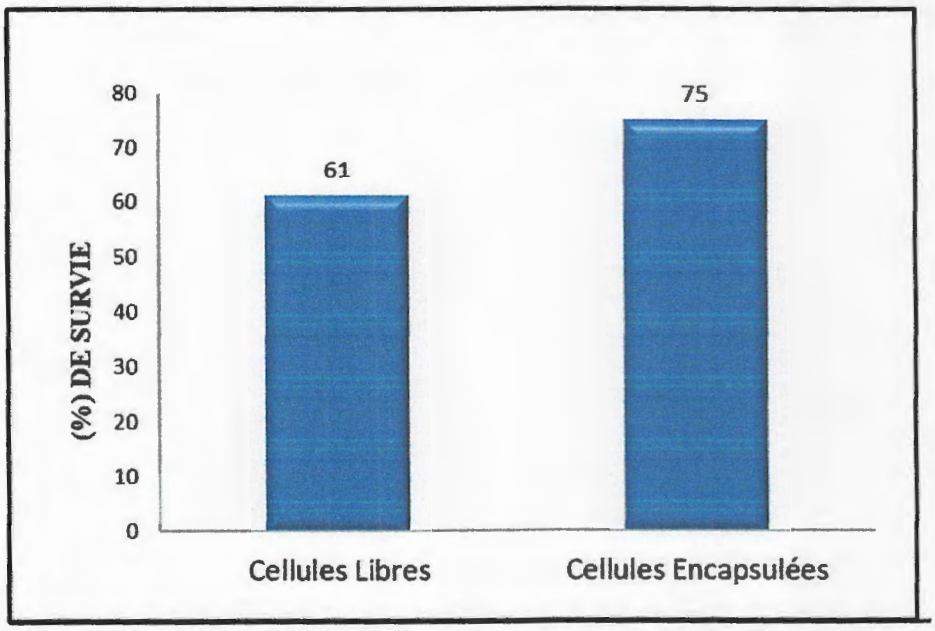

Figure 11: Survie de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 libre et encapsulée dans 2% de l'alginate de sodium incubé à 0,3% de sels biliaires.

Plusieurs études ont rapporté l'amélioration de la viabilité cellulaire des bactéries par la microencapsulation lorsqu'elles sont exposées aux sels biliaires. On peut citer l'étude réalisée par **Ding et shah (2007)** sur la microencapsulation par extrusion de huit souches de bactéries probiotiques, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. lactis* type Bl-O4, et *B. lactis* type Bi-07 dans l'alginate de sodium

III.4.2. Caractéristiques des billes encapsulées et co-encapsulées avec EEP

L'observation à l'œil nu montre que les microcapsules (billes) obtenues par la méthode d'extrusion des cellules encapsulées seuls et co-encapsulées avec l'EEP ont des structures sphériques **(Figure 13),** de taille d'environ 3,02 et 3 mm de diamètre, et 0,028 et 0,026g de poids, respectivement.

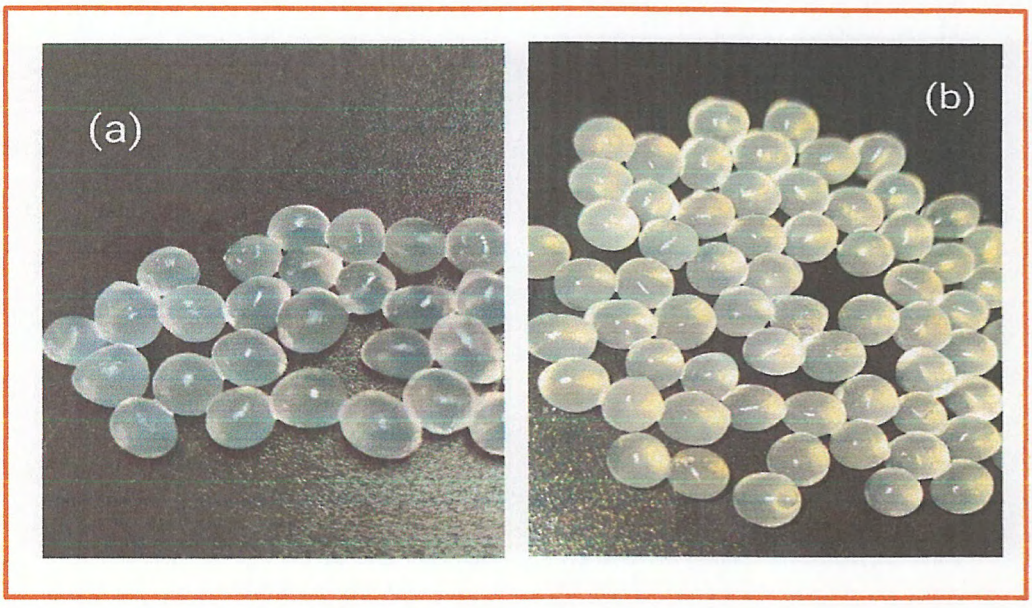

Figure13 : Aspect des billes *de Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 obtenus par la méthode d'extrusion. **(a) :** cellules encapsulées dans 2% d'alginate **(b) :** cellules encapsulées dans 2% de l'alginate et de l'EEP.

III.5. Evaluation des quelques aptitudes probiotiques de la souche co-encapsulée

III.5.1. Tolérance aux acides

Un test de tolérance au pH bas est essentiel pour prédire la survie des bactéries dans l'environnement de l'estomac. Les résultats de la résistance de la souche *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 à l'acidité simulée à celle de l'estomac sur des milieux à pH 2,0 et pH 7,0 après 2 heures d'incubation sont présentés sur la **Figure 14.**

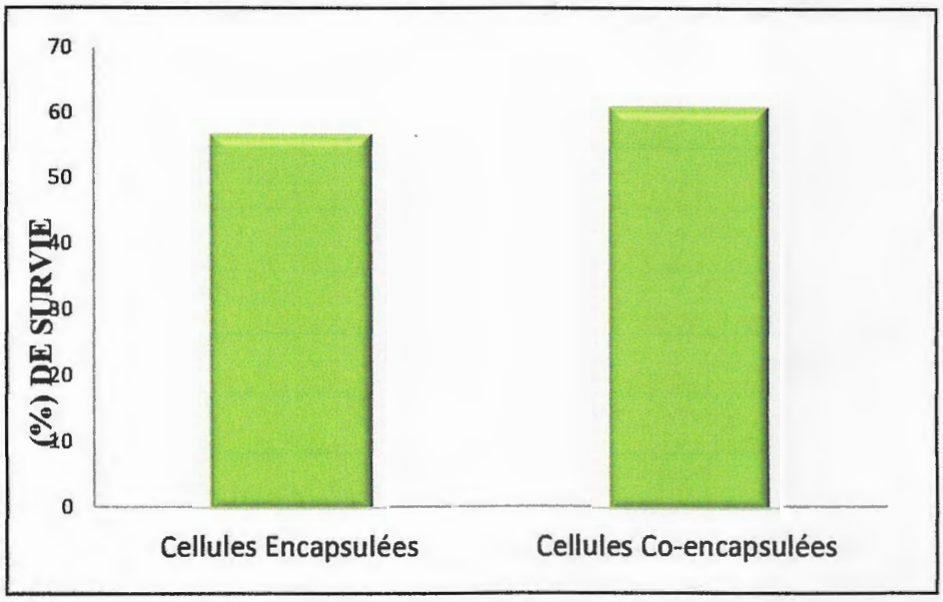

Figure 14: Effet de l'acidité sur la survie de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 encapsulée et co-encapsulée dans l'alginate de sodium à 2%.

D'après les résultats présentés par la **figure14**, le meilleur pourcentage de survie aux conditions acides est observé avec les cellules co-encapsulées où le taux de survie est de 61%. En revanche, les cellules encapsulées marquent une viabilité d'environ de 56,7%. Nous remarquons que la survie et la viabilité de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 co-encapsulée (en présence de l'EEP) après l'exposition aux pH bas pendant 2 heures est légèrement améliorée par rapport à celles qui ont été encapsulées (sans EEP). On peut dire que l'EEP n'a pas d'effet sur la survie des cellules bactériennes. La co-encapsulation à permet de préserver la cellule bactérienne.

III.5.2. Tolérance aux sels biliaires

La survie des bactéries à potentiel probiotique dans l'intestin est déterminée par la tolérance aux sels biliaires, qui est un élément crucial. La membrane cellulaire des bactéries qui envahissent l'estomac est endommagée par les sels biliaires dans le tractus intestinal. Un taux de 0,05 à 0,3 % de bile peut être toléré par les probiotiques **(Hassan et *al.*, 2020).**

L'effet des sels biliaires sur la souche testée est représenté dans **la figure 15**. Conformément aux résultats, la survie des cellules encapsulées de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 seules était de 76%, après 4 heures d'incubation dans un milieu simulant les conditions du duodénum à une concentration de 0,3% de sels biliaires. Tandis que les cellules co-encapsulées dans les mêmes conditions avaient une viabilité de 79%. Ces résultats indiquent que la co-encapsulation à l'aide

d'alginate de sodium (2%) améliore légèrement la tolérance de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 aux sels biliaires.

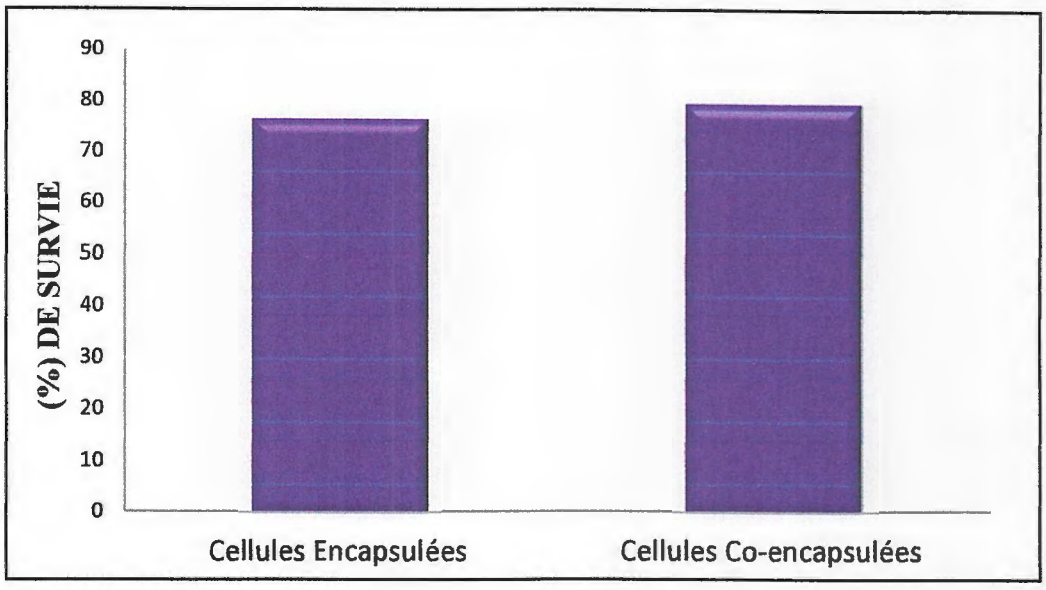

Figure 15: Survie de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 encapsulée et co-encapsulée dans l'alginate de sodium incubé à 0,3% de sels biliaires.

D'après nos recherches aucun travail n'a été trouvé concernant l'effet de la co-encapsulation des bactéries lactiques avec l'extrait de la propolis, probablement à cause de son effet bactéricide, mais il existe de nombreuses études sur l'encapsulation des bactéries lactiques avec d'autres extraits. A titre exemple, l'expérience de **Neuenfeldt et *al.* (2022)** qui consiste à co-encapsuler une bactérie *Lb. rhamnosus* avec l'extrait de myrtille a montré que l'ajout de l'extrait améliore la viabilité des microcapsules et donne une protection lors du passage dans le liquide gastrique beaucoup plus que la bactérie encapsulée seule. Dans ce cas, la co-encapsulation de l'extrait de myrtille a fourni des effets positifs sur la survie de *Lb. rhamnosus* et démontre son application prometteuse dans l'alimentation.

Une autre étude menée par **Vodnar et *al.* (2012)** a démonté que la microencapsulation de l'extrait de thé vert avec des bactéries améliore considérablement la survie bactérienne lors d'une exposition à des conditions gastro-intestinales. Le taux de survie des bactéries dans les capsules sans l'ajout de l'extrait de thé vert était inférieur à celui des capsules contenant 5% et 10% de l'extrait. De plus, le taux de survie a augmenté proportionnellement à la concentration de l'extrait additionné.

Par ailleurs, **Pop el *al.* (2017)** ont montré que la viabilité des cellules probiotiques après 2 h dans le milieu acide du TGI était 15 fois plus élevée dans les échantillons dans lesquels *Lb. casei* était

encapsulé avec de l'extrait d'argousier que dans les échantillons auxquels aucun extrait n' a été ajouté.

La microencapsulation combine deux composés actifs ou plus qui réalisent une synergie les uns avec les autres **(Raddatz et Menezes, 2021 ; Niño Vásquez et *al.*, 2022).** Donc, nos résultats accréditent l'idée que la combinaison des bactéries lactiques (*Lactiplantibacillus*) avec des extraits pouvait représenter une stratégie pour améliorer la tolérance aux conditions de stress.

III.6. L'activité antimicrobienne de la souche sur les bactéries pathogènes

Afin de déterminer l'interaction de la souche bactérienne *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 et de l'EEP, l'activité antibactérienne de la souche encapsulée en présence et en absence de EEP contre certaines bactéries de références a été évaluée. Les résultats obtenus sont affichés dans le **tableau3.**

Tableau 3 : Activité antibactérienne de la souche *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 encapsulée ou co-encapsulées sur les souches de références.

Souche	DO (620nm) *		
	Témoin	**Cellules encapsulées**	**Cellules Co-encapsulées**
E. coli ATCC 25922	0,901	0,648	0,611
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	0,927	0,830	0,791
Staphylococcus aureus ATCC 25923	0,967	0,908	0,894

*** Les résultats représentent la moyenne de deux lectures.**

Ces résultats montrent qu'il y a une inhibition de la prolifération des souches testées (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923). Il est clair que la souche encapsulée seule présente une faible action inhibitrice par rapport à celle qui est co-encapsulée. Ces résultats montrent aussi que *E. coli* ATCC 25922 était la souche la plus sensible aux agents antimicrobiens produits par les cellules encapsulées. En revanche, toutes les bactéries testées sont plus sensibles lorsque l'extrait éthanolique de propolis était présent.

En conséquence, la co-encapsulation de bactéries avec EEP avait plus d'effet antagoniste contre les bactéries testées, cela peut être dû au fait que le mélange encapsulé comprenait plus des composés antimicrobiens (agent d'origine bactérien et l'effet antibactérien de la propolis). Il est rapporté que la propolis exerce un effet antimicrobien important **(Przybyłek et *al.*, 2019)**. De plus, l'un des traits de sélection d'une bactérie probiotique est sa capacité à inhiber les bactéries pathogènes **(Piatek et *al.*, 2020).**

Cependant, et à notre connaissance aucune étude n'a été publiée comparant l'effets inhibiteurs de cellules encapsulées ou les cellules co-encapsulées en milieu liquide. Cependant, des résultats similaires ont été rapportés par **Ucar (2022)**, qui a étudié l'effet inhibiteur du surnageant de *Lb. reuteri* combiné avec EEP sur des bactéries de détérioration des poissons. D'autre part, **Kuley et *al.* (2021)** ont montré que l'activité antibactérienne de la propolis ainsi que ses constituants phénoliques et les flavonoïdes étaient protégés par la méthode d'encapsulation.

En conséquence, la co-encapsulation des bactéries (*Lactiplantibacillus*) avec l'EEP pouvait représenter une stratégie pour améliorer l'activité antagoniste, particulièrement lors de l'utilisation des bactéries lactiques dans les produits alimentaires.

Conclusion

Conclusion

Notre étude expérimentale a été menée sur la capacité d'une bactérie lactique *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 libre et encapsulée dans l'alginate de sodium à 2% à survivre à des conditions similaires à celles du tractus digestif. La survie de cette souche encapsulée et co-encapsulée avec l'extrait éthanolique de la propolis a également été évaluée après son exposition aux mêmes conditions.

Notre souche libre a une tolérance vis-à-vis des conditions gastro-intestinales. La micro-encapsulation par l'alginate de sodium à 2% a exercé un effet bénéfique en améliorant la résistance de la souche *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 dans les conditions simulées du tractus gastro-intestinal et particulièrement les sels biliaires. La co-encapsulation avec l'extrait éthanolique de propolis a un effet relativement élevé que l'encapsulation de la souche seule vis-à-vis de la résistance aux conditions de stress (acidité et sels biliaires).

De plus, la souche bactérienne et l'extrait éthanolique de la propolis co-encapsulés ont présenté une activité antagoniste meilleure que la souche encapsulée seule vis-à-vis les souches testées, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 et *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Pour compléter ce travail, d'autres recherches sont nécessaires pour mener à bien cette étude telles que :

- L'étude de l'effet de différentes concentrations de l'extrait de la propolis.
- L'utilisation de différents polymères pour la co-encapsulation et l'effet d'une matrice alimentaire sur les microcapsules.
- L'étude de l'effet du stockage pour une longue durée et l'effet de la température.

Références

de Souza Motta, A., & Gomes, M. D. S. M. (2015). Technological and functional properties of lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food. Rev. do Inst. *Laticinios Candido Tostes*, *70*, 172-184.

Dinçer, E., & Kıvanç, M. (2018). Lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Turkish pastırma. *Anadolu University Journal of Science and Technology C-Life Sciences and Biotechnology*, *7*(1), 12-19.

Ding, W. K., & Shah, N. P. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of food science*, *72*(9), M446-M450.

E

Evivie, S. E., Huo, G. C., Igene, J. O., & Bian, X. (2017). Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food & Nutrition Research,* 61(1), 1318034.

F

FAO/WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada.

Fonseca, F., Girardeau, A., & Passot, S. (2021). Freeze-drying of lactic acid bacteria: a stepwise approach for developing a freeze-drying protocol based on physical properties. *In Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (pp. 703-719).

Fortin, M. H. (2011). Stratégies technologiques utilisées pour améliorer la viabilité et la rétention de bactéries probiotiques dans le fromage cheddar frais (Doctoral dissertation, Université du Québec, *Institut National de la Recherche Scientifique*).

G

Garcia, M. A. V. T., Garcia, C. F., & Faraco, A. A. G. (2020). Pharmaceutical and biomedical applications of native and modified starch: A review. *Starch-Stärke*, 72(7-8), 1900270.

Gharibzahedi, S. M. T., & Smith, B. (2021). Legume proteins are smart carriers to encapsulate hydrophilic and hydrophobic bioactive compounds and probiotic bacteria: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1250-1279.

Gupta, R., Jeevaratnam, K., & Fatima, A. (2018). Lactic acid bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health: A review. *International Journal of Emerging Technologies and Innovative Research,* 5(10), 411-424.

H

Han, S., Lu, Y., Xie, J., Fei, Y., Zheng, G., Wang, Z., ... & Li, L. (2021). Probiotic gastrointestinal transit and colonization after oral administration: A long journey. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 609722.

Hassan, M. U., Nayab, H., Shafique, F., Williamson, M. P., Almansouri, T. S., Asim, N., ... & Akbar, N. (2020). Probiotic properties of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum* isolated from traditional Pakistani yoghurt. *BioMed Research International, 2020.*

I

Ilha, E. C., Da Silva, T., Lorenz, J. G., de Oliveira Rocha, G., & Sant'Anna, E. S. (2015). *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. *European Food Research and Technology,* 240(5), 977-984.

J

Juwana, A., Seno, BA et Hartayanie, L. (2020). Identification du *lactobacille* potentiel probiotique de Mandai à l'aide de la technique moléculaire. *Digital Press Life Sciences, 2,* 00001.

K

Kavitake, D., Kandasamy, S., Devi, P. B., & Shetty, P. H. (2018). Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods–A review. *Food Bioscience,* 21, 34-44.

Kazi, T. A., Acharya, A., Mukhopadhyay, B. C., Mandal, S., Arukha, A. P., Nayak, S., & Biswas, S. R. (2022). Plasmid-based gene expression systems for lactic acid bacteria: A Review. *Microorganisms*, 10(6), 1132.

Kesen MA, Aiyegoro OA (2018) Beneficial characteristics and evaluation criteria of probiotics. *International Journal of Food and Bioscience* Vol: 1, Issu: 1 (19-26)

Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., & Kot, A. M. (2021). Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*, 26(7), 1858.

Kim, J., Muhammad, N., Jhun, B. H., & Yoo, J. W. (2016). Probiotic delivery systems: a brief overview. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 46(4), 377-386.

Kim, S. I., Kim, J. W., Kim, K. T., & Kang, C. H. (2021). Survivability of collagen-peptide microencapsulated lactic acid bacteria during storage and simulated gastrointestinal conditions. *Fermentation*, 7(3), 177.

Kowalska, E., Ziarno, M., Ekielski, A., & Żelaziński, T. (2022). Materials used for the microencapsulation of probiotic bacteria in the *Food Industry. Molecules*, 27(10), 3321.

Kuley, E., Kuscu, M. M., Durmus, M., & Ucar, Y. (2021). Inhibitory activity of Co-microencapsulation of cell free supernatant from *Lactobacillus plantarum* with propolis extracts towards fish spoilage bacteria. *Lebensmittel-Wissenschaft-Technollogie*, *146*, 111433.

L

Lakkis, J. M. (2016). Encapsulation and controlled release technologies in food systems. Second edition, *John Wiley & Sons, 408-411.*

Lee D. K., Park J. E., Kim K. T., Do1 M. J., Chung M. J., Lee G. S., Kim J. E., & Ha N. J. (2014). Stability Traits of Probiotics Isolated from Korean on Spices and Propolis. *Korean Journal of Microbiology*, 50 (3), 216-222.

Levit, R., Savoy de Giori, G., De Moreno De Leblanc, A., & LeBlanc, J. G. (2021). Recent update on lactic acid bacteria producing riboflavin and folates: application for food fortification and treatment of intestinal inflammation. *Journal of Applied Microbiology*, 130(5), 1412-1424.

Li, Q., Liu, X., Dong, M., Zhou, J., & Wang, Y. (2015). Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *International Journal of Agricultural Policy Research*, *3*(2), 84-92.

Liao, S. F., & Nyachoti, M. (2017). Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition*, *3*(4), 331-343.

M

Malmo, C., Giordano, I., & Mauriello, G. (2021). Effect of microencapsulation on survival at simulated gastrointestinal conditions and heat treatment of a non probiotic strain, *Lactiplantibacillus plantarum* 48M, and the probiotic strain *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938. *Foods,* 10(2), 217.

Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients,* 9(9), 1021.

Mehta, N., Kumar, P., Verma, A. K., Umaraw, P., Kumar, Y., Malav, O. P., ... & Lorenzo, J. M. (2022). Microencapsulation as a noble technique for the application of bioactive compounds in the food industry: a comprehensive review. *Applied Sciences*, 12(3), 1424.

Misra, S., Pandey, P., & Mishra, H. N. (2021). Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. *Trends in Food Science & Technology,* 109, 340-351.

Mohite D, Waghmare RB (2020) Encapsulation Techniques for Delivery of Bioactive Compounds in Milk and Dairy Products- A Review. *J Dairy Res Tech* 3: 017.

Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms.

Mureşan, A., Sârbu, I., Pelinescu, D., Ionescu, R., Csutak, O., Stoica, I., &Vassu-Dimov, T. (2017). In vitro selection of some lactic acid bacteria strains with probiotic potential. *Romanian Biotechnological Letters,* 23(4),1-14.

N

Naveena, B., & Nagaraju, M. (2020). Microencapsulation techniques and its application in food industry. *International Journal of Chemical Studies*, 8(1), 2560-2563.

Neuenfeldt, N. H., Farias, C. A. A., de Oliveira Mello, R., Robalo, S. S., Barin, J. S., da Silva, L. P., ... & de Menezes, C. R. (2022). Effects of blueberry extract co-microencapsulation on the survival of *Lactobacillus rhamnosus. Lebensmittel-Wissenschaft-Technollogie, 155*, 112886.

Niño-Vásquez, I. A., Muñiz-Márquez, D., Ascacio-Valdés, J. A., Contreras-Esquivel, J. C., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R., & Flores-Gallegos, A. C. (2022). Co-microencapsulation: a promising multi-approach technique for enhancement of functional properties. *Bioengineered,* 13(3), 5168-5189.

O

Obradović, N., Volić, M., Nedović, V., Rakin, M., & Bugarski, B. (2022). Microencapsulation of probiotic starter culture in protein–carbohydrate carriers using spray and freeze-drying processes: Implementation in whey-based beverages. *Journal of Food Engineering,* 321, 110948.

Ostadzadeh, M., Habibi Najafi, M. B., & Ehsani, M. R. (2022). Lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian butter with probiotic and cholesterol-lowering properties: In vitro and in situ activity. *Food Science & Nutrition*.

Ouled-Haddar, H., Idoui, T., Sifour, M., Guezira, M., & Bouthabet, M. (2012). Isolation, characterization and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus curvatus* G7 from chicken crop. *TOJSAT, 2*(1), 1-6.

Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Idoui, T., Bouridane, H., & Arid, S. (2016). *Lactobacillus plantarum G1* microencapsulation enhanced its viability during storage and gastrointestinal transit. *Sains Malaysiana*, 45, 1049-1055.

Ozdal, T., Yolci-Omeroglu, P., & Tamer, E. C. (2020). Role of encapsulation in functional beverages. *Biotechnological progress and beverage consumption* (pp. 195-232).

P

Pasolli, E., De Filippis, F., Mauriello, I. E., Cumbo, F., Walsh, A. M., Leech, J., ... & Ercolini, D. (2020). Large-scale genome-wide analysis links lactic acid bacteria from food with the gut microbiome. *Nature Communications,* 11(1), 1-12.

Piatek, J., Krauss, H., Ciechelska-Rybarczyk, A., Bernatek, M., Wojtyla-Buciora, P., & Sommermeyer, H. (2020). In-vitro growth inhibition of bacterial pathogens by probiotics and a synbiotic: product composition matters. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(9), 3332.

Pop, O. L., Dulf, F. V., Cuibus, L., Castro-Giráldez, M., Fito, P. J., Vodnar, D. C., ... & Suharoschi, R. (2017). Characterization of a sea buckthorn extract and its effect on free and encapsulated *Lactobacillus casei. International Journal of Molecular Sciences*, *18*(12), 2513.

Pradhan, Diwas; Mallappa, Rashmi H.; Grover, Sunita (2020). Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. *Food Control,* 108, 106872.

Przerwa, F., Kukowka, A., Kotrych, K., & Uzar, I. (2021). Probiotics in the treatment of gastrointestinal diseases. *Herba Polonica,* 67(2).

Przybyłek, I., & Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial properties of propolis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(11), 2047.

Pupa, P., Apiwatsiri, P., Sirichokchatchawan, W., Pirarat, N., Muangsin, N., Shah, A. A., & Prapasarakul, N. (2021). The efficacy of three double-microencapsulation methods for preservation of probiotic bacteria. *Scientific Reports*, 11(1), 1-9.

R

Raddatz, G. C., & Menezes, C. R. D. (2021). Microencapsulation and co-encapsulation of bioactive compounds for application in food: challenges and perspectives. *Ciência Rural*, 51.

Ramos, O. Y., Basualdo, M., Libonatti, C., & Vega, M. F. (2020). Current status and application of lactic acid bacteria in animal production systems with a focus on bacteria from honey bee colonies. *Journal of Applied Microbiology,* 128(5), 1248-1260.

Rashidinejad, A., Bahrami, A., Rehman, A., Rezaei, A., Babazadeh, A.,Singh, H., & Jafari, S. M. (2022). Co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their Application in functional/synbiotic dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(9), 2470-2494.

Raza, Z. A., Khalil, S., Ayub, A., & Banat, I. M. (2020). Recent developments in chitosan encapsulation of various active ingredients for multifunctional applications. *Carbohydrate Research*, 492, 108004.

Razavi, S., Janfaza, S., Tasnim, N., Gibson, D. L., & Hoorfar, M. (2021). Microencapsulating polymers for probiotics delivery systems: Preparation, characterization, and applications. *Food Hydrocolloids*, 120, 106882.

Ren, Z., Li, Z., Chen, Z., Zhang, Y., Lin, X., Weng, W., ... & Li, B. (2021). Characteristics and application of fish oil-in-water pickering emulsions structured with tea water-insoluble proteins/κ-carrageenan complexes. *Food Hydrocolloids*, 114, 106562.

Riseh, R. S., Skorik, Y. A., Thakur, V. K., Moradi Pour, M., Tamanadar, E., & Noghabi, S. S. (2021). Encapsulation of plant biocontrol bacteria with alginate as a main polymer material. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11165.

S

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology, 84*(3), 197-215.

Sakandar, H. A., & Zhang, H. (2021). Trends in Probiotic (s)-Fermented milks and their in vivo functionality: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 55-65.

Sakoui, S., Derdak, R., Addoum, B., Pop, O. L., Vodnar, D. C., Suharoschi, R., ... & El Khalfi, B. (2022). The first study of probiotic properties and biological activities of lactic acid bacteria isolated from Bat guano from Er-rachidia, Morocco. *Lebensmittel-Wissenschaft-Technollogie*, 159, 113224.

Santos, V. P., Marques, N. S., Maia, P. C., Lima, M. A. B. D., Franco, L. D. O., & Campos-Takaki, G. M. D. (2020). Seafood waste as attractive source of chitin and chitosan production and their applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4290.

Sarao, L. K., & Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 344-371.

Shewale, R. N., Sawale, P. D., Khedkar, C. D., & Singh, A. (2014). Selection criteria for probiotics: A review. *International Journal of Probiotics & Prebiotics, 9*(1/2), 17.

Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., & Ho, Y. W. (2017). Probiotics: from isolation to application. *Journal of the American College of Nutrition,* 36(8), 666-676.

Silva, M. P., Martelli-Tosi, M., Massarioli, A. P., Melo, P. S., Alencar, S. M., & Favaro-Trindade, C. S. (2022). Co-encapsulation of guaraná extracts and probiotics increases probiotic

survivability and simultaneously delivers bioactive compounds in simulated gastrointestinal fluids. *Lebensmittel-Wissenschaft-Technollogie*, *161*, 113351.

Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013). Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed Research International*, 2013.

Stojanović, s. T., najman, s. J., popov, b. B., & najman, s. S. (2020). Propolis: chemical composition, biological and pharmacological activity–A review. *Acta Medica Medianae*, *59*(2).

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1-2), 47-55.

T

Tahlaiti, H. (2019). Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté, Thèse de doctorat. Université Abdelhamid ibn badis Mostaganem, faculté des sciences de la nature et de la vie, p205.

Timilsena, Y. P., Haque, M. A., & Adhikari, B. (2020). Encapsulation in the food industry: A brief historical overview to recent developments. *Food and Nutrition Sciences*, 11(06), 481.

Timothy, B., Iliyasu, AH et Anvikar, AR (2021). Les bactériocines des bactéries lactiques et leur application industrielle. Sujets actuels sur les bactéries lactiques et les probiotiques, 7 (1), 1-13.

Trindade, C. F., & Grosso, C. R. F. (2000). The effect of the immobilisation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. *Milchwissenschaft*, 55(9), 496-499.

U

Ucar, Y. (2022). A novel perspective for *Lactobacillus reuteri* cell-free supernatant: co-microencapsulation with propolis extracts. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(4), 1361-1367.

V

Vică, M. L., Glevitzky, M., Heghedűş-Mîndru, R. C., Glevitzky, I., Matei, H. V., Balici, S., & Teodoru, C. A. (2022). Potential Effects of Romanian Propolis Extracts against Pathogen Strains. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(5), 2640.

Vică, M. L., Glevitzky, M., Tit, D. M., Behl, T., Heghedűş-Mîndru, R. C., Zaha, D. C., ... & Bungău, S. (2021). The antimicrobial activity of honey and propolis extracts from the central region of Romania. *Food Bioscience*, 41, 101014.

Vodnar, D. C., & Socaciu, C. (2012). Green tea increases the survival yield of *Bifidobacteria* in simulated gastrointestinal environment and during refrigerated conditions. *Chemistry Central Journal*, *6*(1), 1-8.

W

Wan, M. L. Y., Forsythe, S. J., & El-Nezami, H. (2019). Probiotics interaction with foodborne pathogens: a potential alternative to antibiotics and future challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 59(20), 3320-3333.

Wang, B., Akanbi, T. O., Agyei, D., Holland, B. J., & Barrow, C. J. (2018). Coacervation technique as an encapsulation and delivery tool for hydrophobic biofunctional compounds. *In Role of Materials Science in Food Bioengineering* (pp. 235-261).

Y

Yang, M., Liang, Z., Wang, L., Qi, M., Luo, Z., & Li, L. (2020). Microencapsulation delivery system in food industry—Challenge and the way forward. *Advances in Polymer Technology*, 2020.

Z

Zhang, C. X., Wang, H. Y., & Chen, T. X. (2019). Interactions between intestinal microflora/probiotics and the immune system. *BioMed Research International,* 2019.

Zhang, X., Zeng, Q., Liu, Y., & Cai, Z. (2021). Enhancing the resistance of anthocyanins to environmental stress by constructing ovalbumin-propylene glycol alginate nanocarriers with novel configurations. *Food Hydrocolloids*, *118*, 106668.

Annexes

Annexe 1 : Compositions des milieux

❖ Milieu MRS pour 1L

Ingrédients	Unité
Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Acétate de sodium	5g
Phosphate bipotassique	2g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0,2g
Sulfate de maganèse	0,05g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Eau distillée	1000ml

❖ Bouillon nutritif

Ingrédients	Unité
Peptones	10g
Extrait de boeuf	1g
Extrait de levure	2g
Chlorure de sodium	5g
pH Final	6,8 ± 0,2 at 25 °C
Eau distillée	1000ml

❖ Gélose MRS

Bouillon MRS additionnée de 15g d'agar

Annexe 2 : Composition des tampons

❖ Eau physiologique

Ingrédients	Unité
NaCl	9g
Eau distillée	1000ml

❖ Tampon Phosphate Saline (PBS) pH7.4

Ingrédients	Unité
Nacl	8g
Kcl	0,2g
KH_2Po_4	1,42g
Na_2HPo_4	0,24g
Eau distillée	1000ml

❖ **Tampon Phosphate pH7(1M pour 100ml)**

Ingrédients	Unité
K_2HPO_4	61,5ml
KH_2PO_4	38,5ml

Annexe 3 : Solution d'alginate de sodium à 2%

Ingrédients	Unité
Alginate de sodium	2g
Eau distillée	100ml

Annexe 4 : Chlorure de Calcium 0,05M

Ingrédients	Unité
Chlorure de Calcium	2,8g
Eau distillée	500ml

Annexe 5 : Caractéristiques des billes

Caractéristiques des billes	Diamètre (mm)	Structure	Poids (g)	Cellules/1ml de gel
Billes d'alginate	3,05	Sphérique	0,03	50
Billes sans EEP	3,02	Sphérique	0,028	51
Billes avec EEP	3	Sphérique	0,026	53

Annexe 7 : Effet de l'acidité sur la survie de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%.

Temps (h) / Taux de survie (%)	0	2
Taux de survie des cellules libres	**100**	**53**
Taux de survie des cellules encapsulées	**100**	**59**

Annexe 8 : Survie de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 libre et encapsulé dans 2% de l'alginate de sodium incubé à 0,3% de sels biliaires.

Temps (h) / Taux de survie (%)	0	2
Taux de survie des cellules libres	**100**	**61**
Taux de survie des cellules encapsulées	**100**	**75**

Annexe 9: Effet de l'acidité sur la survie de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 encapsulée avec et sans EEP dans l'alginate de sodium à 2%.

Temps (h) / Taux de survie (%)	0	2
Taux de survie des cellules encapsulées	**100**	**56,7**
Taux de survie des cellules co-encapsulées	**100**	**61**

Annexe 10 : Survie de *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 encapsulé avec et sans EEP dans l'alginate de sodium incubé à 0,3% de sels biliaires.

Temps (h) / Taux de survie (%)	0	2
Taux de survie des cellules encapsulées	**100**	**76**
Taux de survie des cellules co-encapsulées	**100**	**79**

Réalisé par : Anissa BOUROUINA
Miyada GHEBACHE
Raouda MERZOUK

Président : **Dr.**Mohamed Tahar BOUBEZARI
Examinatrice : **Mme.**Wahiba BENHAMADA
Encadrant : **Pr.** Mohammed SIFOUR

Thème

Evaluation de l'effet de l'encapsulation sur la survie d'une bactérie lactique dans les conditions gastro-intestinales.

Résumé

L'objectif de notre travail était dans un premier temps, l'étude de l'efficacité d'encapsulation sur la survie d'une bactérie lactique *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 dans des conditions mimant le tractus gastro-intestinal humain. L'encapsulation a été réalisée par la méthode d'extrusion dans du gel d'alginate de sodium à 2%. La tolérance de la souche aux pH acides et aux sels biliaires a été testée. Dans un deuxième temps, une co-encapsulation de la souche avec un extrait éthanolique de propolis (EEP) a été effectuée dans le but d'évaluer son taux de survie une fois soumise aux mêmes conditions de stress.

Les résultats de l'étude ont démontré une viabilité de la souche à environ 53% pour les cellules libres et à 59% pour les cellules encapsulées à pH 2,0 pendant 2 h d'incubation. Pour l'exposition aux sels biliaires à 0,3 % pendant 4 h, la viabilité obtenue était 61% et 75% pour les cellules libres et encapsulées, respectivement. Malgré que la co-encapsulation de cette bactérie avec l'EEP n'a pas donné une augmentation remarquable par rapport aux bactéries encapsulées seules, il a été observé que l'extrait n'affectait pas la viabilité des cellules. Cette étude confirme l'efficacité de l'encapsulation bactérienne dans l'alginate de sodium à 2% et donne la possibilité de combiner ces deux substances bioactives dans le même traitement.

Mots-clés : Co-encapsulation ; Conditions gastro-intestinales ; Encapsulation ; Extrait éthanolique de propolis ; *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 ; survie.

Abstract

The objective of our work was initially to study the effectiveness of encapsulation on the survival of a lactic acid bacterium *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 under the human gastrointestinal tract simulating conditions. Encapsulation was performed by the extrusion method in 2% sodium alginate. The strain's tolerance to acid pH and bile salts was tested. In a second step, co-encapsulation of the strain with an ethanolic extract of propolis (EEP) was carried out in order to evaluate its survival rate once subjected to the same stress conditions.

The results of the research showed that the viability of the tested strain was about 53% for free cells and 59% for encapsulated ones at pH 2,0 for 2 h of incubation. For the exposure to bile salts at 0,3% for 4 h, the obtained viability was 61% and 75% free and encapsulated cells, respectively. Although the co-encapsulation of this bacterium with EEP does not give a remarkable increase compared to encapsulated bacteria alone, it was observed that the extract did not affect the viability of cells. This study confirms the effectiveness of bacterial encapsulation in 2% sodium alginate and gives the possible use of the tow bioactives substances in the same treatment.

Keywords : Co-encapsulation; Gastrointestinal conditions; Encapsulation; Ethanolic extract of propolis; *Lactiplantibacillus* sp. O7S1; survival.

الملخص

كان الغرض من عملنا في البداية دراسة فاعلية الكبسلة على حيوية البكتيريا اللبنية *Lactiplantibacillus* sp. O_7S_1 تحت ظروف تحاكي الجهاز الهضمي للإنسان. تمت الكبسلة باستعمال طريقة البثق وذلك بواسطة هلام ألجينات الصوديوم بنسبة 2%. تمت دراسة مدى مقاومة السلالة للحموضة المنخفضة والاملاح الصفراوية. ثانيا، تم اجراء كبسلة مشتركة للسلالة مع مستخلص ايثانولي للعكبر من اجل تقييم معدل حيويتها بعد تعرضها لنفس ظروف التجربة السابقة.

أظهرت نتائج الدراسة أن معدل حيوية السلالة يقارب 53% بالنسبة للخلايا الحرة مقابل 59% للخلايا المكبسلة و ذلك عند درجة الحموضة 2 خلال ساعتين من الحضن، أما فيما يخص التعرض للأملاح الصفراوية بنسبة3,0% على مدى 4 ساعات، كانت قدرة البكتيريا على البقاء حية 61% و 75% للخلايا المكبسلة و الحرة على التوالي. ورغم أنه لم ينتج عن الكبسلة المشتركة لهذه البكتيريا مع المستخلص الايثانولي للعكبر زيادة معتبرة مقارنة بالكتيريا المكبسلة وحدها ولكن لوحظ عدم تأثير مستخلص العكبر على حيوية الخلايا. تؤكد هذه الدراسة فعالية الكبسلة البكتيرية بواسطة ألجينات الصوديوم 2% وكذا تتيح إمكانية الجمع بين هاتين المادتين النشطتين بيولوجيا في نفس العلاج.

الكلمات المفتاحية : الكبسلة المشتركة، ظروف الجهاز الهضمي، الكبسلة ، المستخلص الايثانولي للعكبر، البكتيريا اللبنية، الحيوية