

Université de Jijel

Faculté des Sciences Exactes et des  
Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie  
Moléculaire et Cellulaire



جامعة جيجل

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de Fin d'Études pour l'Obtention du Diplôme de  
Master 2 en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème :

*Effet de la Microencapsulation des Bactéries  
Lactiques par Différentes Matrices sur leurs  
Aptitudes Probiotiques et Technologiques*

Membres du Jury :

Présidente : M<sup>elle</sup> ADJEROUD N.

Examinatrice : M<sup>me</sup> BOUSDIRA F.

Encadreur : D<sup>r</sup>. OULED HADDAR .H

Réalisé par :

ARID Somia

BOURIDANE Hamida

## Dédicaces et Remerciements

*Nous avons beaucoup appris ces dernières années, tant sur le plan scientifique qu'humain. Et si aujourd'hui notre bilan personnel du Mémoire de Master est positif, c'est grâce aux nombreuses personnes qui nous ont entouré et soutenu.*

*Nous profitons donc de ces quelques lignes pour remercier nos parents respectifs, nos frères et sœurs et nos collègues surtout Meriem qui nous a beaucoup aidé sans oublier Salima, Hiba, Fatima, Ilhèm et Chérifa. En plus des ingénieurs de laboratoire Widad et Samira.*

*Tout d'abord, nous tenons à remercier dieu tout puissant qui nous a donné la patience et le courage pour réaliser ce modeste travail et ensuite notre encadreur D<sup>r</sup> Ouled Haddar Houria qui nous a aidé et dirigé lors de ce mémoire.*

*Nous remercions sincèrement M<sup>lle</sup> Adjeroud Nawel qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.*

*Nous remercions vivement M<sup>me</sup> Bousdira Fathia d'avoir accepté de faire partie du jury afin d'examiner ce travail. Ce mémoire de Master n'aurait pas été le même si nous n'avions pas bénéficié de l'aide et des conseils de nos D<sup>r</sup> M<sup>r</sup> Idoui et M<sup>r</sup> Sifour.*

# Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

## Partie I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE I

#### I. LES PROBIOTIQUES ET LES BACTERIES LACTIQUES

I.1. Historique .....	3
I.2. Les bactéries lactiques .....	3
I.3. Le genre <i>Lactobacillus</i> .....	3
<i>Lactobacillus plantarum</i> .....	4
<i>Lactobacillus curvatus</i> .....	4
I.4. Probiotique, prébiotique et symbiotique.....	4
I.5. Les microorganismes probiotiques.....	5
I.6. Critères de sélection des probiotiques .....	5
I.6.1 Résistance aux conditions hostiles du tractus gastro-intestinal .....	6
I.6.2 La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale.....	6
I.6.3. La production de composés antimicrobiens.....	7
I.7. Bienfait des probiotiques sur la santé.....	8
I.7.1. Les probiotiques et l'intolérance au lactose .....	8
I.7.2. L'activité hypocholestémiante .....	8
I.7.3. Prévention du risque de diarrhée .....	9
I.7.4. Traitement des maladies inflammatoires chroniques.....	9
I.7.5. Prévention du cancer .....	9

### CHAPITRE II

#### II. LA MICROENCAPSULATION

II. 1. Définition de la microencapsulation (ME).....	11
II. 2. Les différentes matrices utilisées pour la microencapsulation .....	13
II. 2. 1. Matrices.....	13

II. 2. 2 La carraghénane .....	14
II. 2. 3 La gomme arabique .....	14
II. 2. 4 Le chitosane .....	14
II. 2. 5 Les protéines du lactosérum et la présure.....	14
II. 2.6 L'amidon.....	15
II. 2.7 Autres matrices .....	15
II. 3. Les techniques de microencapsulation des probiotiques .....	15
II. 3.1 L'extrusion.....	17
II. 3.2 L'émulsion .....	17
II. 3.3 Le séchage .....	17
II. 4. Effet de divers matrices d'encapsulation sur la viabilité des probiotiques .....	17
II. 5. Facteurs influçants sur l'efficacité de la microencapsulation des probiotiques.....	18
II. 6. Avantage de la microencapsulation des probiotiques .....	18
II. 7. Domaines d'applications des probiotiques encapsulés .....	19
II.7.1 Les probiotiques encapsulés dans les produits alimentaires .....	19
II.7.1.1 Les produits laitiers.....	20
Fromages.....	20
Yaourt.....	20
Desserts laitiers congelés.....	20
II.7.1.2 Les produits non laitiers .....	20
II.7.2 Les probiotiques encapsulés dans les produits pharmaceutiques.....	21

<h2>Partie II : ETUDE EXPERIMENTALE</h2>
--

<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>23</b>
I. Matériel.....	23
I. 1. Matériel biologique : Bactéries probiotiques.....	23
I. 2. Produits et réactifs .....	23
I. 3. Appareillage.....	23
II. Méthodes.....	24
II.1.Revification des souches bactériennes .....	24
II.2. Préparation des souches probiotiques pour l'encapsulation.....	24
II.3. Encapsulation des souches probiotiques avec différentes matrice.....	24
II.3.1. Encapsulation des souches probiotiques dans un gel d'alginate de sodium à 2% .....	24
II.3.2. Encapsulation dans l'alginate 2% - amidon 0.5% .....	24



## Liste des abréviations

ALG	Alginate
ALG N	Alginate fraîchement préparé
ALG V	Alginate conservé pendant un mois
BL	Bactéries Lactiques
BSH	Bile Salt Hydrolase
CaCl <sub>2</sub>	Chloride de Calcium
CAP	Cellulose Acétate Phtalate
CMC	CarboxyMéthyle Cellulose de sodium
g	gramme
h	heure
Lb	<i>Lactobacillus</i>
L.c	<i>Lactobacillus curvatus</i>
L.p	<i>Lactobacillus plantarum</i>
M	Molarité
MCC	Cellulose MicroCristalline
ME	MicroEncapsulation
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
N	Normalité
nm	nanomètre
O <sub>2</sub>	Oxygène
SIF	Fluide Intestinal Simulé
TCI	Tractus Gastro-Intestinal
UFC	Unité Formant Colonie

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Principales espèces utilisées comme probiotiques et exemples des souches commercialisées .....	5
<b>Tableau 2.</b> Effets positifs des probiotiques sur la santé humain.....	8
<b>Tableau 3.</b> Les différentes techniques appliquées pour la microencapsulation des probiotiques.....	16
<b>Tableau 4.</b> Exemples de l'utilisation des probiotiques encapsulées pour les applications industrielles.....	19
<b>Tableau 5.</b> Les souches probiotiques commercialisées comme produits pharmaceutiques en chine.....	21
<b>Tableau 6.</b> Caractéristiques des billes de <i>Lb. plantarum</i> .....	29
<b>Tableau 7.</b> Caractéristiques des billes de <i>Lb. curvatus</i> .....	29
<b>Tableau 8.</b> Rendement d'encapsulation par différentes matrices.....	31
<b>Tableau 9.</b> Résultats du test d'hydrophobicité.....	48
<b>Tableau 10.</b> Résistance et sensibilité de <i>Lb. plantarum</i> et <i>Lb. curvatus</i> aux antibiotiques.....	49

# Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Principaux critères de sélection des probiotiques.....	6
<b>Figure 2.</b> Principe de la microencapsulation des probiotiques.....	12
<b>Figure 3.</b> Représentation schématique des systèmes d'encapsulation .....	12
<b>Figure 4.</b> Représentation schématique des techniques d'encapsulation par les méthodes d'extrusion et d'émulsion.....	16
<b>Figure 5.</b> L'aspect des billes d'alginate de sodium à 2% <b>(a)</b> et de $\kappa$ -caraghénane 2% <b>(b)</b> .....	30
<b>Figure 6.</b> Photomicrographie des cellules bactériennes de <i>Lb. plantarum</i> <b>(a)</b> et <i>Lb. curvatus</i> <b>(b)</b> encapsulées dans un gel d'alginate de sodium 2% (G x100).....	30
<b>Figure 7.</b> Effet de l'acidité (pH 2) sur la cinétique de relargage de <i>Lb. plantarum</i> encapsulé dans les différentes matrices.....	32
<b>Figure 8.</b> Effet de l'acidité (pH 2) sur la cinétique de relargage de <i>Lb. curvatus</i> encapsulé dans les différentes matrices.....	33
<b>Figure 9.</b> Effet des sels biliaires sur la cinétique de relargage de <i>Lb. plantarum</i> encapsulé dans les différentes matrices.....	34
<b>Figure 10.</b> Effet des sels biliaires sur la cinétique de relargage de <i>Lb. curvatus</i> encapsulé dans les différentes matrices.....	35
<b>Figure 11.</b> Effet de l'acidité (pH2) sur la survie de <i>Lp. plantarum</i> libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%.....	37
<b>Figure 12.</b> Effet de l'acidité (pH2) sur la survie de <i>Lb. curvatus</i> libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%.....	38
<b>Figure 13.</b> Survie de <i>Lb. plantarum</i> libre et encapsulé dans l'alginate de sodium incubé dans 0.3% de sels biliaires.....	39
<b>Figure 14.</b> Survie de <i>Lb. curvatus</i> libre et encapsulé dans l'alginate de sodium incubé à 0.3% de sels biliaires.....	40



<b>Figure 15.</b> Effet de la pancréatine sur la survie de <i>Lb. plantarum</i> libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%.....	41
<b>Figure 16.</b> Effet de la pancréatine sur la survie de <i>Lb. curvatus</i> libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%.....	42
<b>Figure 17.</b> Effet température sur la survie de <i>Lb. plantarum</i> libre et encapsulé dans l'alginate de sodium 2%.....	43
<b>Figure 18.</b> Effet température sur la survie de <i>Lb. curvatus</i> libre et encapsulé dans l'alginate de sodium 2%.....	44
<b>Figure 19.</b> Effet de la conservation à 4°C sur la survie de <i>Lb. plantarum</i> libre et encapsulé dans l'alginate de sodium 2%.....	45
<b>Figure 20.</b> Effet de la conservation à 4°C sur la survie de <i>Lb. curvatus</i> libre et encapsulé dans l'alginate de sodium 2%.....	46
<b>Figure 21.</b> Photomicrographie d'adhésion des souches <i>Lb. plantarum</i> dans colon <b>(a)</b> et l'iléon <b>(b)</b> et <i>Lb. curvatus</i> dans l'iléon <b>(c)</b> .....	47

**Introduction**

**Générale**

# Introduction Générale

Dans le début des années 1900, la découverte d'Elie Metchnikoff sur les avantages exceptionnels du lait de vache fermenté a conduit à un Prix Nobel de Médecine en 1908. La raison de l'effet nutritionnel découvert est due à la présence de bactéries lactiques probiotiques dans les produits alimentaires **(Akhiar, 2010)**.

Les probiotiques ont été définis de plusieurs façons, selon la compréhension des mécanismes d'action sur la santé et le bien-être de l'Homme. La plus utilisée est celle de Fuller **(1989)** : les probiotiques sont des compléments alimentaires microbiens, vivants et bénéfiques affectant l'hôte en améliorant son équilibre intestinal **(Anal et Singh, 2007)**.

Le terme probiotique comprend une large gamme de microorganismes, principalement les bactéries, mais également les levures, qui peuvent se maintenir en vie jusqu'à atteindre l'intestin pour fournir leur effet bénéfique sur la santé de l'hôte, ces effets probiotiques sont spécifiques à la souche et c'est la raison pour laquelle il est important de préciser le Genre et l'espèce des bactéries probiotiques, en proclamant leurs multiples avantages. Les prestations des probiotiques sur la santé peuvent être dues à la production d'acides et/ou de bactériocines, les concurrences avec les agents pathogènes et stimulation du système immunitaire **(Burgain et al., 2011)**.

Les probiotiques sont certainement très sensibles à leur milieu environnant, tel que : l'acidité, l'oxygène et la chaleur. Par conséquent, les probiotiques, doivent remplir plusieurs critères avant d'être appliqués, notamment l'activité et la viabilité dans les produits; l'adhésion aux cellules épithéliales, la tolérance aux faibles pH, au suc gastrique, aux sels biliaries, au suc pancréatique, et la survie *in vivo*. La viabilité des probiotiques est un paramètre clé pour le développement des probiotiques dans les aliments **(Soccol et al., 2010)**.

Les obstacles rencontrés au niveau des différents compartiments du tractus gastrointestinal (TGI) et la longue période de conservation dans les produits alimentaires, limitent la survie et la stabilité des cellules bactériennes viables avant d'atteindre leur site cible. Ainsi pour une efficacité lors de l'administration orale de bactéries probiotiques vivantes, en un système de transport efficace est exigé pour les protéger ; la technologie de la microencapsulation semble être un système de support approprié à cette fin (**Ariful et al., 2010**).

Diverses matrices alimentaires composées de polysaccharides, comme l'alginate, la gomme de gellane, la carraghénane et l'amidon sont les matériaux les plus couramment utilisés pour la ME des bifidobactéries et des lactobacilles. Les techniques appliquées pour la ME des probiotiques sont l'émulsion, l'extrusion et le séchage par atomisation. La stabilité des billes peut être d'avantage améliorée en utilisant différents matériaux de revêtement, par exemple : le chitosane et l'amidon (**Rokka et Rantamäki, 2010**).

Les futurs défis dans ce domaine sont le développement de nouvelles technologies puissantes, la sélection des techniques, des matériaux, et des souches bactériennes, en minimisant les couts supplémentaires issus de la microencapsulation (**Ariful et al., 2010**).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de la microencapsulation sur les deux bactéries lactiques probiotiques; *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus curvatus* par différentes matrices sur quelques unes de leurs aptitudes probiotiques et technologiques.

Partie I

Analyse  
Bibliographique

# Chapitre I

## Les Bactéries Lactiques et Probiotiques

## I. LES PROBIOTIQUES ET LES BACTERIE LACTIQUES

### I.1. Historique

Les probiotiques sont généralement liés à la santé intestinale, la première suggestion d'une association bénéfique entre les microorganismes et l'hôte humain peut probablement être attribuée à Albert Doderlein, qui a proposé en 1892 que la production d'acide lactique par les bactéries vaginales empêchait ou entravait la croissance de bactéries pathogènes. Le père fondateur du concept de probiotique est Elie Metchnikoff (1908) qui suggéra que « la dépendance des microbes intestinaux par l'alimentation rend possible l'adoption de mesures pour modifier la microflore du corps en remplaçant les microbes nocifs par des microbes utiles » (Leroy *et al.*, 2008).

Cette hypothèse venait appuyer l'observation précédente d'un pédiatre français, Henry Tissier (1906), qui en étudiant la diarrhée infantile remarqua l'absence de bifidobactéries et suggéra leur utilisation pour traiter les patients atteints de diarrhée afin de les aider à rétablir leur microflore intestinale. Le terme probiotique provient de deux mots grecs, *προ pro* et *βίος bios*, qui signifient littéralement « pour la vie ». Il a été popularisé par Fuller en 1989 lorsqu'il lui donna sa première définition officielle : « les probiotiques sont des suppléments alimentaires à base de microorganismes vivants qui agissent de façon bénéfique sur l'être vivant en améliorant l'équilibre et la stabilité de sa microflore intestinale ». Cette définition a été révisée et actuellement, la plus acceptée est celle recommandée par un panel d'experts mandatés par l'OMS et le FAO (2002). Elle indique que les probiotiques sont : « des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte » (Gagnon, 2007).

### I.2. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est leur aptitude à produire de l'acide lactique suite à la fermentation des glucides. Elles sont devenues les principaux candidats probiotiques et bénéficient d'un statut GRAS (Generally Regarded As Safe). Les bactéries lactiques sont des microorganismes à Gram positif, elles se présentent le plus souvent sous forme de coques ou de bacilles, non mobiles, anaérobies mais aérotolérantes, négatives à la catalase, nitrate réductase et dépourvues de cytochrome. Elles sont en outre résistantes à l'acide (Vasiljevic et Shah, 2008).

La taxonomie des bactéries lactiques a été basée sur la coloration de Gram et il est possible de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides. Les bactéries lactiques regroupent 11 genres dont les plus étudiés sont : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Enterococcus* et *Pediococcus* en plus de *Bifidobacterium* qui est aussi classé comme bactérie lactique (Saad, 2010; Givry, 2006).

### I.3. Le genre *Lactobacillus*

Les lactobacilles appartiennent à la flore normale de la cavité buccale, urogénitale et du tractus gastro-intestinal de l'Homme et de l'animal. Ils représentent le groupe le plus important des bactéries lactiques, contenant plus de 120 espèces et 20 sous espèces. Ces bactéries peuvent se développer à des températures basses ou extrêmes comprises entre 2 et 50°C, avec un optimum compris entre 30 et 40°C. Ils ont un métabolisme strictement fermentaire (homo ou hétérofermentaire), anaérobies mais aérotolérants et acidophiles, avec un optimum de pH entre 5,5 et 6,2. De plus ces microorganismes sont auxotrophes avec de fortes exigences en facteurs de croissance (Saad, 2010).

Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs comprennent un large éventail d'espèces, y compris les espèces et sous-espèces d'intérêt technologique et clinique, telles que *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei* et *Lactobacillus curvatus*, les soi-disant "streptobactéries atypiques" qui sont des bactéries d'altération importantes (Klein *et al.*, 1996).

### *Lactobacillus plantarum*

L'espèce *Lactobacillus plantarum* est une bactérie Gram positif, mésophile, tolérant l'oxygène et hétérofermentaire facultative. Elle peut croître en forte densité ce qui pourrait être intéressant pour des applications industrielles. Plusieurs souches de *Lb. plantarum* résistent à un passage dans l'estomac sous une forme viable et sont ainsi capables de survivre pendant plus de 6 jours dans le tractus gastro-intestinal de l'Homme et de l'animal. En outre *Lactobacillus plantarum* produit plusieurs types de bactériocines selon la souche, parmi lesquelles la plantaricine. De telles propriétés de survie et de persistance dans le tractus de l'hôte sans oublier sa forte activité antimicrobienne contribuent à conforter l'intérêt de cette souche en tant que probiotique potentiel. De ce fait, certaines souches de *Lb. plantarum* sont présentées comme des probiotiques qui induisent des effets bénéfiques sur la santé du consommateur (Saad, 2010; Maldonado et al., 2004).

### *Lactobacillus curvatus*

L'espèce *Lactobacillus curvatus* est facultativement hétérofermentaire, les cellules sont des bacilles courbées avec des extrémités arrondies et se présentent en paires ou en courtes chaînes, qui sont fréquemment observées et habituellement immobiles. Il a été possible d'isoler des souches de *Lactobacillus curvatus* avec de fortes propriétés probiotiques citant la résistance à l'acide et à la bile, l'activité  $\beta$ -galactosidase et l'activité antimicrobienne (Halásaz et al., 2009; Reddy et al., 2007; Klein et al., 1996).

Cette espèce est un producteur d'une bactériocine dénommée la curvacine, qui contribue à l'inactivation d'*E. coli* et inhibe fortement *Listeria innocua* dans un modèle dynamique du compartiment de l'estomac et l'intestin grêle (Joerger, 2002).

## I.4. Probiotique, prébiotique et symbiotique

L'idée d'administrer de nouveaux micro-organismes afin de moduler la flore endogène dans un sens bénéfique, ou plus simplement d'utiliser leurs propriétés métaboliques, est ancienne et a conduit à introduire le terme de probiotique. La définition actuelle de probiotiques les identifie comme une monoculture ou une culture mixte de microorganismes vivants qui profitent au microbiote indigène de l'être humain (Vasiljevic et Shah, 2008; Denis et al., 2006).

Certains composants de la microflore intestinale, particulièrement les bifidobactéries, sont capables de fermenter des substances essentiellement non digestibles (hydrates de carbone) dans le colon grâce à son pouvoir saccharolytique important. Cette propriété permet d'augmenter la croissance ou l'activité des microorganismes spécifiques du tractus gastro-intestinal en influençant positivement la santé de l'hôte. Les effets bénéfiques générés par ces interactions ont permis le développement du nouveau concept «prébiotiques». Les prébiotiques sont des fibres dans certaines plantes qui atteignent le côlon sans être digérées, donc ils doivent être non digestibles pour servir de substrat aux bactéries spécifiques, principalement les bifidobactéries et les lactobacilles, qui sont actives et améliorent la santé de l'hôte. Les fibres alimentaires comme les polysaccharides tels que l'amidon, l'inuline, la pectine, la gomme de guar, et les oligosaccharides non digestibles sont ainsi fermentés par les bactéries intestinales en produisant des acides gras à courte chaîne notamment les acides acétique, propionique et butyrique (Sekhon et Jairath, 2010; Amrouche, 2005).

Il y a une synergie évidente entre les potentiels probiotiques et les ingrédients prébiotiques et les aliments probiotiques qui contiennent les deux sont appelés "Symbiotique" donc celui-ci est un mélange de probiotiques et de prébiotiques qui affecte positivement l'hôte en améliorant la survie et l'implantation d'espèces microbiennes vivantes apportées dans le tractus gastro-intestinal (Leroy et al., 2008; Amrouche, 2005).

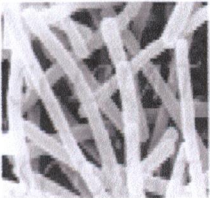

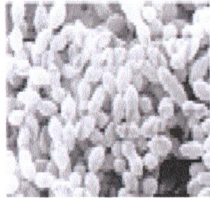
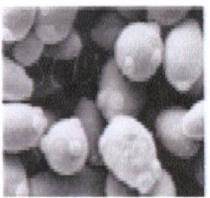
Les principales actions pré-/probiotiques sont : renforcer la résistance des hôtes aux exogènes pathogènes intestinaux, lutter contre les maladies ou les composants du microbiote intestinal qui sont impliqués dans une pathologie, réduire la putréfaction / le métabolisme toxigène microbien dans l'intestin, et moduler le système immunitaire de l'hôte (Crittenden et al., 2005).



### I.5. Les microorganismes probiotiques

Les principales souches reconnues en tant que probiotiques chez l'humain sont des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*; qui sont tous deux autochtones à l'intestin humain, en plus d'*Enterococcus* et de *Streptococcus* (Gagnon, 2007; Crittenden *et al.*, 2005). En effet, ces bactéries sont des membres de la flore de l'intestin, connues pour ne pas présenter de risque toxique et /ou sont relativement faciles à inclure dans des produits laitiers. Une grande variété de lactobacilles sont utilisés comme probiotiques, parmi les quels *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus rhamnosus* sont les espèces les plus étudiées. Le **tableau 1** cite les espèces les plus utilisées comme probiotiques et qui sont *Bifidobacterium lactis* et *Bifidobacterium longum*. D'autres microorganismes ne faisant pas naturellement partie de la flore naturelle humaine peuvent également être utilisés comme probiotiques, et l'un des meilleurs exemples est représenté par *Saccharomyces boulardii*, une levure probiotique dont les effets sont les mieux documentés (Izquierdo, 2009).

**Tableau 1** : Principales espèces utilisées comme probiotiques et exemples des souches commercialisées (Izquierdo, 2009).

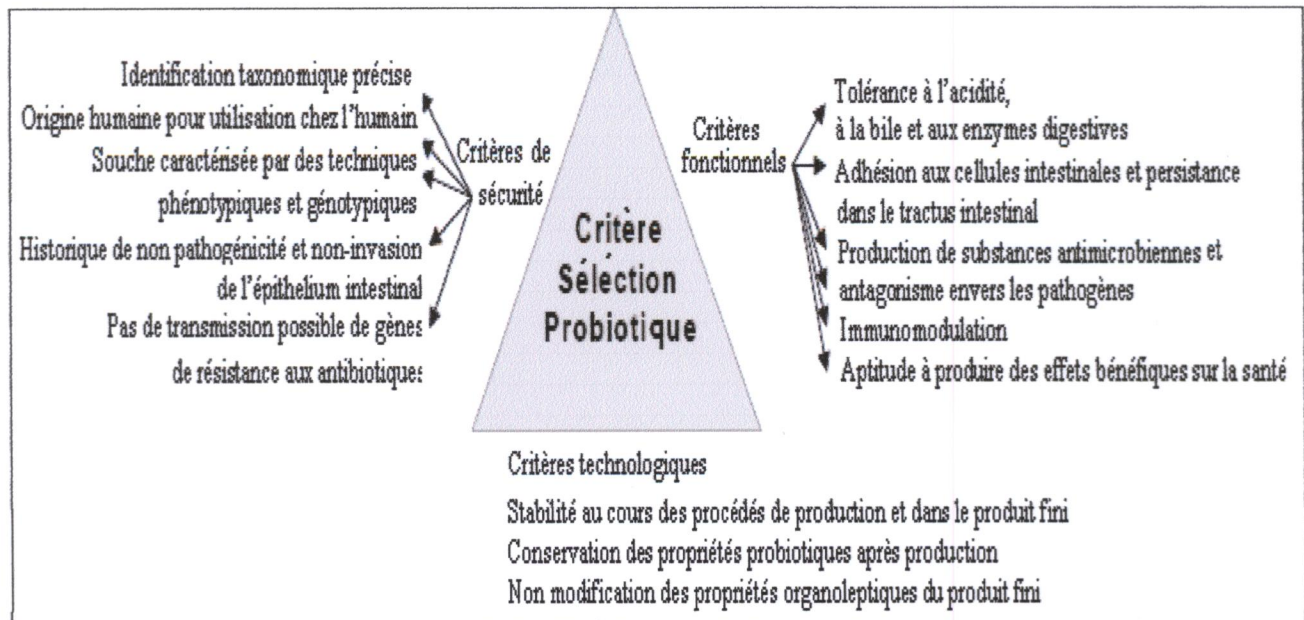
Espèces de lactobacilles	Espèces de bifidobactéries	Autres bactéries lactiques	Microorganismes « non-lactiques »
			
<i>L. acidophilus</i> La5 (Chr Hansen) <i>L. acidophilus</i> NCFM (Danisco) <i>L. casei</i> Shirota (Yakult) <i>L. casei</i> DN-114 001 (Danone) <i>L. reuteri</i> ATCC 55730 (Biogala) <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>L. paracasei</i> F19 (Mediobank) <i>L. plantarum</i> 299V (Probi AB) <i>L. rhamnosus</i> GG (Vivo)	<i>B. longum</i> BB536 (Morinaga) <i>B. breve</i> Yakult (Yakult) <i>B. lactis</i> Bb 12 (Chr Hansen) <i>B. lactis</i> HN019 (Danisco) <i>B. animalis</i> DNI 73010 (Danone) <i>B. infantis</i> 35264 (Procter & Gamble)	<i>S. thermophilus</i> 1131 (Vita Milk) <i>E. faecalis</i> SymbiFlor (SymbioPharm) <i>E. faecium</i> SF68 (Genosa) <i>P. acidilactici</i> Bactocel® (Allermond)	<i>S. boulardii</i> Ultra-levure® (Procodex) <i>S. cerevisiae</i> <i>E. coli</i> Nissle 1917 (AdeyPharm) <i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i>

### I.6. Critères de sélection des probiotiques

Afin de satisfaire à la définition des probiotiques, les micro-organismes doivent posséder diverses propriétés de survie, d'activité et de persistance dans le tractus digestif qui leurs permettront d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte. Ces propriétés sont propres à chaque souche et ne peuvent pas être extrapolées d'une souche à l'autre même au sein d'une seule espèce (Gagnon, 2007).

Certaines propriétés essentielles sont proposées pour la sélection de nouvelles souches probiotiques : (i) ces bactéries doivent être sans danger pour l'hôte, c à d qu'ils ne sont ni pathogènes, ni toxiques, être résistantes au passage des voies gastriques, aux enzymes pancréatiques, aux sels biliaires et à l'acidité, (ii) avoir de bonnes propriétés technologiques, de sorte qu'elles puissent être cultivées à grande échelle, (iii) avoir une durée de conservation prolongée et en cas d'utilisation dans les produits fermentés en contribuant à l'amélioration du goût. Enfin, (iv) être capable d'adhérer aux muqueuses intestinales afin d'exercer leur effet immunomodulateur, participer à l'exclusion de pathogènes ou encore, améliorer la guérison de la muqueuse (Saad, 2010).

Plusieurs critères majeurs de sélection *in vitro* et *in vivo* ont été établis et retenus par différents auteurs qui sont résumés par la **Figure 1**.



**Figure 1 : Principaux critères de sélection des probiotiques (Gagnon, 2007)**

### 1.6.1 Résistance aux conditions hostiles du tractus gastro-intestinal

Le tube digestif humain, qui est le siège d'intenses activités biologiques et mécaniques, présente des zones défavorables à la survie des bactéries lactiques, notamment la zone de l'estomac à cause de son contenu acide: l'acide chlorhydrique sécrété par la muqueuse gastrique. Plus de 2 litres de suc gastrique est sécrété par jour dans l'estomac. Cela rend le pH du suc gastrique à environ 2,0. Les potentielles souches probiotiques devraient donc être en mesure de tolérer un faible pH de 2. Des protocoles expérimentaux ont simulé les conditions pouvant régner dans cette zone, mais une grande variabilité inter-protocole subsiste (Gbassi, 2010; Kalui *et al.*, 2010; Kailasapathy et Chin, 2000).

La tolérance à l'acidité fait partie des *tests in vitro* censés fournir des informations utiles sur les potentialités des probiotiques, par conséquent, la tolérance à l'acide est l'une des premières propriétés de dépistage pour la sélection des souches probiotiques (Gbassi, 2010; Tuomola *et al.*, 2001). La zone de l'intestin grêle est aussi considérée comme une zone défavorable à cause de la bile qui y est présente. Le pH intestinal contrairement à l'estomac est légèrement alcalin (pH 7,2 à 7,5) grâce à la bile. Il s'acidifie progressivement pour se stabiliser entre 6,2 et 6,5 à la fin de l'iléon (Kimse, 2009).

Selon, le règlement, il est essentiel de s'assurer que la déconjugaison des sels biliaires grâce à la « Bile Salt Hydrolase » (BSH, EC 3.5.1.24) dans l'intestin grêle n'est pas accrue et qu'aucun changement ne survient dans le gros intestin. La revue des données scientifiques supporte l'hypothèse que la déconjugaison des sels biliaires par des bactéries possédant une activité BSH permet la détoxification de ceux-ci et augmente leur chance de survie dans l'intestin. L'activité BSH d'un probiotique sera donc désirable puisqu'elle maximise ses chances de survie dans le tractus gastro-intestinal (Gbassi, 2010; Denis *et al.*, 2006).

Le suc pancréatique inhibe la croissance de souches bactériennes multirésistantes et aussi certaines bactéries probiotiques. Toutefois, des souches individuelles tolèrent les milieux supplémentés avec du suc pancréatique qui est indépendante de l'activité protéolytique (Ljungh et Wadström, 2005).

### I.6.2 La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale

La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale est également une des propriétés essentielles que les souches probiotiques doivent posséder. Il est généralement convenu que les BL doivent adhérer au mucus intestinal ou des cellules épithéliales dans le but de persister dans l'intestin. La capacité des BL pour adhérer aux surfaces des muqueuses empêche leur évacuation rapide par la contraction intestinale et après écoulement péristaltique des digestas, donc l'adhésion permet d'accroître le temps de rétention des probiotiques dans l'intestin et met en contact étroit les bactéries et les cellules épithéliales. Ainsi, un probiotique ayant un fort pourcentage d'adhésion pourra éventuellement stimuler le système immunitaire et prévenir l'implantation de pathogènes sur les cellules épithéliales de l'intestin par des mécanismes de compétition. Les modèles *in vitro* pour évaluer l'adhésion des probiotiques font appels à des lignées cellulaires provenant de côlons humains telles que les carcinomes du colon Caco-2 et les adénocarcinomes tumoraux du colon humain HT-29. La capacité d'adhésion évaluée à l'aide de ces modèles *in vitro* est différente pour chaque souche. Ceci est probablement lié à la physiologie et aux facteurs d'adhésion tels que les composés protéiques, polysaccharides, charges ioniques et aux acides lipotéichoïques propres à chaque souche bactérienne (Kotikalapudi, 2009; Gagnon, 2007).

Toutefois, d'autres propriétés sont prises en considération pour la sélection des meilleurs candidats au rôle de probiotique. Parmi celles-ci on compte:

- l'aptitude de la bactérie lactique à modifier les conditions de son microenvironnement dans le tractus (ex acidification grâce à la production d'acides gras à courtes chaînes... etc),
- sa capacité à entrer en compétition avec les bactéries pathogènes vis-à-vis des éléments nutritifs et des sites d'adhésion et par conséquent à survivre et à se multiplier pendant son transit dans le tractus
- la production de métabolites antimicrobiens qui va favoriser l'antagonisme vis-à-vis des pathogènes et enfin,
- l'aptitude à engendrer une modulation de la réponse immunitaire de l'hôte.

Du point de vue technologique, les souches probiotiques doivent posséder plusieurs qualités telles que la facilité à être cultivée à de hautes densités cellulaires tout en conservant leurs propriétés biologiques et leur stabilité au cours des procédés de production et d'entreposage. À ce titre, de nouvelles technologies permettant de produire des souches probiotiques à haute viabilité et fonctionnalité sont actuellement disponibles. Toutes ces propriétés prises en considération pour sélectionner les bactéries lactiques en tant que probiotiques sont intimement liées aux mécanismes d'action de ces dernières (Saad, 2010; Gagnon, 2007).

### I.6.3. La production de composés antimicrobiens

L'activité antimicrobienne contre les microorganismes potentiellement pathogènes a été l'un des attributs recommandés pour les potentielles souches probiotiques. Les BL ont été rapportés pour produire des composés antimicrobiens et d'exercer une forte activité antagonistique contre les contaminants des produits alimentaires. Plusieurs substances antimicrobiennes ont été produites par les BL qui ont des avantages considérables pour la concurrence avec les agents pathogènes et d'autres bactéries nocives et qui comprennent des acides gras, acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, l'acétoïne et les mieux étudiés sont les «bactériocines». Les bactériocines produites par BL ont été divisés en trois catégories: 1) les l'ouantibiotiques ou bactériocines modifiées; 2) les peptides courts thermostables et non-modifiés, 3) les protéines de taille importante thermolabiles et 4) les bactériocines complexes. De nombreuses bactériocines, comme la nisine, lactobrevin, acidophilin, acidoline, lactobacillin, lactocidin et lactolin, sont produites par les lactobacilles. Les espèces de *Lactobacillus spp* les plus couramment connues pour produire des bactériocines sont *Lactobacillus sakei* et *Lactobacillus curvatus*. Certains BL produisent du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dans des conditions aérobies et de croissance en raison de l'absence de catalase cellulaires, pseudocatalase, ou la peroxydase, ils le libèrent dans l'environnement pour se protéger de ses propriétés antimicrobiennes.

Il est un puissant agent oxydant et est capable d'oxyder le groupe SH des protéines membranaires de bactéries pathogènes Gram-négatives, qui lui sont particulièrement sensibles. *Lactobacillus gasseri* CRL1421 et *L. gasseri* CRL1412 33 ont été trouvés à produire de l'acide lactique et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*, ce qui aurait réduit la viabilité des *Staphylococcus aureus* (Kalui *et al.*, 2010; Kotikalapudi, 2009; Cenatiempo *et al.*, 1996).

### I.7. Bienfaits des probiotiques sur la santé

Les effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, attribués aux probiotiques sont nombreux et les plus importants sont cités dans le **tableau 2**, mais les preuves confirmant ces allégations sont encore assez rares. Les premiers intérêts cliniques rapportés dans la littérature pour l'utilisation des probiotiques ont été dans le cadre : de traitements des maladies infectieuses dont des diarrhées d'origines virales ou bactériennes ou consécutives aux antibiothérapies, des maladies inflammatoires chroniques du colon "MICI" telles que la colite ulcéreuse et la pouchite. Ils concernent notamment, l'amélioration de la digestion du lactose, la diminution du taux de cholestérol sanguin, la diminution du risque de cancer du colon, et la diminution des ulcères gastriques induits par *Helicobacter pylori*, ainsi que l'inhibition de leur croissance (Saad, 2010; Sanders, 2007).

**Tableau 2:** Effets positifs des probiotiques sur la santé humain (Izquierdo, 2009).

Effets des probiotiques	Mécanismes d'activité proposés
Amélioration de la digestion du lactose	- Action de la $\beta$ -galactosidase bactérienne dans l'intestin grêle
Diminution des allergies alimentaires	- Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale - Stimulation du système immunitaire
Réduction du risque des diarrhées	- Résistance à la colonisation par des pathogènes - Stimulation du système immunitaire
Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin	- Modulation de la flore intestinale - Stimulation du système immunitaire
Réduction du cholestérol	- Assimilation du cholestérol - Déconjugaison des sels biliaires
Prévention du cancer du colon	- Stimulation du système immunitaire - Production des composés antimutagènes - Modulation des enzymes fécales carcinogéniques - Dégradation des carcinogènes - Elimination des bactéries impliquées dans la production de cancérogènes

#### I.7.1. Les probiotiques et l'intolérance au lactose

L'un des effets des BL qui a été le plus mis en avant et démontré chez l'Homme est celui qui concerne l'amélioration de l'intolérance au lactose. Ce disaccharide, présent exclusivement dans le lait et ses dérivés, est formé de glucoses reliés entre eux par une liaison  $\beta$ . Sa digestion nécessite une lactase, ou  $\beta$ -galactosidase. L'intolérance du lactose d'une part est due au déclin de la production de cette enzyme (intolérance primaire) et d'autre part est représenté par les maladies dont la conséquence est une réduction de la surface de digestion –absorption intestinale. Il a été démontré que la consommation de lait contenant des souches de *Bifidobacterium longum* réduit les symptômes de la malabsorption de lactose chez des sujets humains suite à une élévation de la sécrétion de la  $\beta$ -galactosidase (Izquierdo, 2009; Amrouche, 2005).

### **I.7.2. L'activité hypocholestémiante**

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce fait, comme l'assimilation du cholestérol par les bactéries ou l'hydrolyse des sels biliaires conjugués. Les acides biliaires, synthétisés par le foie à partir du cholestérol, sont "recyclés". L'hydrolyse des sels biliaires conjugués rend nécessaire la synthèse de sels biliaires supplémentaires, ce qui conduirait à une réduction du cholestérol (Izquierdo, 2009).

### **I.7.3. Prévention du risque de diarrhée**

Des études randomisées contrôlées sur l'Homme ont montré l'efficacité des souches probiotiques pour prévenir ou atténuer les perturbations digestives liées à la prise d'antibiotiques tels que celles associées à *Clostridium difficile* et les diarrhées nosocomiales infantiles dues à des rotavirus ainsi que la diarrhée du voyageur (Izquierdo, 2009; Tredez, 2008).

### **I.7.4. Traitement des maladies inflammatoires chroniques**

Selon la littérature, les processus inflammatoires impliqués dans les pathologies de l'intestin de l'Homme, comme la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la pouchite sont connues comme des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), qui sont contrôlés par les probiotiques. Des études supplémentaires sont encore nécessaires en vue de l'application clinique des probiotiques dans le traitement des MICI, mais les résultats positifs obtenus sont sûrement très encourageants (Izquierdo, 2009; Amrouche, 2005).

### **I.7.5. Prévention du cancer**

L'action antitumorale des probiotiques pourrait être due à: (i) l'inhibition des agents cancérogènes et / ou procarcinogènes; (ii) l'inhibition de bactéries qui transforment les procarcinogènes à des agents cancérogènes; (iii) l'activation du système immunitaire de l'hôte; (iv) la réduction de pH intestinal pour réduire l'activité microbienne, et (v) la modification de la motricité colique et le temps de transit. D'un autre côté, bien qu'il n'y ait pas de preuves expérimentales directes de la suppression des cancers par la consommation de cultures probiotiques; il existe de nombreuses preuves indirectes basées sur des études de laboratoire, ce qui ouvre des perspectives pour l'application des probiotiques dans la prévention de certain types de cancer et encouragent la recherche dans ce domaine (Izquierdo, 2009; Kailasapathy et Chin, 2000).

# Chapitre II

## La Microencapsulation

## II. LA MICROENCAPSULATION

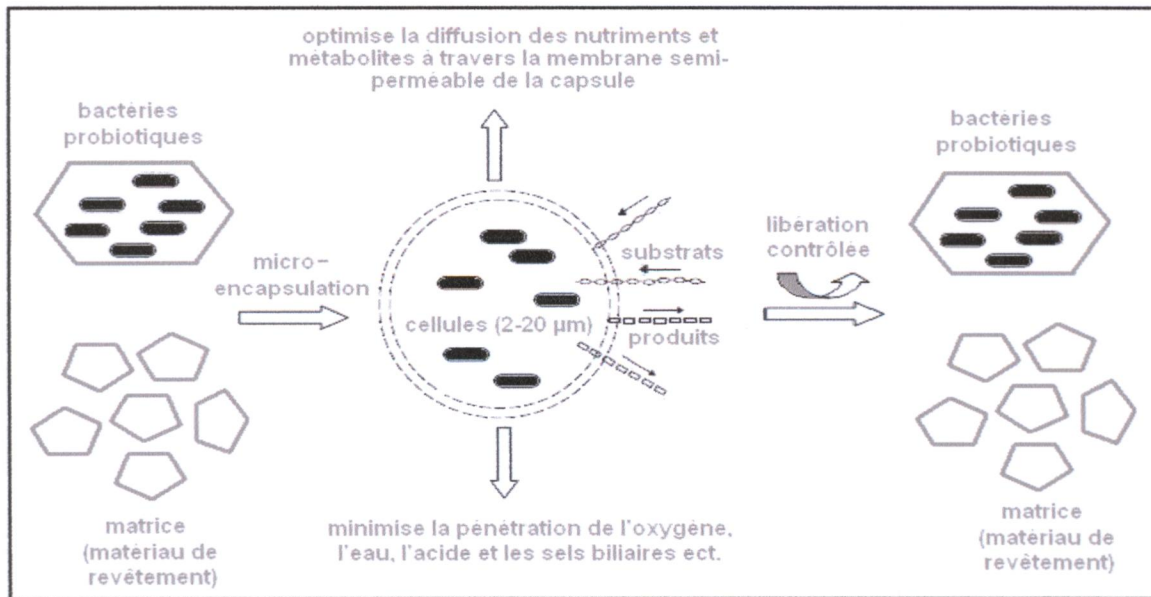
Le maintien de la viabilité et la fonctionnalité des probiotiques jusqu'à ce qu'ils atteignent leur destination dans l'intestin humain est l'une des principales exigences. En outre, il a été clairement démontré que les acides qui créent les conditions environnementales extrêmes dans l'estomac de l'homme peuvent sérieusement réduire le nombre de cellules vivantes jusqu'à l'intestin. Ainsi, la survie des probiotiques dans les produits est affectée par une série de facteurs, y compris le pH, la production de peroxyde d'hydrogène, la toxicité de l'oxygène et les températures de stockage (Heidebach *et al.*, 2009; Kailasapathy, 2002).

L'encapsulation se produit naturellement lorsque les bactéries lactiques se développent et synthétisent des exo-polysaccharides et sont piégées à l'intérieur de leurs propres sécrétions qui agissent comme une structure de protection ou une capsule, mais pas suffisamment pour être capables de les encapsuler complètement. À cet égard la microencapsulation a été tentée pour améliorer la survie des bactéries probiotiques au cours du traitement, du stockage et en particulier au cours du transit gastro-intestinal. La technologie de la microencapsulation de cellules bactériennes probiotiques a évolué à partir de la technologie des cultures des cellules immobilisées utilisé dans l'industrie biotechnologique (Babu *et al.*, 2011; Heidebach *et al.*, 2009; Vidhyalakshmi *et al.*, 2007; Kailasapathy, 2002).

### II. 1. Définition de la microencapsulation (ME)

La microencapsulation est un outil utile pour améliorer la prestation des composés bioactifs dans les aliments ainsi que les produits pharmaceutiques, notamment les probiotiques, les minéraux, les vitamines et les antioxydants. La microencapsulation des cellules probiotiques est l'une des méthodes les plus récentes et hautement efficaces, qui requiert maintenant une attention particulière (Meiners, 2010; Champagne et Fustier, 2007; Mortazavian *et al.*, 2007).

Elle a été définie comme étant l'incorporation d'ingrédients alimentaires, d'enzymes, d'huiles, des probiotiques ou des nutraceutiques, dans de petites capsules qui peuvent libérer leur contenu à des vitesses contrôlées dans des conditions particulières et qui protègent leur contenu de la dégradation par des facteurs préjudiciables dans leur environnement. La ME améliore la viabilité des BL probiotiques en les retenant dans une membrane protectrice de polymère d'hydrocolloïdes ou dite matrice qui forme une bille ou plus exactement une microcapsule, et qui peut relarguer son contenu à des taux contrôlés sous des conditions spécifiques, pour réduire le dommage causé aux cellules ou la perte de ces dernières en plus de l'augmentation de leur viabilité dans les produits alimentaires et durant le transit GI. Le but de la microencapsulation des probiotiques est de stabiliser et maintenir la viabilité pendant le stockage, pour se protéger contre l'environnement gastro-intestinaux sévère et à la libération contrôlée dans le côlon (figure 2) (Babu *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2008; Petrović *et al.*, 2007; Muthukumarasamy et Holley, 2006; Mandal *et al.*, 2006; Talkwalkar et Kailasapathy, 2004).

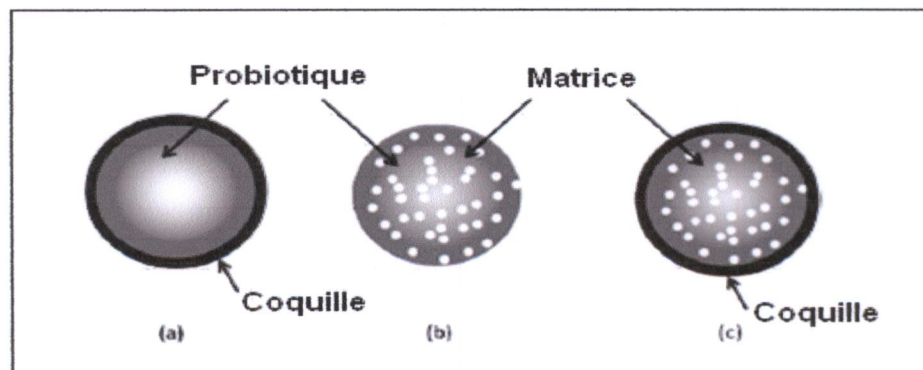


**Figure 2 :** Principe de la microencapsulation des probiotiques (Petterson, 2004; Kailasapathy, 2002).

La plupart des microcapsules produites de manière conventionnelle (par exemple les billes d'alginate de calcium), ont tendance à être très poreuses ce qui permet une diffusion rapide et facile de l'eau et d'autres fluides à l'intérieur et à l'extérieur de la matrice. Les billes de polymères en forme sphérique avec des diamètres allant de 25  $\mu\text{m}$  à 5 mm par l'immobilisation de la biomasse active sont produites en utilisant des techniques d'extrusion où les billes de différentes tailles peuvent être obtenues avec des diamètres allant de 0.1 à 5 mm ou d'émulsion avec laquelle de billes plus petites peuvent être produites en comparaison avec la technique d'extrusion, la taille de ces dernières peut varier entre 25  $\mu\text{m}$  et 2 mm (Anal et Singh, 2007; Mortazavian *et al.*, 2007; Petrović *et al.*, 2007).

Les matériaux enrobant sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des lipides. Les microparticules obtenues présentent deux types de morphologies comme cela est expliqué par la **figure 3** et les différents types de capsules peuvent être :

- Soit une microcapsule, c'est le type de réservoir qui a une coquille autour du matériau de base et c'est pourquoi il peut aussi être appelé capsule.
- Soit une microsphère, c'est-à-dire une particule de type matriciel où l'agent actif est dispersés dans la matrice et peut également être retrouvé sur la surface.
- Une combinaison de ces deux types donne un troisième type de capsule : la matrice et l'agent actif sont recouverts par un revêtement (Burgain *et al.*, 2011; Kailasapathy, 2002; Richard et Benoit; 2000).



**Figure 3 :** Représentation schématique des systèmes d'encapsulation (a) Type réservoir, (b) type matriciel et (c) revêtement du type matriciel (Burgain *et al.*, 2011).



La co-encapsulation peut être un outil efficace pour le piégeage des deux ingrédients prébiotiques et probiotiques dans la même capsule pour renforcer la croissance et la multiplication de ces bactéries par des effets symbiotiques quand ils sont libérés dans le tractus gastro-intestinal. Cette technique peut être modifiée pour encore augmenter le niveau de protection qu'elle offre par exemple, elle pourrait être étendue à la double encapsulation par le revêtement des billes coencapsulées (qui contiennent déjà des probiotiques plus l'alginate, plus le prébiotique) avec un autre matériau de revêtement tel que les polymères de chitosane, alginate et carraghénane. Le protecteur supplémentaire offre à la double encapsulation un avantage sur les deux méthodes précédentes. Bien que les prébiotiques fournissent la source d'hydrates de carbone et l'alginate fournit la couche pour retenir les probiotiques dans les microcapsules, les polymères supplémentaires assureront que la surface des probiotiques soit entièrement couverte (Akhiar, 2010; Kailasapathy, 2002).

Du fait de la grande taille des cellules probiotiques qui est typiquement entre 1 et 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, cela exclut d'emblée la nanoencapsulation. Les microcapsules ont la capacité de préserver les probiotiques à l'état finement dispersé et de ne les libérer que si les circonstances l'exigent et leur contenu est libéré par une variété de mécanismes : soit rompu mécaniquement, fondu thermiquement ou dissout chimiquement (Burgain *et al.*, 2011; Kunz et Krämer, 2003).

## II. 2. Les différentes matrices utilisées pour la microencapsulation :

Les biopolymères ; protéines, polysaccharides et lipides constituent des matériaux de choix pour l'encapsulation. Pour l'encapsulation des bactéries probiotiques viables, les supports utilisés devrait être doux et non toxiques que ce soit pour les cellules encapsulées ou pour la santé du consommateur. Généralement des biopolymères, comme l'alginate, la gomme gellane, la gomme de xanthane,  $\kappa$ -carraghénane et, plus récemment, les protéines du lactosérum sont utilisées comme matériaux de matrice pour la microencapsulation (Heidebach *et al.*, 2009; Subirade et Maltais, 2008; Lakkis, 2007; Kailasapathy, 2002).

### II. 2. 1 L'alginate

L'alginate est l'un des polymères les plus utilisés pour l'encapsulation des probiotiques, c'est un hétéropolysaccharide linéaire composé des acides  $\beta$ - D- mannuronique et  $\alpha$ -L- guluronique relié par une liaison  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 4, il est extrait des parois cellulaires ou des espaces intercellulaires des algues brunes (Meiners, 2010; Soma *et al.*, 2009; Petrović *et al.*, 2007).

Les propriétés fonctionnelles de l'alginate comme matériau de revêtement sont intimement liées avec la composition et la séquence de ces deux acides. L'acide alginique, l'acide libre à partir de l'alginate, est le produit intermédiaire dans la fabrication commerciale des alginates et a une stabilité limitée, afin de le rendre plus stable et plus soluble dans l'eau il est transformé en une gamme d'alginates commerciale en intégrant différents sels : Na, K,  $\text{NH}_4$ , Mg, et Ca. L'alginate est également un additif alimentaire accepté et peut être utilisé sans danger dans les aliments (Ariful *et al.*, 2010; Chávarri *et al.*, 2010 ; Lakkis, 2007; Petrović *et al.*, 2007; Kunz et Krämer, 2003).

L'alginate est l'agent commun le plus utilisé pour l'encapsulation des bactéries probiotiques, qui est principalement attribué à sa formation facile de capsules et la libération de bactéries probiotiques par chélation dans un tampon phosphate ou de citrate de sodium. En plus de sa simplicité, non toxicité, biocompatibilité, propriété muco-adhésive et le coût bas, la solubilisation des gels d'alginate par la séquestration des ions de  $\text{Ca}^{++}$  et la livraison des cellules prises au piège dans l'intestin humain est un autre avantage. Les concentrations de l'alginate de Na et du  $\text{CaCl}_2$  utilisées pour former les billes varient et sont établis entre 1 et 3% d'alginate avec 0.05~ 1,5 M  $\text{Ca Cl}_2$  (Burgain *et al.*, 2011; Soma *et al.*, 2009; Lakkis, 2007).

### II. 2. 2 La carraghénane :

La carraghénane est un polysaccharide linéaire naturel qui remplit les vides de la structure cellulosique de la paroi des algues rouges. Il a une masse moléculaire élevée constituée de répétitions d'unités de 3,6 anhydrogalactose (3,6 AG), à la fois sulfaté et ester-sulfaté, rejoint par une alternance des liaisons  $\alpha$ -1,3 et  $\beta$ -1,4 glycosidiques. Divers arrangements se produisent naturellement dans ses composants et créent trois types de base de carraghénane, communément dénommé kappa ( $\kappa$ ), iota ( $\iota$ ) et lambda ( $\lambda$ ) formant une famille d'hydrocolloïdes qui ont des propriétés différentes. Les variations de ces composants influencent la force du gel, la texture, la solubilité et les températures de fusion (**Kunz et Krämer, 2003**).

Les températures élevées (de 60 à 80 °C) sont nécessaires pour dissoudre le polymère à des concentrations allant de 2 à 5%. Même s'il ya des différences entre chaque type de carraghénane, tous sont solubles à des températures élevées et sont stables au dessus du pH 4,5. La formation de gel en utilisant ce polymère se fait par le changement de température. La suspension cellulaire est mélangée avec la solution de ce polymère stérilisé par la chaleur à 40-50 °C et la formation de gel s'opère par le refroidissement à la température ambiante. Les microcapsules sont stabilisées par l'addition des ions de K sous forme de KCl (**Soma et al., 2009; Anal et Singh, 2007; Lakkis, 2007; Mortazavian et al., 2007**).

### II. 2. 3 La gomme arabique :

La gomme arabique est un polysaccharide composé d'un arrangement très ramifié des sucres simples : galactose, arabinose, rhamnose des acides glucuroniques et contient également un composant protéique (2%) lié de façon covalente dans son arrangement moléculaire qui joue un rôle crucial dans la détermination des propriétés fonctionnelles de cette gomme.

Elle est autrement appelée la gomme d'acacia qui est un hydrocolloïde produit par l'exsudation naturelle des arbres d'acacia et c'est un agent efficace d'encapsulation des probiotiques en raison de sa solubilité dans l'eau, sa faible viscosité des solutions concentrées par rapport à d'autres gommes d'hydrocolloïdes, sa capacité d'agir en tant qu'agent émulsifiant et par rapport à la plupart des autres polysaccharides, la gomme d'acacia est extrêmement résistante aux divers traitements physico-chimiques, en particulier dans des conditions acides (**Kunz et Krämer, 2003**).

### II. 2. 4 Le chitosane

Le chitosane est un bipolymère polysaccharidique, le produit N-désacétylé de la chitine qui se trouve dans la paroi cellulaire des champignons. Il s'agit d'un biopolymère biocompatible, biodégradable par la microflore du colon et non-toxique pour les cellules humaines mais sa propriété antibactérienne a limité son utilisation comme un matériau de revêtement pour l'encapsulation des probiotiques. De ce fait le chitosane a été utilisé pour enrober les microcapsules de l'alginate à cause de la faible stabilité de ce dernier en présence des agents chélateurs et dans des conditions acides de pH inférieur à 2 ainsi les systèmes chitosane-alginate améliorent la stabilité des billes d'alginate et augmentent la viabilité des microorganismes probiotiques encapsulés (**Chávarri et al., 2010; Soma et al., 2009; Anal et Singh, 2007; Kailasapathy, 2002**).

### II. 2. 5 Les protéines du lactosérum et la présure

Les microcapsules des probiotiques à base d'hydrocolloïdes comme l'alginate ou la carraghénane qui sont d'origine non-laitière peu souhaitables sont incompatibles avec les produits laitiers ceci est dû à de la grande taille des billes qui est néfaste pour la qualité sensorielle du produit enrichi donc pour y remédier, l'utilisation des protéines du lait comme matrice serait appropriée car elles offrent un niveau adéquat des propriétés physico-chimiques comme agent d'encapsulation dans les applications alimentaires et au cours du traitement, du stockage et en particulier du transit gastrique.

Un autre moyen de maintenir la viabilité des cellules probiotiques est l'incorporation de ces bactéries dans la présure du fromage qui est une enzyme protéolytique complexe composée essentiellement de la chymosine, ceci offre un exceptionnel effet de protection des bactéries probiotiques durant le passage dans le tractus gastrointestinal (**Heidebach et al., 2009**).

### II. 2.6 L'amidon

L'amidon est un polysaccharide composé d'un grand nombre d'unité de glucose par des liaisons glucosidiques. L'amidon est constitué principalement de l'amylose rejoint par une liaison  $\alpha$ -1-4 glucosidiques et l'amylopectine, lié par une liaison  $\alpha$ -1-4 glucosidiques et une liaison  $\beta$ -1-6 glycosidiques. L'amidon résistant est l'amidon qui n'est pas digéré par les enzymes pancréatiques (amylases) dans l'intestin grêle. L'amidon résistant peut atteindre le colon où il sera fermenté. Cette spécificité assure une bonne caractéristique de livraison entérique qui assure une meilleure livraison des cellules bactériennes dans le gros intestin. En outre, par sa fonctionnalité prébiotique, l'amidon résistant peut être utilisé par les bactéries probiotiques dans le gros intestin. Enfin, l'amidon résistant est une surface idéale pour l'adhésion des cellules probiotiques et ce qui peut améliorer la prestation des probiotiques dans un état viable et d'un état métabolique actif à l'intestin. (**Burgain et al., 2011**).

### II. 2.7 Autres matrices

Les gommés telles que la gellane, xanthane, l'agar, la gomme de caroube, et les polysaccharides citant la pectine et les dérivés de cellulose comme le CAP, CMC et MCC ont aussi été utilisés comme matrice pour l'encapsulation des probiotiques (**Soma et al., 2009; Kim et Lee, 2009; Lakkis, 2007; Anal et Singh, 2007**).

En outre les matériaux de revêtement ont été perfectionnés et des technologies ont été développées pour la microencapsulation des BL par le biais de l'utilisation des gels mixtes entre autres : l'alginate plus la pectine plus les protéines du lactosérum ou les gels d'hydrocolloïdes plus l'amidon et d'autre part l'utilisation de gels mixtes de  $\kappa$ -carraghénane plus l'agar (**Kim et Lee, 2009; Anal et Singh, 2007**).

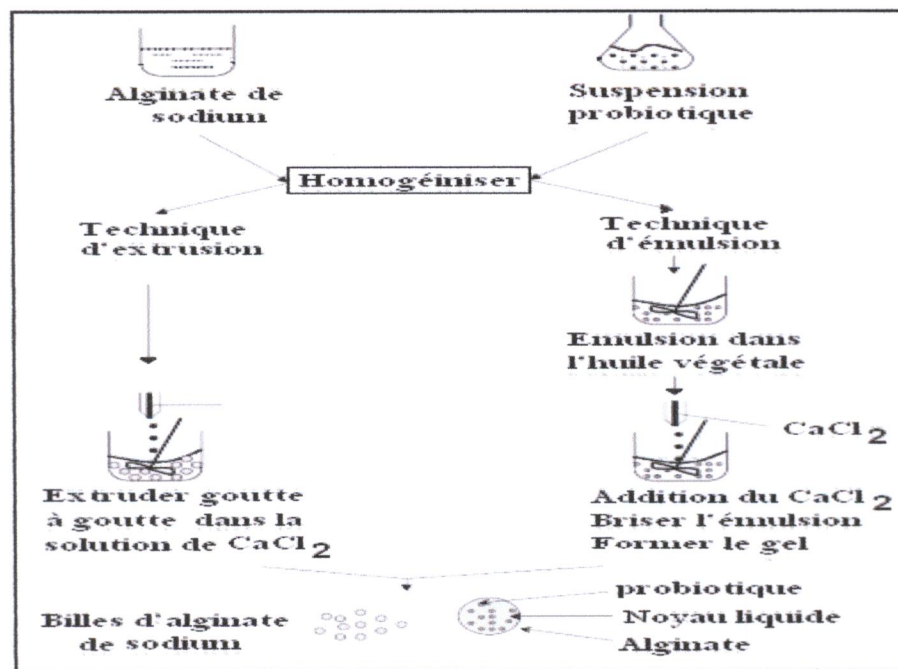
### II. 3. Les techniques de microencapsulation des probiotiques :

Le **tableau 3** représente les techniques les plus couramment utilisés dans la microencapsulation des probiotiques qui sont l'émulsion, l'extrusion et le séchage par atomisation. La taille des microcapsules obtenues est importante parce qu'elle influence les propriétés sensorielles des aliments, ce dernier aspect a joué un rôle crucial dans la sélection des technologies appropriées à la ME (**Rokka et Rantamäki, 2010; Champagne et Fustier, 2007**).

**Tableau 3 : Les différentes techniques appliquées pour la microencapsulation des probiotiques (Rokka et Rantamäki, 2010).**

Techniques	Matrices	Taille des capsules
Techniques D'extrusion	2% alginate	1.62 mm
	3% $\kappa$ - carraghénane	
	2% alginate + 2% amidon	
	2-4 % alginate	
Techniques D'émulsion	2% alginate + 2% amidon	0.5-1 mm
	1% gomme arabique, gomme de gellane.	30, 17 et 10 $\mu$ m
	2% $\kappa$ -carraghénane	5-100 $\mu$ m
Techniques De séchage Par atomisation	Gomme d'acacia (gomme arabique) 10% protéines du lactosérum 20% lait écrémé	5-15 $\mu$ m 5-80 $\mu$ m

Les technologies d'encapsulation des probiotiques peuvent être divisé en deux parties : premièrement, la microencapsulation de probiotiques dans les solutions d'encapsulation et deuxièmement, le séchage des solutions d'encapsulation pour obtenir des poudres cellulaires encapsulées ou granulées. Les techniques d'extrusion et d'émulsion, qui ont également été appelés des méthodes de système à deux phases, sont des méthodes de base pour l'encapsulation de micro-organismes probiotiques représentées par la **figure 4 (Mortazavian *et al.*, 2007)**.



**Figure 4 : Représentation schématique des techniques d'encapsulation par les méthodes d'extrusion et d'émulsion (Von Mellendorff, 2008)**

### II. 3.1 L'extrusion

Les techniques d'extrusion sont basés sur la formation de capsules hydrocolloïdales; l'alginate, la carraghénane, la gomme de caroube, la gomme xanthane plus la gomme gellane, l'alginate plus l'amidon de maïs, et les protéines de lactosérum ont été utilisées comme matériaux pour la microencapsulation des lactobacilles et des bifidobactéries par cette méthode (**Rokka et Rantamäki, 2010; Petrović et al., 2007**).

La microencapsulation par extrusion implique le passage d'une solution d'hydrocolloïde visqueuse inoculée avec la suspension de bactéries à travers l'aiguille d'une seringue, des gouttelettes se forment en contact avec une solution de durcissement composé de cations polyvalents (généralement sous forme de chlorure de calcium). La taille et la forme des capsules est influencée par plusieurs facteurs tels que le type d'alginate, sa concentration et par conséquent, la viscosité de la solution d'alginate, la distance de chute libre et le diamètre de l'orifice de l'extrudeur (aiguille) (**Mortazavian et al., 2007**).

### II. 3.2 L'émulsion :

La technique d'émulsion a été appliquée avec succès pour la microencapsulation des bactéries lactiques, son principe est basé sur la relation entre les phases continues et celles discontinues. Un petit volume de la suspension cellules-polymère (la phase discontinue) est ajoutée à un volume élevé d'huile et alors homogénéisée pour former une émulsion de l'eau dans l'huile. Une fois que l'émulsion formée, le polymère soluble dans l'eau doit être insolubilisé pour former les billes dans la phase huileuse, l'émulsion est alors rompue par l'ajout de  $\text{CaCl}_2$  ou  $\text{KCl}$  et les microcapsules formées sont collectées par centrifugation. Il a été rapporté que la concentration et la viscosité du mélange d'encapsulation avant la gélification et sa vitesse d'agitation ainsi que le type d'émulsifiant utilisée sont les principaux paramètres qui contrôlent le diamètre des microbilles formées (**Rokka et Rantamäki, 2010; Mortazavian et al., 2007; Lakkis, 2007**).

Pour l'encapsulation des probiotiques par émulsion, une matrice, une huile végétale, un émulsifiant et un surfactant sont nécessaires : l'huile végétale comme l'huile de soja, l'huile de tournesol ou l'huile de maïs, pour l'émulsifiant le tween 80 peut rompre les émulsions, un surfactant comme le lauryle sulfate de Na (SLS) est utilisé pour diminuer la tension de surface de la matrice de revêtement a fin de réduire la taille des billes (**Petrović et al., 2007; Lakkis, 2007**).

### II. 3.3 Le séchage :

Le séchage des probiotiques afin de produire des poudres cellulaires / granulées peut être réalisé par différentes méthodes, les plus importantes sont le séchage par atomisation et la lyophilisation. Dans la première méthode les capsules sont obtenues sous forme de poudre sèche, cette technologie est économique et efficace mais peu appliquée en raison de la forte mortalité des cultures lactiques probiotiques résultant de la déshydratation et l'inactivation thermique simultanées ainsi la lyophilisation qui se base sur des températures basses cause des pertes minimales de cellules par rapport aux autres techniques (**Rokka et Rantamäki, 2010; Mortazavian et al., 2007; Anal et Singh, 2007**).

## II. 4. Effet de divers matrices d'encapsulation sur la viabilité des probiotiques

Plusieurs effets de l'encapsulation sur la survie des bactéries probiotiques sous les conditions gastro-intestinales ont été démontrés. Le taux de survie des cellules encapsulées est fortement dépendant du type et de la concentration de la matrice utilisée, la taille des billes, le nombre de cellules initiales et de la souche bactérienne. La majorité des études ont prouvé l'efficacité des probiotiques encapsulées par rapport aux cellules libres sous les conditions gastro-intestinales simulées *in vitro*. Différents matériaux de revêtement comme l'alginate de sodium, la gomme de

gellane/xanthane, la gomme arabique et les protéines de lactosérum montrent une bonne protection des probiotiques encapsulés sous les conditions gastro-intestinales (**Lakkis, 2007**).

L'efficacité de la microencapsulation est concernée par l'entretien de la viabilité des probiotiques contre les facteurs de stress néfastes tels que l'acidité qui peut être mesurée par le test de la cinétique de la perte de cellules dans les produits et / ou les conditions simulées du corps humain parce que les conditions dans les produits fermentés comme le yaourt ne sont généralement pas stables en raison de l'activité métabolique des ferments lactiques pendant la durée de stockage (**Mortazavian et al., 2007**).

## II. 5. Facteurs influençant sur l'efficacité de la microencapsulation des probiotiques

Différents paramètres peuvent être pris en considération pour l'évaluation de l'efficacité du procédé d'encapsulation des probiotiques tels que la viabilité qui fait face à des conditions environnementales néfastes, la libération de cellules / la capacité de récupération et le temps de durcissement (temps nécessaire pour la formation des capsules). Différents facteurs sont mentionnés ci-dessous (**Mortazavian et al., 2007**) :

- **L'enrobage des capsules** : le revêtement des capsules est un moyen efficace pour améliorer leurs caractéristiques physico-chimiques et leur résistance mécanique. Par exemple, l'enrobage des capsules d'alginate les rend plus résistantes aux agents de chélation des ions de calcium.
- **Concentration des solutions productrices des capsules et le diamètre des billes** : La concentration de la matrice d'encapsulation et le diamètre final des billes sont des facteurs importants dans l'efficacité de l'encapsulation. En parallèle avec l'augmentation de diamètre des capsules, l'effet protecteur contre les facteurs environnementaux hostiles augmente dans les produits et le corps humain, plus spécifiquement contre les conditions gastrointestinales et la digestion par les enzymes pancréatiques.
- **Effet des bactéries sur les capsules** : Il y a un rapport entre la digestion de l'amidon des capsules et les bactéries par conséquent, avant la sélection d'un matériau pour l'encapsulation, la capacité de la digestion de l'amidon par ces bactéries doit être prise en considération.
- **Modification des matériaux d'encapsulation** : La modification des matériaux d'encapsulation est réalisée pour améliorer l'efficacité de l'encapsulation. La modification structurelle des matériaux pourrait être directe par des changements structurels et/ou l'ajout d'additifs spéciaux. L'addition du glycérol comme agent cryoprotecteur donne aux billes la capacité de protection contre la cristallisation par la glace qui se fixe aux molécules d'eau libre.
- **La concentration initiale des cellules microbiennes** : Il est important de signaler que la concentration de cellules microbiennes dans la solution d'encapsulation augmente quantitativement l'efficacité de l'encapsulation.
- **Condition de traitement** : Une attention spéciale doit être faite sur les facteurs de transformation au cours du procédé de la microencapsulation tels que le gel (gel cryogénique ou lyophilisation), le séchage par atomisation, micronisation et les conditions de stockage. En outre, les facteurs du processus peuvent influencer les paramètres importants tels que le diamètre des billes.

## II. 6. Avantage de la microencapsulation des probiotiques

Sur le plan industriel, la ME est mise en œuvre pour remplir les objectifs suivants (**Richard et Benoit, 2000**) :

- Assurer la protection, la compatibilité et la stabilité des probiotiques dans une formulation
- Réaliser une mise en forme active pour obtenir, adapter et améliorer la présentation d'un produit
- Masquer un goût ou une odeur

- Modifier et maîtriser le profil de la libération des probiotiques pour obtenir un effet prolongé ou contrôlé.

## II. 7. Domaines d'application des probiotiques encapsulés

Les probiotiques sont un lien entre un régime en aliment fonctionnels et la santé. À la suite de plusieurs enquêtes dans le domaine des probiotiques, son concept a été élargi pour inclure des bactéries d'origine intestinale à côté des cellules bactériennes isolées de produits laitiers fermentés. On croit maintenant que les aliments traditionnels fermentés sont la source inexploitée pour une grande variété de microorganismes probiotiques bénéfiques (Mahasneh et Abbas, 2010).

La recherche scientifique concernant l'utilisation de cellules bactériennes vivantes encapsulées à des fins thérapeutiques est en croissance rapide au cours des dernières années et a suscité un intérêt considérable pour les scientifiques et les professionnels de la santé. En raison de leurs effets bénéfiques considérables sur la santé, ces micro-organismes sont de plus en plus intégrés dans des produits laitiers fermentés (Ariful *et al.*, 2010).

### II.7.1 Les probiotiques encapsulés dans les produits alimentaires

Les aliments fonctionnels sont des produits qui ont été enrichis avec les nutriments ajoutés ou d'autres substances qui sont considérées comme offrant des avantages pour la santé au-delà de leur valeur nutritionnelle. Ce terme couvre une large gamme de produits : des exemples typiques sont les probiotiques et les prébiotiques qui sont des leaders dans les ventes dans la catégorie des aliments fonctionnels (Cruz *et al.*, 2010). Le tableau 4 présente quelques produits alimentaires contenant les cellules probiotiques encapsulées qui ont été introduits dans le marché ces dernières années :

**Tableau 4 :** Exemples de l'utilisation des probiotiques encapsulées pour les applications industrielles (Burgain *et al.*, 2011).

Produit alimentaire	société	observations	Site web
Chocolat probiotique	Institut Rosell & LalFood	Assure l'équilibre de la microflore intestinale	<a href="http://www.LalFood.com">www.LalFood.com</a>
Probio'stick		Produit en pure qui contient des souches de <i>Bifidibacteria</i> et <i>Lactobacillus</i> pour réduire les symptômes liés au stress	
yaourt	Blachlem Encapsulats & Institut Rosell	La livraison des probiotiques est à 100%	<a href="http://www.balchlem.com">www.balchlem.com</a>
Tablettes Bio-tract <sup>®</sup>	Nutraceutix	Protège les cellules probiotiques vivantes des conditions acides de l'estomac	<a href="http://www.nutraceutix.net">www.nutraceutix.net</a>
Capsules probio-Tec <sup>®</sup>	Chr Hansen	Additif alimentaire	<a href="http://www.chr-hansen.com">www.chr-hansen.com</a>
Jus d'orange «Dawn»	Chr Hansen & Kerry Group	Le premier jus d'orange probiotique irlandais	
Crème glacée probiotique	Chr Hansen & Dos Pinos	Yaourt glacé avec plusieurs bienfaits pour la santé	
Doctor-Capsule (yaourt)	Bingrae Co.Kyunggi-do	Yaourt coréen contenant les BL tel que <i>Bifidobacteria</i>	<a href="http://www.ghthealth.com">www.ghthealth.com</a>
Attune (chocolat)	DMS Food Specialities	Contient les probiotiques plus l'inuline comme prébiotique	<a href="http://www.attunefoods.com">www.attunefoods.com</a>
Geneflora <sup>™</sup>	BioPlus Corporation	Produit symbiotique contenant le probiotique <i>Lb. Sporogenes</i> et le fructo-oligosaccharide comme prébiotique	<a href="http://www.yeastbuster.com">www.yeastbuster.com</a>

### II.7.1.1 Les produits laitiers

Les probiotiques ont souvent une faible viabilité dans les produits laitiers en raison de la forte concentration de l'acide lactique et l'acide acétique, un pH bas, et la présence de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène (**Rokka et Rantamäki, 2010**).

- **Fromages**

De nombreuses études ont rapporté l'utilisation des probiotiques encapsulés et en particulier dans le fromage Cheddar. En raison d'un pH relativement élevé (pH 5.5), le fromage Cheddar présente les avantages d'être un bon porteur de micro-organismes probiotiques. De plus, sa bonne capacité tampon et son contenu relativement riche en matières grasses peuvent offrir une protection aux bactéries probiotiques contre la dégradation enzymatique et l'environnement acide de l'appareil digestif. L'ajout des cellules immobilisées dans le fromage n'a pas été uniforme, mais leur survie n'a pas été affectée. En effet, les cellules restent viables jusqu'à 24 semaines et n'a pas d'incidence sur la saveur, l'intensité, la texture et l'aspect du fromage. Deux souches de probiotiques (*Lb. acidophilus* et *B. bifidum*) ont été incorporées dans le fromage Kasar en utilisant les technologies d'extrusion ou d'émulsion, aucune différence n'a été notée entre les deux techniques lorsque l'on considère le nombre de bactéries viables et sur les propriétés de protéolyse et organoleptique du produit final. Dans une autre recherche on conclut que la ME peut être un bon moyen pour améliorer la viabilité des probiotiques dans le fromage de type Kasar (**Burgain et al., 2011**).

- **Yaourt**

L'incorporation des cellules vivantes probiotiques dans le yaourt améliore sa valeur thérapeutique. Cependant, il y a un faible niveau de la viabilité des probiotiques dans le yaourt, à cause du pH faible « 4,2 à 4,6 ». La viabilité de bifidobactéries sensibles aux acides dans le yaourt peut être augmentée par la microencapsulation, mais son effet dépend de la souche. Des études ont indiqué que dans le yaourt un nombre élevé des bifidobactéries encapsulées dans la carraghénane, gellane-xanthane, ou de l'alginate et l'amidon résistant, et certaines des cellules encapsulées dans les protéines de lactosérum restent viables, alors que le nombre de bactéries libres diminue significativement. L'alginate a prouvé qu'il offre une meilleure protection des bactéries probiotiques dans le yaourt par rapport aux protéines du lactosérum (**Rokka et Rantamäki, 2010; Lakkis, 2007**).

La ME des probiotiques pour l'addition dans les yaourts semble empêcher les pertes des souches sensibles à l'oxygène en plus de la protection des cellules contre l'environnement acide. Cependant, les consommateurs n'approuvent pas la texture granuleuse dans ces produits qui est un problème majeur pour l'acceptation de ces derniers (**Burgain et al., 2011; Talwalkar et Kailasapathy, 2004**).

- **Desserts laitiers congelés**

Il n'est pas facile d'intégrer des micro-organismes probiotiques dans les desserts surgelés à cause de l'acidité élevée dans le produit, la pression osmotique élevée, des dommages par gel et l'exposition à l'air incorporés au cours de congélation. L'introduction des bactéries probiotiques sous une forme encapsulée dans des desserts congelés peut surmonter ces difficultés et pourrait produire des marchés intéressants et des bienfaits pour la santé. L'encapsulation des lactobacilles dans l'alginate-Ca prévoit un taux de survie plus élevé (40%) par rapport aux cellules libres, lors de la congélation de la crème glacée (**Burgain et al., 2011**).

### II.7.1.2 Les produits non laitiers

La plupart des produits contenant des cellules probiotiques sont les produits laitiers et il est nécessaire de développer d'autres transporteurs alimentaires pour les probiotiques en raison de l'intolérance au lactose dans certaines populations. Des efforts ont été faits pour identifier de nouveaux porteurs alimentaires. Lorsque les probiotiques sont ajoutés aux produits non-laitiers, les



facteurs comme l'activité de l'eau, la tension d'oxygène et la température deviennent important pour leur stabilité d'où l'utilisation des probiotiques encapsulés dans ces produits. Par exemple, une mayonnaise de bonne qualité a été obtenue avec l'incorporation des bifidobactéries encapsulé par l'alginate de calcium qui offre une protection pour ces probiotiques contre les effets bactéricides de vinaigre. D'autres avantages peuvent être proposés lors de l'utilisation des cellules probiotiques encapsulées telles que l'inhibition de la croissance des levures plus de 10 semaines (probablement à cause de l'effet antibactérien des probiotiques) et l'amélioration de la qualité sensorielles de la mayonnaise. Dans les jus de fruits et légumes tels que le jus de pomme et des tomates, il a été démontré que des probiotiques microencapsulés améliorent la qualité sensorielle et résistent d'avantage au pH acide même pendant plusieurs semaines de stockage.

Plusieurs études ont démontrées que l'utilisation des probiotiques ME dans le chocolat donne un taux de survie trois fois plus élevé dans l'intestin grêle que lorsqu'il sont incorporés dans les produits laitiers, mais le défi majeur est l'obtention d'un processus qui est compatible avec la survie des probiotiques a cause des températures élevées exigées dans le processus industriel qui a été surmonté par l'encapsulation avec les protéines de lactosérum et la fraction lipidique du cacao qui offrent une protection contre les conditions défavorables (Burgain *et al.*, 2011; Rokka et Rantamäki, 2010).

### II.7.2 Les probiotiques encapsulés dans les produits pharmaceutiques

La microencapsulation de cellules bactériennes vivantes a reçu l'intérêt des recherches actuelles en raison de sa croissance et de son potentiel promoteur dans des applications contre de nombreuses maladies. Actuellement, il existe approximativement 100 types d'organismes probiotiques produits par le marché chinois par exemple, en majorité commercialisé comme ingrédients d'aliments fonctionnels. Des essais cliniques ont été effectuées pour environ 10% des produits probiotiques, et des derniers ont été approuvé par les autorités chinoises de réglementation pour être commercialiser en tant que produits pharmaceutiques, parmi les plus importants sont présentés dans le **tableau 5** (Bhadoria et Mahapatra, 2011; Ariful *et al.*, 2010).

**Tableau 5 :** Les souches probiotiques commercialisées comme produits pharmaceutiques en chine (Bhadoria et Mahapatra, 2011).

Sl. No.	Batérie probiotique	Société
1.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Lichu Drug House
2.	<i>Bifidobacterium longum</i> ; <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Shanghai Sinyi Drug Pte. Ltd.
3.	<i>Enterococcus faecalis</i>	Shansi Haishi Drug Pte. Ltd.
4.	<i>Bifidobacterium longum</i> ; <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>Streptococcus thermophilus</i>	Mongolian Shuanchi Drug Co. Ltd.
5.	<i>Bacillus cereus</i>	Dalian Medical University Tayue Drug Co. Chendu Bioproduct Institute Anyang Yuanshou Biodrug Pte. Ltd.
6.	<i>Bacillus licheniformis</i>	Shenyang First Drug House
7.	<i>Bifidobacterium bifidum</i> ; <i>L. acidophilus</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Bacillus cereus</i>	Jilin Weite Group
8.	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Chongqing Taipin Drug Co. Ltd.
9.	<i>Bifidobacterium infantis</i> ; <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Shantong Kesing Biodrug Pte Ltd.
10.	<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i>	Beijing Hanbei Drug Co.
11.	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	Dalian Medical University
12.	<i>L. acidophilus</i> ; <i>Enterococcus</i>	Jianshu Taizhou Drug House
13.	<i>Bacillus subtilis</i>	Harbin
14.	<i>L. plantarum</i>	Shanghai Jiaotong University
15.	<i>Bifidobacterium</i> ; <i>Lactobacillus</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i>	Shantong Jinan Sanzhu Co.
16.	<i>L. acidophilus</i>	Harbin Taige Co.

# Partie II

## Etude Expérimentale

**Matériels  
et  
Méthodes**

**MATERIEL ET METHODES**

Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Jijel

**I. Matériel****I. 1. Matériel biologique : Bactéries probiotiques**

Deux souches de bactéries probiotiques ont été utilisées à savoir : *Lactobacillus plantarum* isolée du jabot de poulet de chair de souche ISA15 et *Lactobacillus curvatus* B 431 isolé du beurre traditionnel.

**I. 2. Produits et réactifs :**

Milieu MRS (deMan, Rogosa et Sharpe) bouillon et gélose préparés au laboratoire.

L'alginat de sodium de grade alimentaire (Louis François)

HCl 1N

Eau physiologique

Sels biliaires (Institut PASTEUR D'ALGER)

NaOH 1N

Eau distillée

Amidon modifié (le phosphate de diamidon hydroxypropylé E1442) (Danone)

$\kappa$ -carraghénane (Sigma)

Agar-agar (Institut PASTEUR D'ALGER)

Trypsine (Institut PASTEUR D'ALGER)

Pancréatine (Swiss Herbal Remedies )

Chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) 0.05, 01 et 0.5M

Tampon phosphate 1M, pH= 7

Tampon citrate de sodium 2%, pH= 6

Tampon urée pH=7

Tampon PBS pH=7.5

Antibiotiques : Sulforamide (Oxoid), Cefotaxime (Bio-Rad), Tetracycline (Bio-Rad),

Amoxicilin (biodiscs), Streptomycine (Bio-Rad), PenicilinG (Oxoid),

Xylène

Cristal Violet

**I. 3. Appareillage**

pH mètre (Hanna)

Bain marie-agitateur (Falc)

Etuve (Memmert)

Four pasteur (Controls)

Seringues (2.5 ml)

Spectrophotomètre (UV Shimandzu)

Centrifugeuse (Hettich)

Vortex (Minishaker IKA).

Plaque chauffante agitatrice (Bunsen)

Barreau magnétique mc 8 (Bensen)

Balance (Denver)

Filtres (Wathman)

Compteur de colonies (Funke Gerber)

Réfrigérateur (Condor Hisense)

Bain marie (Gerhardt Bonn)

Balance analytique (Kern ALS 220.4N)

Microscope optique de précision (Paralux)

Autoclave (Slli AVX electronic)

## II. Méthodes

### II.1. Revivification des souches bactériennes

La pureté des souches de *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* a été vérifiée sur gélose MRS à partir d'un bouillon MRS. Les boîtes de pétri contenant la gélose MRS préalablement coulée et séchée sont ensemencées par étalement de quelques gouttes de chaque souche, l'incubation est faite à 37°C pendant 24h, la souche est dite pure si on obtient des colonies homogènes de même forme, même taille et même couleur.

### II.2. Préparation des souches probiotiques pour l'encapsulation

Les souches lactiques; *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* ont été cultivées dans le bouillon MRS à 37°C pendant 20h puis les cellules sont recueillies par centrifugation (4000 g pendant 3 minutes). Le culot contenant les cellules bactériennes a été lavé une fois avec de l'eau physiologique et suspendu dans 5 ml d'eau physiologique.

### II.3. Encapsulation des souches probiotiques avec différentes matrices

#### II.3.1. Encapsulation des souches probiotiques dans un gel d'alginate de sodium à 2%

5 ml de la suspension bactérienne ont été mélangés avec 45 ml d'une solution d'alginate de sodium à 2% préalablement autoclavée, et homogénéisés aseptiquement avec un barreau magnétique. Le mélange ainsi obtenu a été introduit dans une seringue stérile. La gélification est faite comme suit : la suspension a été coulée en goutte à goutte dans la solution de coagulation  $\text{CaCl}_2$  (0.05 M) préalablement autoclavée et refroidie, les billes formées étaient ensuite laissées une heure sous une agitation douce afin de compléter l'échange ionique  $\text{Na}^{++}$ - $\text{Ca}^{++}$ . Toutes les opérations étaient réalisées aseptiquement. Les billes étaient alors lavées deux fois avec l'eau distillée stérile afin d'éliminer l'excès de calcium (Boyaval *et al.*, 1985). Les billes d'alginate de sodium ont été maintenues dans du sérum physiologique dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à usage ultérieur.

#### II.3.2 Encapsulation dans l'alginate 2% - amidon 0.5%

L'encapsulation a été réalisée selon la méthode de Boyaval *et al.* (1985) avec quelques modifications, en préparant la solution d'alginate de sodium 2% avec 0.5% d'amidon modifié (le phosphate de diamidon hydroxypropylé E 1442) et en suivant les mêmes étapes de l'extrusion avec l'alginate de sodium déjà décrites dans la section II.3.1.

#### II.3.3 Encapsulation dans l'alginate 2% - agar 2%

La méthode de Morgan *et al.* (1999) avec quelques modifications a été appliqués en réalisant les étapes suivantes :

Préparation d'une solution d'alginate 2% avec l'agar 2% autoclavée et refroidie à 40°C.

Les cellules de chaque souche ont été suspendues dans 4 ml d'eau physiologique et ont été ajoutées goutte à goutte à 3.6 ml de la solution d'agar-alginate à 40°C avec une agitation vigoureuse, 40 ml du mélange obtenue ont été maintenus à 40°C et ont été extrudés à travers l'aiguille d'une seringue. Les gouttelettes sont collectées dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 0.1M avec une agitation pendant 30 min pour le durcissement des billes. Les billes ont été conservées à 4°C dans l'eau physiologique jusqu'à usage ultérieur.

Pour estimer le nombre de cellules piégées dans une capsule les billes ont été lysées dans 4 ml de tampon citrate de sodium à 2% pendant 5 minutes, 1ml de cette solution a été dilué convenablement pour l'ensemencement sur la gélose MRS puis l'incubation à 37°C pendant 48h.

### II.3.4 Immobilisation des souches dans la $\kappa$ -caraghénane à 2%

L'immobilisation des souches avec la  $\kappa$ -caraghénane à 2% a été effectuée selon **Wijffels (2000)**. Une solution de  $\kappa$ -caraghénane à 2% a été préparée puis autoclavée à 120°C pendant 10 min. D'une part cette solution est retenue à 40°C en son état liquide, d'autre part, une suspension de chaque souche a été préparée dans l'eau physiologique, ainsi 2 ml de la suspension bactérienne ont été mélangés avec 20 ml de la solution de  $\kappa$ -caraghénane et homogénéisés en utilisant une plaque chauffante agitatrice et un barreau magnétique, cette mixture sera déversée dans une boîte de pétri et laissée refroidir jusqu'à gélification thermique totale pendant 30 min, puis des cylindres ont été découpés à l'aide d'une seringue stérile. Les billes immobilisées sont conservées dans l'eau physiologique à 4°C.

### II.4. La cinétique de relargage des souches dans le pH acide (pH2)

Les densités cellulaires pour la détermination des taux de relargage des cellules libérées dans le bouillon MRS acidifié ont été suivies en mesurant la densité optique de la culture à 660 nm (UV- visible spectrophotomètre.u-v 160, Shimadzu), selon la méthode modifiée de **Klinkenberg et al. (2001)**. 15 billes de différentes matrices (billes d'alginate conservées durant un mois, billes d'alginate nouvellement préparées, alginate-amidon, alginate-agar et  $\kappa$ -caraghénane) ont été suspendues dans le bouillon MRS acidifié avec du HCl 5M puis incubées à 37°C. Des aliquots ont été prélevés à des intervalles d'une heure pendant 3 heures, cette opération est effectuée pour chaque matrice individuellement puis leurs densités optiques à 660nm ont été mesurées avec l'utilisation du bouillon MRS acidifié comme étalon pour suivre l'évolution des taux de relargage des deux souches séparément.

### II.5. La cinétique de relargage dans le bouillon additionné de 0.3% de sels biliaries

L'étude de l'effet des sels biliaries sur le relargage des différentes matrices a été réalisée comme suit : les mêmes étapes précédemment décrites dans la **section II.4** à deux détails près : les billes sont incubées dans du bouillon MRS additionné de sels biliaries à 0.3% (pH 5.8), les prélèvements sont effectués à (0h, 3h, 5h et 7h).

### II.6. Evaluation des aptitudes probiotiques des bactéries lactiques *in vitro*

#### II.6.1. Tolérance aux acides

La tolérance des souches encapsulées et libres à l'acidité a été réalisée selon la méthode de **Ding et Shah (2009)**. Le pH du bouillon MRS a été ajusté à 2 par du HCl 5M. Environ  $12.10^{10}$  UFC/ml pour les cellules de *Lb. curvatus* encapsulées et  $7.10^{10}$  UFC/ml pour les cellules libres, tandis que  $11.10^{11}$  UFC/ml pour les cellules encapsulées de *Lb. plantarum* et  $14.10^{11}$  UFC/ml pour les cellules libres ont été incubées dans le bouillon MRS acidifié à 37°C pendant 2h. 1 ml de la culture libre et un nombre approprié de billes a été recueilli chaque heure (0h, 1h, 2h) puis les cellules encapsulées ont été libérées à partir des microcapsules par la séquestration des ions de calcium dans 2 ml de tampon phosphate 1M à pH7. Des séries décimales de dilution sont réalisées afin d'effectuer un dénombrement des cellules viables sur gélose MRS, les cultures ont étéensemencées en double puis incubées à 37°C pendant 48h. Ainsi le taux de survie a été estimé par la comparaison entre le nombre initial des cellules viables et celles dénombrées à 1h et 2h.

#### II.6.2. Tolérance aux sels biliaries

La tolérance des souches à la bile a été réalisée selon la méthode de **Ding et Shah (2009)**. Le bouillon MRS contenant 0.3 % de sels biliaries à pH 5.8, est inoculé par  $8 \times 10^{10}$  UFC/ml de *Lb. plantarum* à l'état libre et  $11 \times 10^{10}$  UFC/ml à l'état encapsulé,  $4 \times 10^{10}$  UFC/ml de *Lb. curvatus* à l'état libre et  $7 \times 10^{10}$  UFC/ml à l'état encapsulé. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 8h, des échantillons sont recueillis à 0h, 4h et 8h et des séries de dilutions décimales, ont été réalisées. Pour le dénombrement des cellules viables. Un échantillon de 1ml de chaque dilution est ensemencé sur la gélose MRS et incubé à 37°C pendant 48h.

Pour le dénombrement des cellules encapsulées, les bactéries sont libérées des capsules par séquestration des ions de calcium par le tampon phosphate comme cité précédemment (section II.4.3.1). La tolérance à la bile de chaque souche est déterminée par la comparaison du nombre d'UFC après 8h avec le nombre initial à 0h.

### II.6.3. Tolérance aux enzymes pancréatiques par la simulation des conditions intestinales

La simulation du fluide intestinale (SIF) a été réalisée selon la méthode de **Worahan et al (2010)**. Ce fluide a été préparé avec 9 g/l de NaCl, 10 g/l de pancréatine, 10 g/l de trypsine et 3 g/l de sels biliaires, le pH a été ajusté à 6.5 avec du NaOH. 1 ml des cellules libres et un nombre approprié de capsules a été incubé à 37°C dans cette solution pendant 3h. Trois échantillons pour les cellules libres et encapsulées ont été prélevés aux temps 0h, 1.5h et 3h. La libération des cellules, les dilutions appropriées, l'incubation des cultures et le calcul du taux de survie ont été réalisés comme déjà décrit dans la section II.4.3.1.

## II.7. Evaluation des aptitudes technologiques des bactéries lactiques *in vitro*

### II.7.1. Tolérance à différentes températures

La tolérance de *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* à différentes températures a été évaluée selon la méthode **Mandal et al. (2006)**. Les souches libres et encapsulées ont été testées à une large étendue de température (25°C, 40°C, 50°C et 60°C) avec 40°C pour le contrôle, 1ml de la culture libre a été suspendue dans 10 ml d'eau distillée stérile à pH ajusté à 6.4, ainsi que pour les cellules encapsulées, les échantillons ont été incubés à différentes températures pendant 20 minutes. La libération des cellules, les dilutions appropriées, l'incubation des cultures et le calcul du taux de survie ont été réalisés comme déjà décrit dans la section II.4.3.1.

### II.7.2. Résistance à la conservation au froid

La viabilité de *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* sous réfrigération a été évaluée selon la méthode modifiée de **Brinques et al. (2011)** en conservant 5 ml de la suspension cellulaire libre et encapsulées dans l'alginate dans 25 ml d'eau physiologique stérile. Les cellules dans les deux états sont conservées au réfrigérateur à 4±1°C. Des aliquots de 1 ml ont été pris chaque semaine pendant 15 jours afin de déterminer le nombre total des cellules viables. Les billes ont été dissoutes dans la solution tampon appropriée. Des dilutions appropriées ont été ensemencés sur gélose MRS et incubées à 37°C pendant 48h, les colonies ont été dénombrées pour mesurer le taux de survie.

## II.8. Tests complémentaires pour la confirmation des aptitudes probiotiques

### II.8.1. Test d'adhésion aux cellules épithéliales

Pour étudier l'adhésion des deux souches *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* sur les cellules épithéliales du poulet (souche locale), la méthode de **Lin et al. (2007)** a été appliquée. Cette technique comporte trois étapes principales :

En premier lieu, nous avons préparé une suspension de cellules épithéliales en séparant les cellules d'une portion de l'iléon et du colon ensuite, les fragments sont lavés par la solution PBS et soumis à une réfrigération à 4°C pendant 30 min, la préparation est soumise à 10 lavages par le PBS, suivis d'un repos pendant 3h à 4h. La solution ainsi obtenue subit des dilutions décimales V/9V jusqu'à (10<sup>-4</sup>) puis un examen au microscope optique x100.

Deuxièmement, la préparation des cellules bactériennes âgées d'une nuit après culture sur bouillon MRS et centrifugation à 6000 tours/min, le culot a été suspendu par l'ajout de 2 ml de PBS, des dilutions décimales V/9V jusqu'à (10<sup>-8</sup>) ont été préparées. A partir de cette dernière, on a réalisé une coloration simple avec du violet de gentiane puis observé au microscope optique x100 pour confirmer que le nombre est approximativement  $\geq 10^8$  cellules/ml.

Troisièmement, 1ml de la suspension cellulaire des souches estensemencé sur PBS est mélangé avec 1ml de la suspension des cellules épithéliales, l'incubation est faite à 37°C pendant 45min avec une agitation douce chaque 10 min, puis une goutte de ce mélange est colorée avec du cristal violet 0.5 % pendant 5 min, une observation microscopique x 100 (au moins 15 cellules de BL/cellule épithéliale) a été réalisée.

### II.8.2. Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité a été déterminée selon la méthode décrit par **Iyer *et al.* (2009)**. Le culot bactérien des cultures jeunes des deux souches a été récupéré par centrifugation à 12.000g pendant 5 min à 5°C, les culots sont lavés deux fois puis resuspendus dans 1.2 ml de tampon urée - sulfate de magnésium son pH = 6.5, l'absorbance initiale à 450 nm ( $DO_{initial}$ ) des suspensions bactériennes a été ajustée à 1 approximativement. 0.6 ml de xylène a été additionné doucement à 3 ml de la suspension bactérienne, les suspensions sont incubées à 37°C pendant 10 min suivie d'une agitation par vortex pendant 2 min, après 15 min la phase aqueuse est aspirée par une pipette Pasteur et l'absorbance finale est estimée dans la même longueur d'onde, la diminution de l'absorbance a été prise comme mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire, le pourcentage de l'hydrophobicité est calculé à partir de l'équation suivante :

$$\text{Hydrophobicité \%} = (DO_{initial} - DO_{final}) / DO_{final} \times 100$$

### II.8.3. Etude de la sensibilité des bactéries probiotiques aux antibiotiques

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été appliquée selon **Joffin et Leyral (2006)**, l'inoculum de la souche *Lb. plantarum* est standardisé à une DO à 660nm = 0.08 alors que la souche *Lb. curvatus* à une DO=0.1 puisensemencé par écouvillonnage sur gélose MRS déjà coulée et solidifiée, dans chaque boîte, on a déposé trois disques : nous avons utilisé les antibiotiques suivants : Sulfonamide, Céfotaxime, Tétracycline, Amoxicilline, Streptomycine, Peniciline G, les zones d'inhibition sont mesurées après incubation à 37°C.



**Résultats  
et  
Discussion**

### III. RESULTATS ET DISCUSSION

#### III.1. Aspect et taille des différentes billes

Les deux bactéries probiotiques *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* ont été encapsulées par différentes matrices notamment l'alginate, l'alginate-amidon, l'alginate-agar et la  $\kappa$ -carraghénane. Différentes formes et tailles sont obtenues et qui sont résumées dans les **tableaux 6 et 7** :

**Tableau 6:** Caractéristiques des billes de *Lb. plantarum*

Caractéristiques Matrices	Taille (mm de diamètre)	Aspect	Poids (g)	Nombre de cellules/ bille	Nombre de billes/ml de gel
ALG	2.5	Sphérique	0.0123	$16 \times 10^{10}$	70
ALG-AGAR	2/3	Elliptique	0.008	$15 \times 10^{10}$	70
ALG-Amidon	2	Sphérique	0.0129	$22 \times 10^{10}$	50
$\kappa$ - carraghénane	2/3	Cylindrique	0.0135	n.d	n.d

n.d : non déterminé.

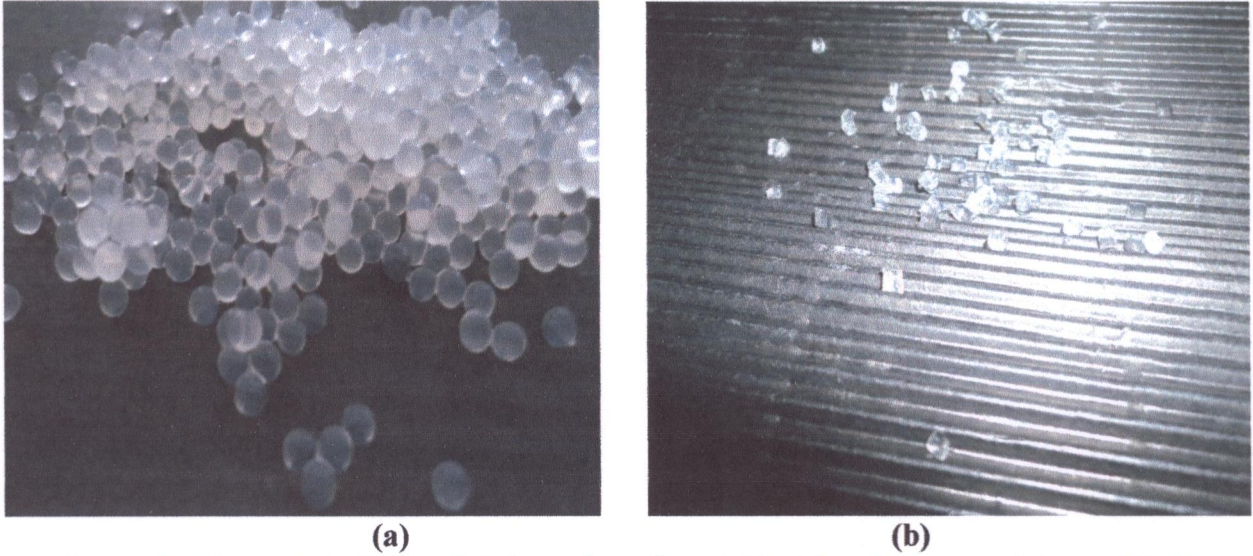
**Tableau 7 :** Caractéristiques des billes de *Lb. curvatus*

Caractéristiques Matrices	Taille (mm de diamètre)	Aspect	Poids (g)	Nombre de cellules/ bille	Nombre de billes/ml pour la ME
ALG	2.25	Sphérique	0.0124	$16 \times 10^8$	70
ALG-AGAR	2.5/3	Elliptique	0.0111	$6 \times 10^8$	70
ALG-Amidon	2	Sphérique	0.0109	$12 \times 10^8$	50
$\kappa$ - carraghénane	2/3	Cylindrique	0.0135	n.d	n.d

n.d : non déterminé.

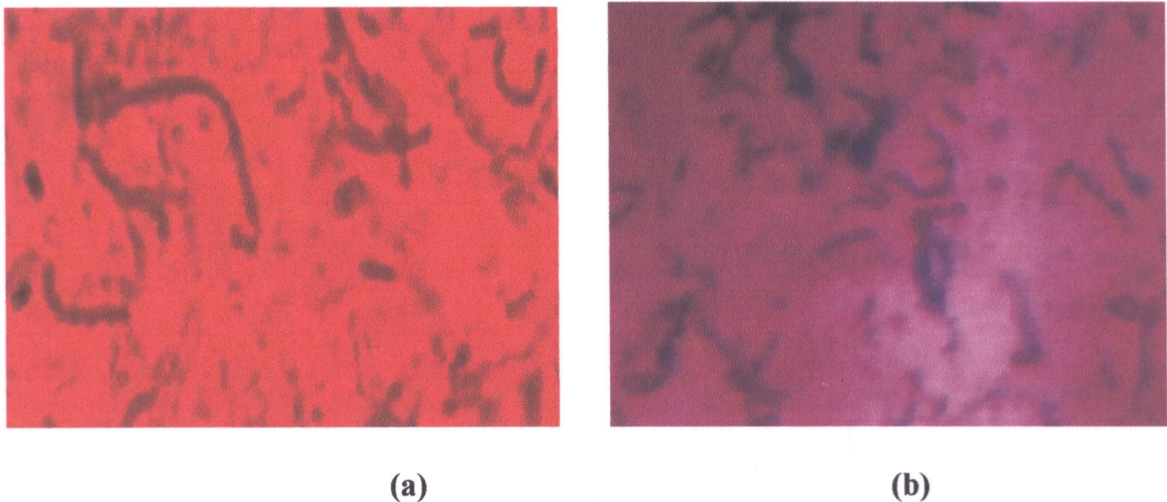
D'après les résultats, les caractéristiques des différents types de billes issues de différents gels ne présentent pas de différences significatives sauf en ce qui concerne le nombre de cellules par bille, où on constate que *Lb. curvatus* se trouve en nombre inférieur à celui de *Lb. plantarum*, ce qui n'influence pas les tests qui vont suivre. La **figure 5** représente l'aspect des billes d'alginate 2% et de  $\kappa$ -carraghénane 2%.

En se basant sur les résultats obtenus, la taille, le poids et la forme des capsules ne varient pas considérablement d'une souche à une autre et d'une matrice à une autre, les petites variations sont probablement dues à des facteurs techniques tels que la distance entre l'orifice de l'aiguille extrudeuse et la solution de durcissement ( $\text{CaCl}_2$ ), en plus de la force d'extrusion mais apparemment, elles sont dues majoritairement aux facteurs liés à la matrice : la concentration, la viscosité, la température de gélification et la nature du polymère utilisée (**Mortazavian et al. 2007; Wijffels, 2000**).



**Figure 5** : L'aspect des billes d'alginate de sodium à 2% (a) et de  $\kappa$ -carraghénane 2% (b)

Pour mettre en évidence la présence des cellules bactériennes dans les billes un examen microscopique d'une coupe horizontale fine d'une capsule d'alginate colorée par la coloration de Gram a été réalisé. L'observation a révélé la présence des lactobacilles dans la matrice d'encapsulation comme le montre la **figure 6**.



**Figure 6** : Photomicrographie des cellules bactériennes de *Lb. plantarum* (a) et *Lb. curvatus* (b) encapsulées dans un gel d'alginate de sodium 2% (G x100).

Le nombre de cellules microencapsulées par bille de gel a été déterminé selon la méthode décrite par **Chàvarri et al. (2010)**, après lyse des billes et dénombrement des cellules viables sur gélose MRS, les résultats sont exprimés en UFC/ml. Le rendement de l'encapsulation (RE), qui est une combinaison entre l'efficacité de l'encapsulation et la survie des cellules durant le procédé de la ME a été calculé comme suite :

$$RE = N/N_0 \times 100 \quad \text{où}$$

N : le nombre des cellules viables libérées à partir des capsules

$N_0$ : le nombre des cellules libres ajoutées à la matrice.

Les résultats des rendements d'encapsulation (RE) des matrices étudiées sont résumés dans le **tableau 8** :

**Tableau 8** : Rendement d'encapsulation par différentes matrices

Matrices / Souches	ALG	ALG-AGAR	ALG-Amidon
<i>Lb. plantarum</i>	78.5%	85.7 %	80%
<i>Lb. curvatus</i>	91.66%	30%	50%

Des rendements d'encapsulation relativement hauts (**78.5, 85.7 et 80%**) ont été obtenus avec les différentes matrices à base d'alginate notamment l'alginate, l'alginate-agar et l'alginate-amidon, respectivement avec *Lb. plantarum*. Cependant, pour *Lb. curvatus*, l'encapsulation dans l'alginate-agar et dans l'alginate-amidon était moins rentable (**30 et 50%**), quant à l'alginate, le rendement était le meilleur (**91.66%**).

Pour expliquer les rendements faibles lors de la ME de *Lb. curvatus* avec l'alginate-agar et l'alginate-amidon, qui sont inférieurs à celui obtenu par l'alginate seul, l'hypothèse suivante est proposée : le gel mixte d'alginate-agar exige une température plus ou moins élevée pour conserver son état liquide durant le processus de la ME par extrusion sans oublier que la solution de  $\text{CaCl}_2$  est maintenue à 4°C, ce qui pourrait provoquer un choc thermique qui aurait diminuer la viabilité des cellules bactériennes qui réduirait l'efficacité du piégeage ce qui nous permettra de dire que cette technique n'était pas réalisée dans les conditions idéales, alors que pour le gel mixte de l'alginate-amidon, nous présumons qu'en raison de la haute viscosité de ce gel qui est plus élevée que celle de l'alginate seul, il y a eu diminution du nombre de billes/ml, à noter qu'il a été de 70 billes/ml pour l'alginate alors que pour l'alginate-amidon de 50 billes/ml seulement ce qui aurait pu influencer le RE mais ces présomptions demandent des études plus approfondies.

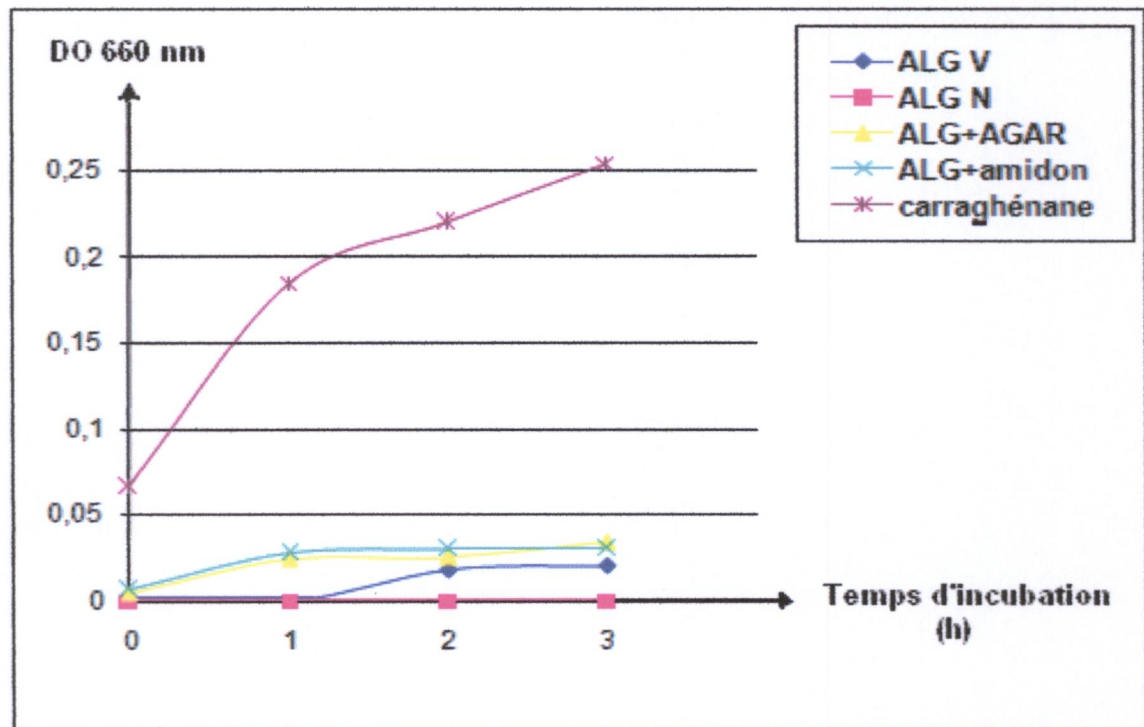
Nos résultats sont proches de ceux obtenus par **Krasaekoopt et al. (2004)** qui ont étudié la forme et la taille des billes formées par l'alginate à 2% pour la microencapsulation de *Lb. acidophilus* 547 et *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1994 parmi d'autres souches, les microcapsules avaient une forme globulaire et leur taille a été de 1.62 mm de diamètre et ceci est dû à l'utilisation d'une extrudeuse dont le diamètre était égal à 0.11 mm. De la même manière, **Chandramouli et al. (2004)** ont encapsulé *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2400, et les capsules résultantes sont sphériques avec un diamètre de 1 mm. Une autre étude a été effectuée par **Sultana et al. (2000)** en encapsulant des cultures de *Lb. acidophilus* et *Bifidobacterium.spp* avec l'alginate 2% - amidon 2% par émulsion, les billes obtenus sont sphériques avec un diamètre qui varie entre 0.5-1 mm de diamètre.

### III. 2. Test de relargage des cellules dans les conditions acides (pH2)

Le test de relargage correspond à la capacité du gel à retenir les cellules à l'intérieur des billes. D'après les résultats montrés par la **figure 7** nous avons remarqué que le taux de relargage après 3h d'incubation dans des conditions acides diffère d'une matrice à une autre ; d'une part le taux de relargage de *Lb. plantarum* des billes d'alginate fraîchement préparées (ALG N) est nul et demeure stable ainsi que pour les billes d'alginate conservées pendant 1 mois (ALG V), où le relargage est infiniment faible (0.02) même après 3 h dans les mêmes conditions.

En ce qui concerne les billes d'alginate-agar et celles d'alginate-amidon ; sachant que les billes d'alginate-amidon sont conservées pendant trois semaines, les taux de relargage sont presque équivalents (0.34 et 0.3 respectivement) mais plus élevés que celui des billes d'alginate, tandis que le taux de relargage des cellules par la  $\kappa$ -carraghénane (0.254) est considérablement

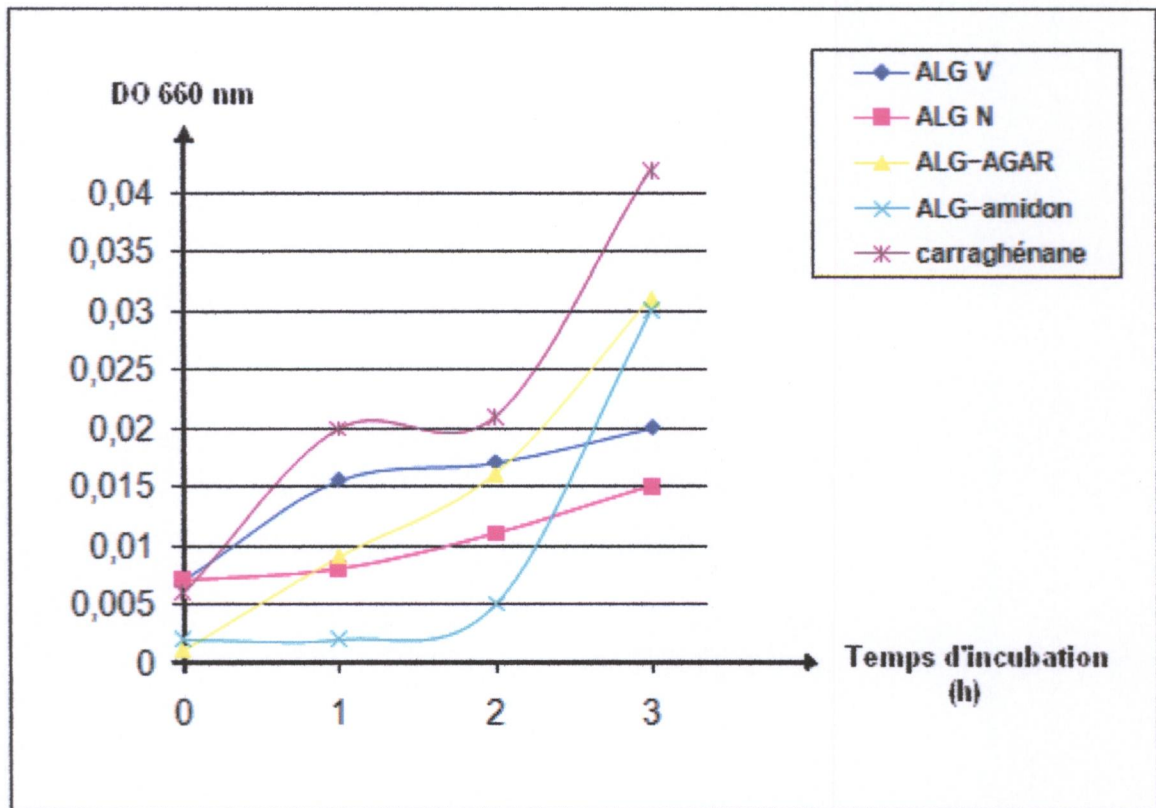
plus élevé que celui des autres matrices ce qui atteint environ 8 fois le taux de relargage par les autres matrices.



**Figure 7:** Effet de l'acidité (pH 2) sur la cinétique de relargage de *Lb. plantarum* encapsulé dans les différentes matrices.

D'autre part, le taux de relargage de *Lb. curvatus* (figure 8) des billes d'alginate fraîchement préparées augmente légèrement mais reste relativement stable pendant les 3h d'incubation et atteint 0.015 mais pour les billes conservées pendant 1 mois, le taux de relargage augmente après une heure d'incubation puis demeure relativement stable durant les deux dernières heures d'incubation (0.02), en précisant que les taux de relargage par les billes d'alginate nouvelles et conservées étaient très proches.

En ce qui concerne les billes d'alginate-agar le taux de relargage augmente progressivement durant les 3h pour d'incubation mais pour les billes d'alginate-amidon le taux de relargage est relativement stable durant les deux premières heures d'incubation et augmente après, en signalant que le taux de relargage est le même pour ces deux dernières matrices après 3h d'incubation et qui est de 0.03. Enfin, pour la  $\kappa$ -carraghénane le taux de relargage augmente après 1h d'incubation, se stabilise durant la deuxième heure et se double durant la troisième heure d'incubation, et il convient de préciser que le taux de relargage par la  $\kappa$ -carraghénane reste toujours le plus élevé où il atteint 0.254.



**Figure 8:** Effet de l'acidité (pH 2) sur la cinétique de relargage de *Lb. curvatus* encapsulé dans les différentes matrices.

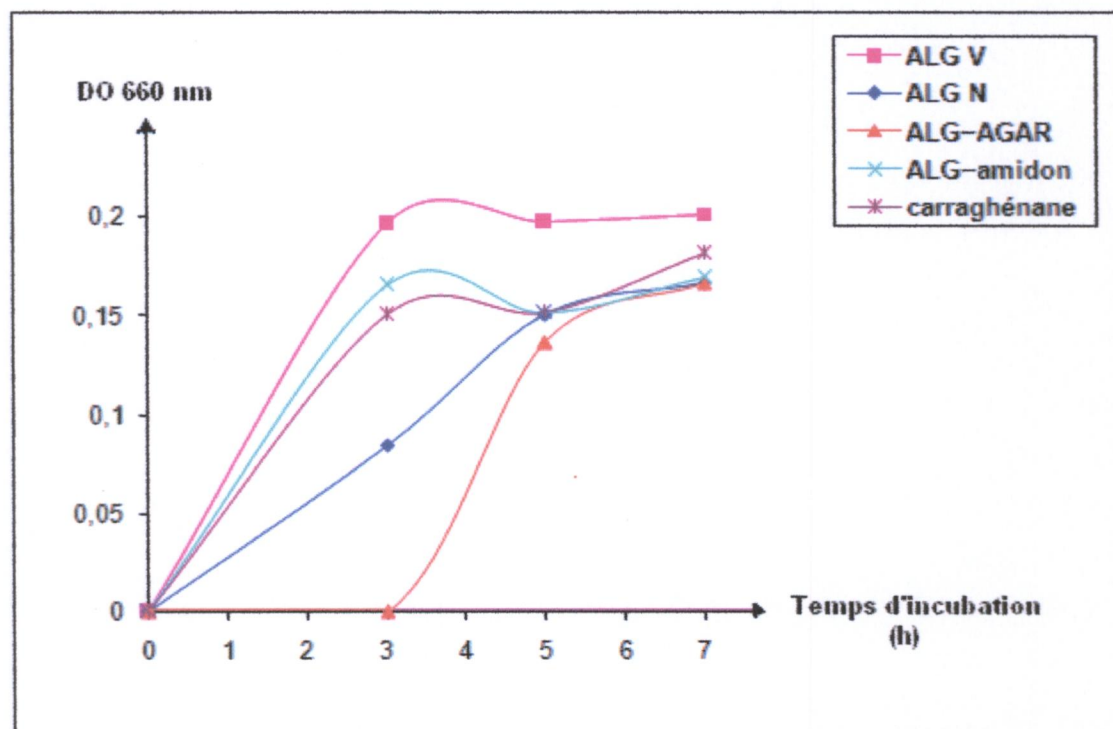
En général, nous avons constaté que la taille des capsules change durant les trois heures de cette expérience : pour les billes à base d'alginate, on a observé un rétrécissement et un durcissement de ces dernières alors que pour la  $\kappa$ -carraghénane une dissolution progressive mais incomplète du polymère est remarqué en fonction du temps d'incubation, donc nous avons conclu que les conditions acides influencent sur la perméabilité des capsules en fonction du temps, alors on peut classer les matrices en fonction de leurs taux de relargage dans le pH 2 par ordre décroissant comme suit : alginate, alginate-amidon, alginate-agar, et  $\kappa$ -carraghénane, et conclure que l'encapsulation est plus efficace que l'immobilisation pour la rétention des cellules grâce au durcissement des capsules durant le procédé de ME qui entrave la libération des cellules à partir des billes plus que pour les cellules immobilisées.

La diffusion est un processus par lequel les ingrédients de concentration déterminée dans une solution diminue spontanément grâce à des mouvements Browniens des molécules individuelle, les systèmes de cellules immobilisées sont considérées comme système hétérogènes refermant une phase aqueuse continue (microorganismes) et une phase dispersées (la matrice), le transfert de biomasse bactérienne est caractérisé par un flux à travers la membrane matricielle qui est contrôlé par la taille et la forme de la capsule, la porosité de la matrice et l'épaisseur de la capsule, ainsi l'incubation des billes formées par différentes matrices dans une solution à pH faible augmente le taux de relargage de cellules par la modification du flux entre l'intérieur de la capsule et le milieu extérieur (Wijffels, 2000).

### III.3. Test de relargage des cellules en présence des sels biliaries à 0,3%

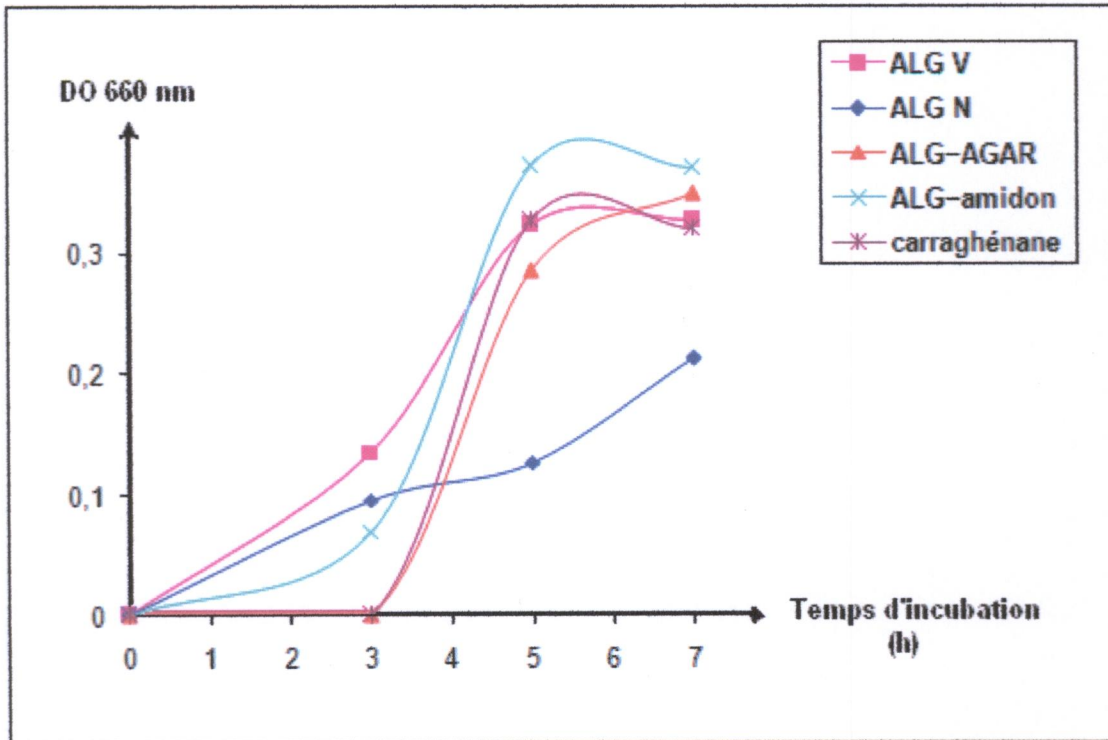
D'après les résultats illustrés par la **figure 9** qui représente les taux de relargage des différentes matrices encapsulant *Lb. plantarum*, on a remarqué que le taux de relargage des billes d'alginate fraîchement préparées augmente progressivement et atteint une valeur de 0,15 après 5h d'incubation alors qu'il se stabilise durant les deux heures d'exposition aux sels biliaries. Cependant les billes d'alginate conservées pendant un mois présentent un taux de relargage plus élevé qui atteint 0,201, en précisant que cette valeur a brusquement augmenté après 3h d'incubation puis, s'est stabilisée durant les 4h restantes. D'un autre coté, les billes d'alginate-amidon et celles de l'alginate-agar montrent des taux de relargage presque équivalents à une différence près concernant l'évolution de la cinétique de relargage; ainsi, les billes d'alginate-agar ne présentent aucun relargage durant les trois premières heures d'incubation tandis que les microcapsules de l'alginate-amidon montrent un taux de relargage croissant durant la même période, puis les capsules d'alginate-agar montrent une augmentation progressive après les quatre dernières heures d'incubation, alors que le relargage des capsules d'alginate-amidon se stabilise et atteint 0,166.

En dernier lieu, le relargage par la  $\kappa$ -carraghénane montre la cinétique suivante : après 3h d'incubation on a remarqué une augmentation croissante, ensuite une stabilisation durant les deux dernières heures qui suivent et finalement une augmentation a été remarquée et le taux de relargage atteint 0,181 à la fin de l'expérience.



**Figure 9:** Effet des sels biliaries sur la cinétique de relargage de *Lb. plantarum* encapsulé dans les différentes matrices.

Pour *Lb. curvatus*, les résultats sont présentés dans la **figure 10**. On a remarqué que le taux de relargage par les capsules d'alginate fraîchement préparées augmente progressivement durant les premières 3h d'exposition aux sels biliaries alors qu'il se stabilise après 5h d'incubation puis augmente légèrement pour présenter une valeur avoisinant 0,2 à la fin de ce test, alors que pour les billes conservées pendant un mois, le relargage avait une augmentation croissante durant les premières 5h d'incubation puis se stabilise pour donner une valeur finale de 0,32 après 7h d'exposition aux sels biliaries.



**Figure 10 :** Effet des sels biliaires sur la cinétique de relargage de *Lb. curvatus* encapsulé dans les différentes matrices

Pour le relargage de cellules par les capsules de l'alginate-agar, ce dernier a été nul durant les premières 3h d'incubation puis augmente considérablement après 2h, puis légèrement jusqu'à atteindre 0.34 après 7h d'incubation avec les sels biliaires. D'autre part, la cinétique de relargage des capsules d'alginate-amidon a suivi une augmentation légère (après 3h d'incubation), puis importante (après 5h d'incubation) et finalement se stabilise à 0.37 durant les deux dernières heures de l'expérience. En ce qui concerne la  $\kappa$ -carraghénane, le taux de relargage des cellules subit une croissance progressive durant 5h d'incubation puis se stabilise pour atteindre une valeur de 0.32 après 7h d'exposition aux sels biliaires.

En général, nous avons remarqué une modification au niveau de la taille des billes pour les différentes matrices. Ainsi, pour les billes contenant l'alginate (seul, alginate-agar et alginate-amidon) il y avait un gonflement avec un ramollissement de ces dernières au cours du temps de l'expérience alors que pour la  $\kappa$ -carraghénane, le gel subit une dissolution importante en fonction du temps d'exposition aux sels biliaires.

Donc, si le taux de relargage diffère d'une matrice à une autre ceci est probablement dû à la texture, la nature, la composition, la viscosité et la structure du gel en ce qui concerne les facteurs liés à la matrice elle-même selon **Mortazavian et al. (2007)**, pour les facteurs liés à la souche elle-même on cite la distribution de la biomasse dans le gel et sa distribution près de la surface de la capsule selon **Klinkenberg et al. (2001)** ainsi que l'interaction entre la souche et la matrice qui est variable d'une souche à une autre selon **Anal et Singh (2007)** et le dernier facteur est l'environnement extérieur avec lequel réagissent les capsules et les cellules qui y sont piégées, par conséquent, l'ajout d'une substance toxique telle que les sels biliaires étudiés précédemment influence le flux de diffusion des cellules à travers la membrane du biopolymère constituant la matrice (**Wijffels, 2000**).



D'après tous les résultats obtenus en étudiant le relargage des cellules par différentes matrices dans les conditions acides et des sels biliaries, nous pouvons nous prononcer sur le fait que l'alginate de sodium à 2% avec son taux de relargage faible ou acceptable; malgré que les microcapsules de *Lb. curvatus* présentent un taux de relargage plus conséquent que *Lb. plantarum*, soit la matrice de choix pour nous investir dans l'étude de l'effet de la matrice sur les aptitudes probiotiques et technologiques de *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus*.

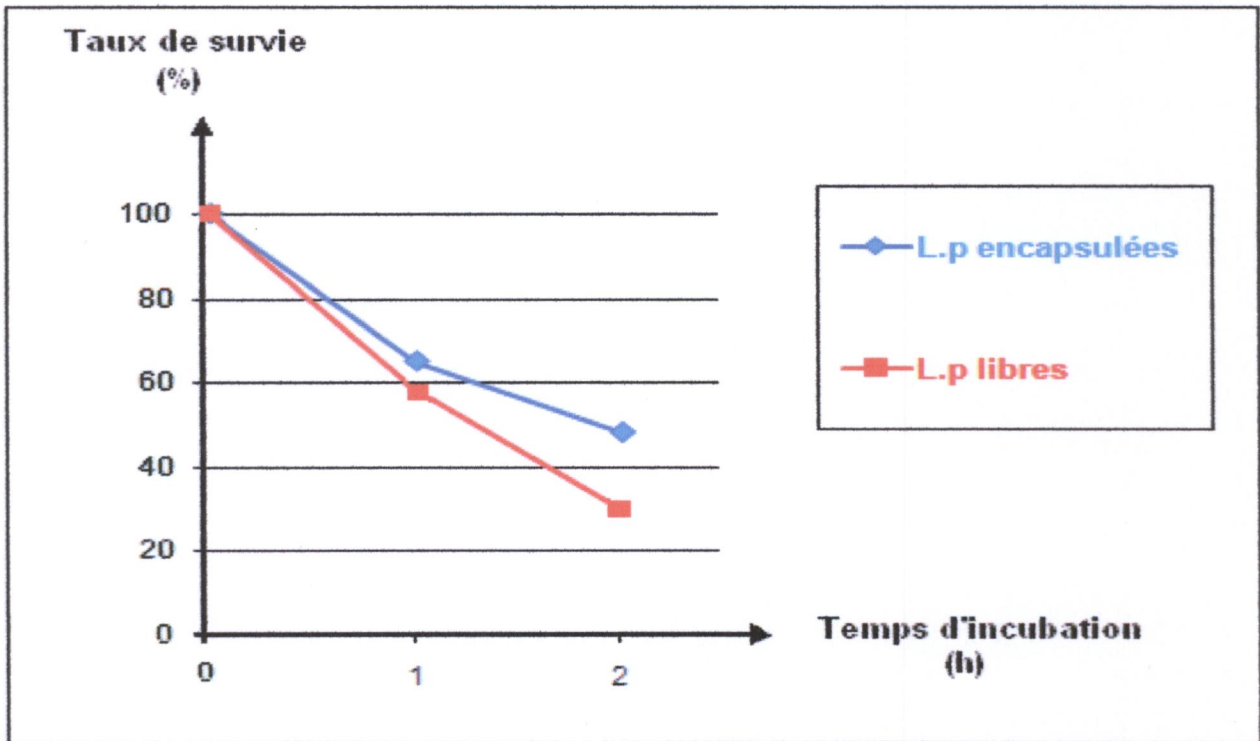
### III.4. Evaluation des aptitudes probiotiques des BL *in vitro*

#### III.4.1 Test de la tolérance des probiotiques libres et encapsulées aux conditions acides

Les bactéries utilisées comme compléments probiotiques sont généralement livrées dans un système alimentaire et vont donc commencer leur voyage vers le tractus intestinal inférieur par la bouche, le temps entre l'entrée et la libération de l'estomac est d'environ 90 min. Bien que le stress cellulaire commence dans l'estomac, qui a un pH aussi faible que 1.5, la plupart des essais *in vitro* sont réalisés à pH 3.0. Ainsi, l'examen préalable de toutes les cultures étudiées pour leur tolérance à faible pH 2.0 et 3.0 est exigé. En outre, plusieurs études indiquent que les bactéries ne survivent pas en nombre suffisant au cours de leur passage dans le tractus gastro-intestinal **Khater et al. (2010)**.

Dans un premier lieu, environ  $51 \times 10^{11}$  UFC/ml de la souche *Lb. plantarum* pour les cellules libres et  $67 \times 10^{11}$  UFC/ml pour les cellules encapsulées dans des billes d'alginate de sodium à 2% ont été incubées à un pH acide en vue de comparer la tolérance des cellules dans les deux états aux conditions similaires à celles de l'estomac. Les résultats sont présentés dans la **figure 11**.

D'une part, les cellules de *Lb. plantarum* à l'état libre subissent une perte et leur concentration atteint  $23 \times 10^6$  UFC/ml ce qui présente un taux de survie de 58% après exposition pendant 1h aux conditions acides, mais après 2h d'exposition, elle diminue également et atteint environ  $6 \times 10^3$  UFC/ml et le taux de survie atteint 30%. D'autre part, le nombre de cellules *Lb. plantarum* encapsulées dans d'alginate de sodium et exposées à l'acidité pendant 1h diminué et atteint  $23 \times 10^7$  UFC/ml, diminuent également et atteint environ  $12 \times 10^5$  UFC/ml après 2h d'incubation ce qui équivaut un taux de survie de 65%, la réduction continue après 2h d'incubation et atteint  $6 \times 10^3$  UFC/ml, le taux de survie des cellules était égal à 48% donc une amélioration de 18% a été obtenue.

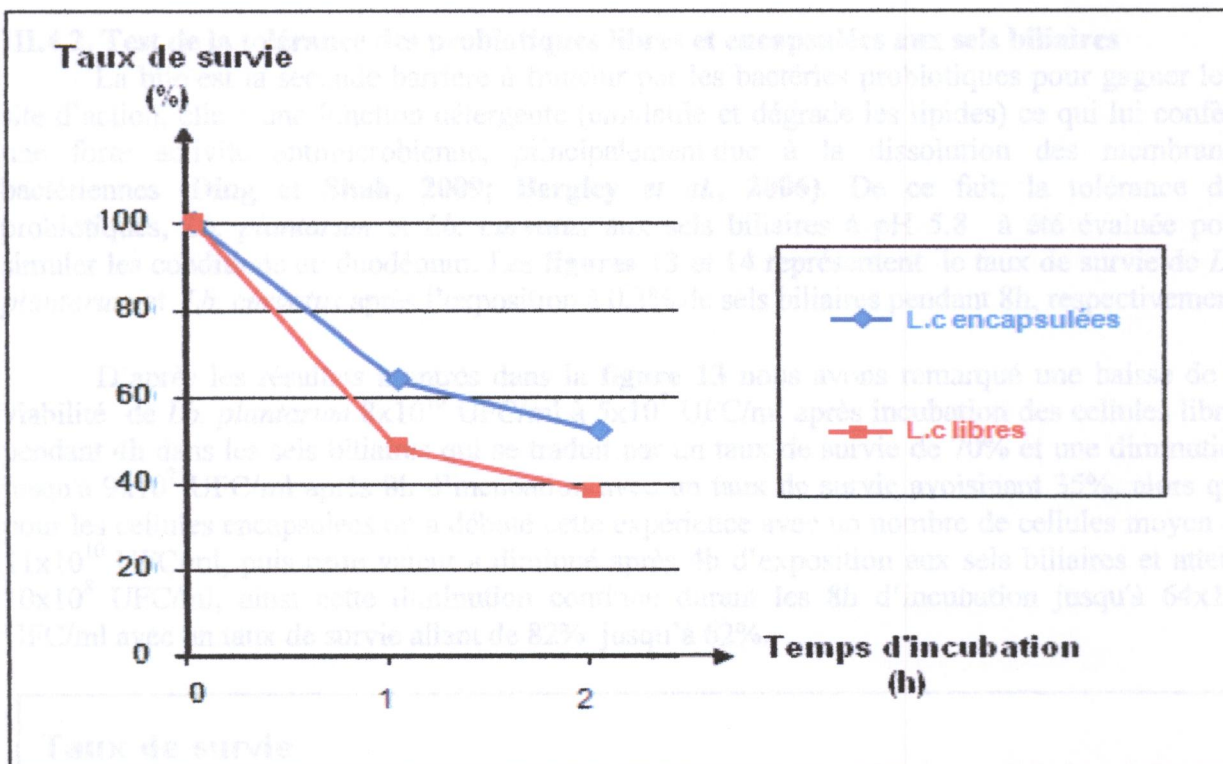


Taux de survie (%) \ Temps (h)	0	1	2
Taux de survie des cellules encapsulées	100	65	48
Taux de survie des cellules libres	100	58	30

**Figure 11 :** Effet de l'acidité (pH2) sur la survie de *Lb. plantarum* libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%.

Dans un second lieu, les résultats obtenus avec la souche *Lb. curvatus* sont représentés par la **figure 12**. Au départ il y avait une moyenne de  $7 \times 10^{10}$  UFC/ml pour les cellules libres et  $12 \times 10^{10}$  UFC/ml pour les cellules encapsulées le nombre de cellules viables constaté après 1h d'incubation pour les cellules libres avoisinait  $17 \times 10^4$  UFC /ml pour un taux de survie de 64% et après 2h d'exposition à l'acidité, la nombre de cellules viables atteint  $15 \times 10^3$  UFC/ml ce qui représente un taux de survie de 52% est noté avec une amélioration de survie de 18%.

Pour les cellules de *Lb. curvatus* testées à l'état encapsulé une diminution du taux de survie est égale à  $10^7$  UFC/ml après une heure d'exposition et un taux de survie de 48% a été remarqué, cette réduction se poursuit et nombre de cellules viables atteint  $58 \times 10^4$  UFC/ml après 2h d'incubation présentant ainsi un taux de survie de 38% avec une amélioration de survie de 14% seulement.



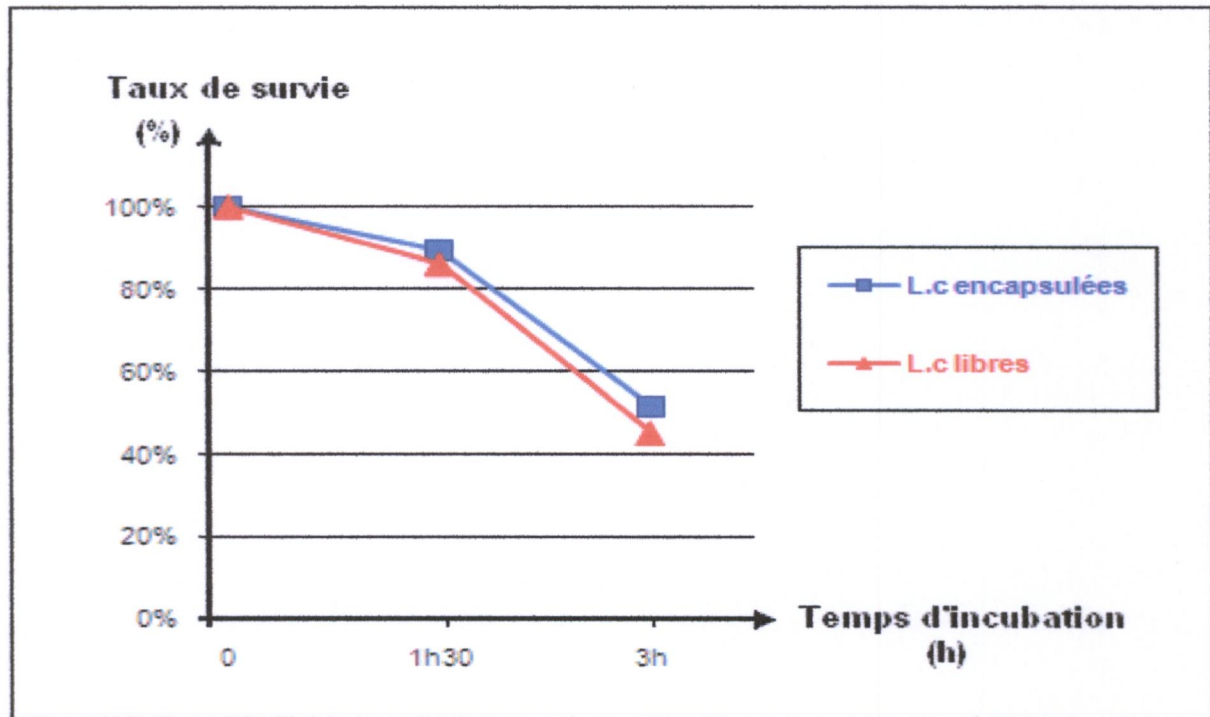
Taux de survie (%) \ Temps (h)	0	1	2
Taux de survie des cellules encapsulées	100	64	52
Taux de survie des cellules libres	100	48	38

**Figure 12 :** Effet de l’acidité (pH2) sur la survie de *Lb. curvatus* libre et encapsulé dans l’alginate de sodium à 2%.

Les résultats suggèrent que la microencapsulation des souches avec l’alginate de sodium à 2% protège efficacement ces bactéries contre les conditions acides (pH=2) similaires aux conditions de l’estomac par l’augmentation du taux de survie de 18% pour *Lb. plantarum* mais seulement de 14% pour *Lb. curvatus*.

Nos résultats sont en parfaite harmonie avec ceux de plusieurs auteurs qui ont testé la viabilité des bactéries probiotiques dans des conditions acides de l’estomac, parmi lesquels citons l’étude réalisée par **Ding et Shah (2009)** sur les deux souches *Lb. plantarum* et *Bifidobacterium longum* encapsulées dans l’alginate à 2% avec des taux de survies qui atteignent 63 et 40.55%, respectivement. De la même manière, **Krasaekoopt et al. (2004)** ont rapporté un taux de survie de 60.1% pour *Lb. acidophilus*. En plus des résultats obtenus par **Mandal et al. (2006)** qui ont encapsulé une souche de *Lb. casei* NCDC-298 dans l’alginate de sodium à 2% ainsi le taux de survie avoisinait 57% après 3h d’incubation dans les conditions acides.

A l'issue de cette expérience, les résultats obtenus indiquent que *Lb. plantarum* à l'état libre est plus résistant à l'effet combiné des sels biliaries et la pancréatine en association avec la trypsine. Malgré que la ME a protégé les cellules des deux souches testées, elle n'a pas été très efficace du au fait que l'amélioration du taux de survie est négligeable en comparant l'état libre à l'état encapsulés et qui est de 7% pour *Lb. plantarum* et de 6.7 % pour *Lb. curvatus* sachant qu'il y avait une dissolution incomplète des capsules d'alginate de sodium qui peut s'expliquer par l'action amylolytique des enzymes pancréatiques.



Temps (h)	0	1.5	3
Taux de survie des cellules encapsulées (%)	100	89,4	51,4
Taux de survie des cellules libres (%)	100	86	44,7

**Figure 16:** Effet de la pancréatine sur la survie de *Lb. curvatus* libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%.

En comparant l'effet des sels biliaries seuls à celui du SIF sur la viabilité des cellules encapsulées pour les deux souches il apparaît qu'après l'exposition au SIF pendant 3h seulement le taux de survie est inférieur à celui obtenu après incubation avec les sels biliaries seuls pendant 8h d'où la pertinence de ce test qui prouve que le suc pancréatique a un effet négatif sur la survie de ces bactéries probiotiques durant dans le transit intestinal.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par **Woraharn et al. (2010)** qui ont étudié la souche de *Lb. plantarum* CMU-FP002 après 3h d'incubation dans la même solution du SIF qu'on a utilisé lors de l'étude de l'effet des enzymes pancréatiques sur la survie des deux souches, et ils ont obtenu un taux de survie avoisinant 60% pour les billes d'alginate à 2%. D'une autre manière, **Nazzaro et al. (2009)** ont simulé les conditions intestinales en préparant un suc intestinal artificiel qui contenait du bouillon MRS additionné de 1 g/l de la pancréatine et 4,5 g/l de sels biliaries. Les cellules encapsulées et les cellules libres ont été incubées dans le suc intestinal artificiel pendant 60 min à 37°C dans le jus de carotte. La souche de *Lactobacillus acidophilus* encapsulée dans l'alginate 2% - xanthane 0.15% - inuline 1 %, a montré un taux de viabilité égal à 80%.

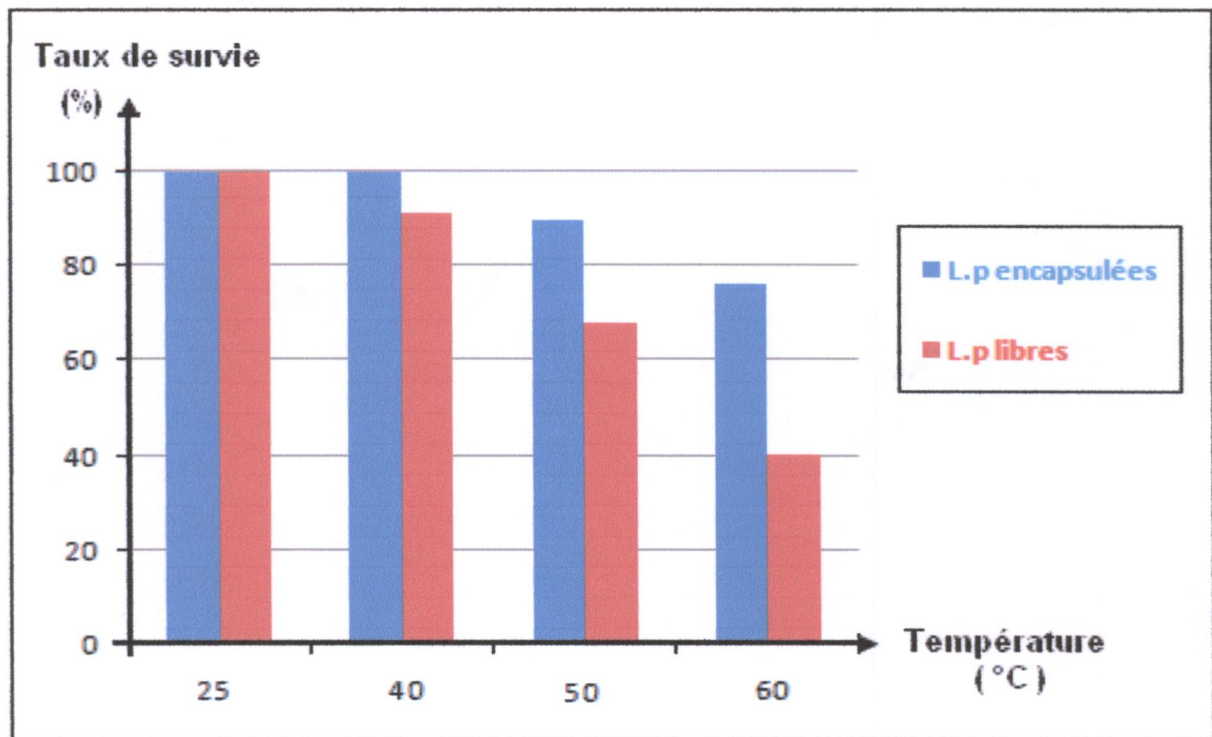
**III.5. Evaluation des aptitudes technologiques des BL *in vitro***

**III.5.1. Test de la thermorésistance des probiotiques libres et encapsulés**

Comme l'objectif principal du traitement thermique est d'inactiver les microorganismes nuisibles et pathogènes responsables de la détérioration des produits alimentaires afin de prolonger sa durée de vie et sa qualité sanitaire, il est inévitable de tuer les organismes bénéfiques qui offrent des avantages sur la santé. Par conséquent, il peut être utile de faire appel à la ME pour mieux protéger les cellules contre les traitements thermiques tels que la pasteurisation, ainsi nous avons testé la résistance de *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* vis-à-vis de la température.

Les résultats du test de la thermorésistance de *Lb. plantarum* libres et encapsulés dans différentes températures sont portés sur la **figure 15**. Le même nombre initial de cellules pour les deux cas a été utilisé qui avoisine  $9 \times 10^{10}$  UFC/ml ainsi ce nombre n'a pas diminué après l'exposition des cellules encapsulées à 40°C, cependant le nombre de cellules libre a subi une légère diminution après exposition à la même température ( $10^{10}$  UFC/ml), ce qui équivaut un taux de survie de 91.32%.

D'autre part, pour les températures plus hautes, le taux de survie des cellules libres a baissé, particulièrement à 60°C où il a atteint 40.5%. Les pertes des cellules encapsulées étaient contrairement moins accrues, 90% des cellules restent viables à 50°C et 67.94% à 60°C.

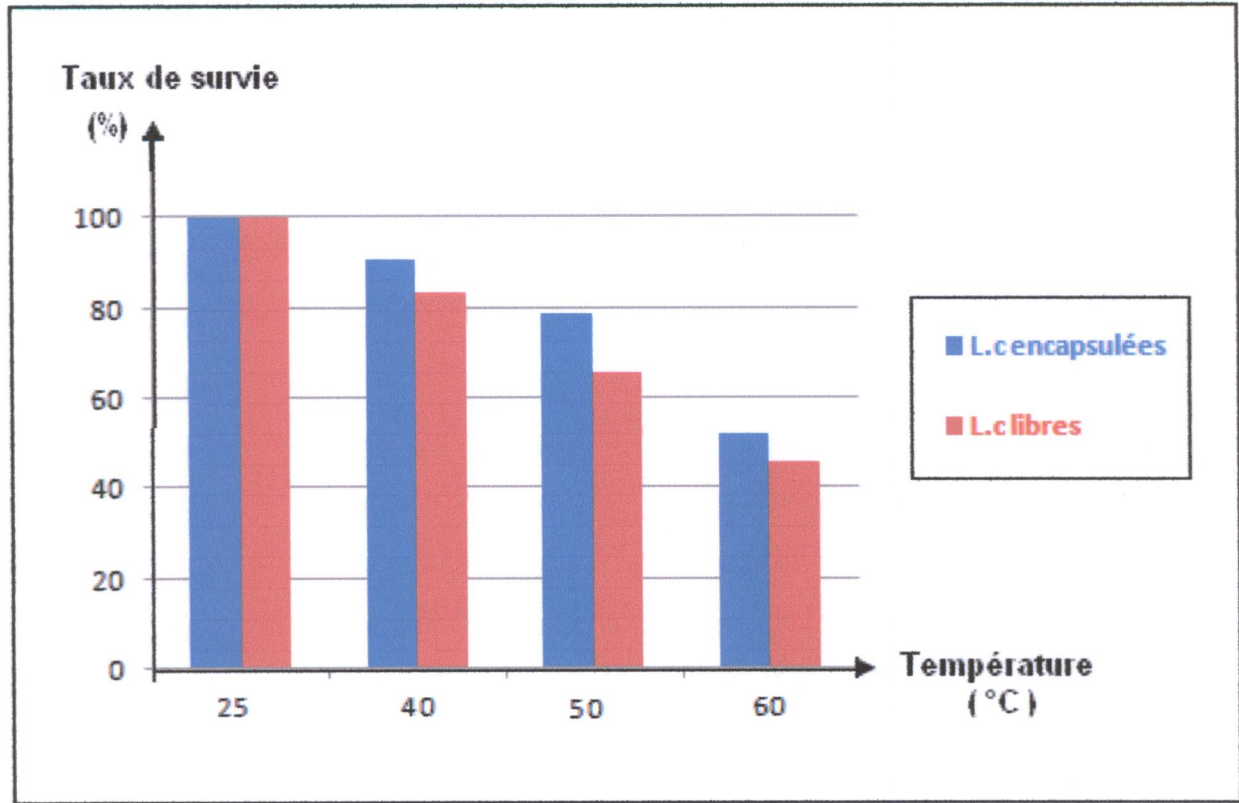


Température (°C)	25	40	50	60
Taux de survie (%)				
Taux de survie des cellules encapsulées	100	100	90	76,34
Taux de survie des cellules libres	100	91,32	67,94	40,5

**Figure 17:** Effet de la température sur la survie de *Lb. plantarum* libre et encapsulé dans l'alginate de sodium 2%.

Parallèlement, la viabilité des cellules de *Lb. curvatus* à l'état libre, montre une diminution en fonction de l'augmentation de la température, 83.72%, 65.48% et 46% des cellules

survivent après exposition à 40, 50 et 60°C, respectivement. Par ailleurs, les cellules encapsulées résistent mieux et présentent les taux de survie suivants : 90.9%, 78,65% et 52% pour les températures 40, 50 et 60°C, respectivement.



Température (°C)	25	40	50	60
Taux de survie des cellules encapsulées	100	90,9	78,65	52
Taux de survie des cellules libres	100	83,72	65,48	46

**Figure 18:** Effet de la température sur la survie de *Lb. curvatus* libre et encapsulé dans l’alginate de sodium 2%

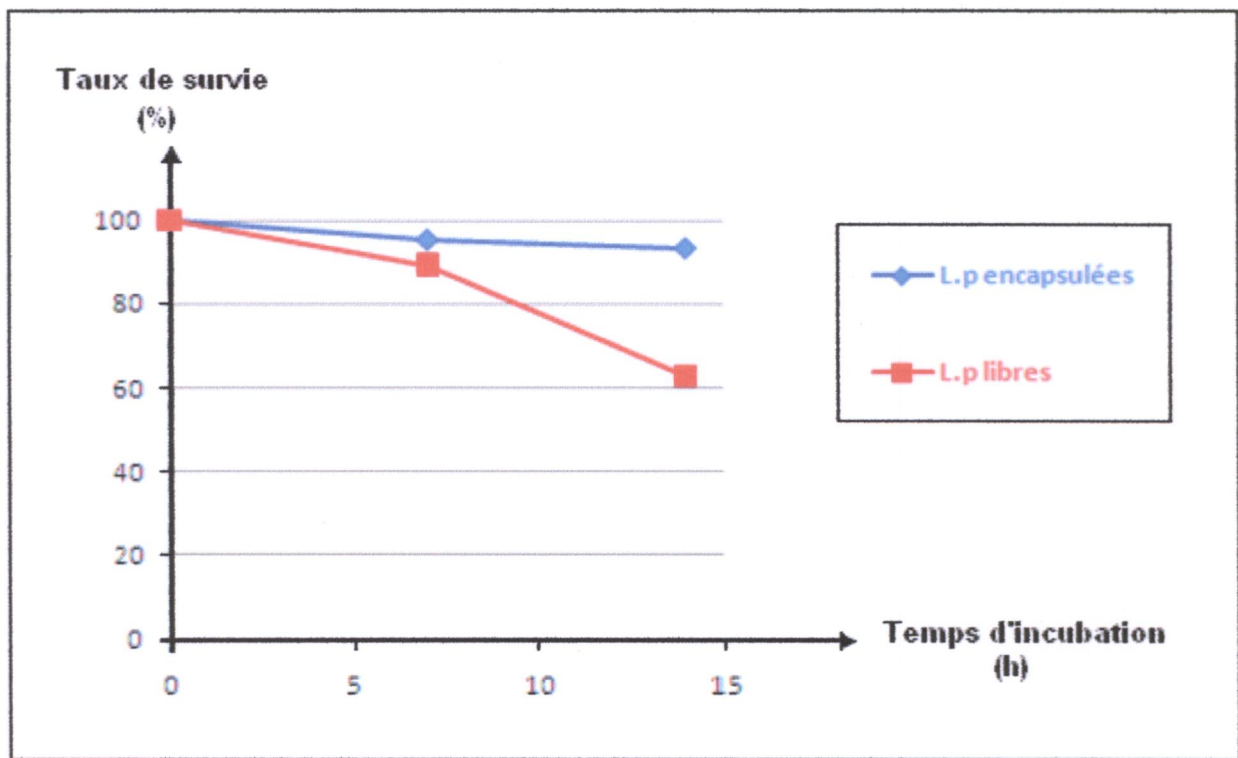
D’après les résultats présentés, nous avons remarqué qu’il y avait une protection importante des cellules de *Lb. plantarum* qui diminue progressivement avec l’augmentation de la température ainsi l’efficacité de la protection était de 8.68, 22 et 35.84% à 40°C, 50°C, et 60°C respectivement. A l’opposé, une protection relativement faible des cellules de *Lb. curvatus* a été constatée en comparant entre les différentes valeurs obtenus à l’état libre ou encapsulé, de ce fait l’amélioration de la protection était comme suit : 7,13 , 17 et 6% à 40, 50 et 60°C, respectivement. En comparant les taux d’efficacité de la protection de *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* à 60°C on a conclu que la ME protège efficacement *Lb. plantarum* alors que ce n’est pas le cas pour *Lb. curvatus* avec une amélioration de la protection de 35 et 5% respectivement.

Nos résultats s’avèrent en parfaite concordance avec ceux rapportés par différents chercheurs, tels que **Mandal et al. (2006)** qui ont étudié l’effet de la température sur la souche *Lb.casei* NCDC-296 dans le gel d’alginate à différentes concentration : 2, 3 et 4% avec des taux de survie avoisinant les 70, 75 et 82% respectivement, et **Kim et al. (2008)** qui ont testé la viabilité de *Lb. acidophilus* ATCC 43121 dans le gel d’alginate à 2% qui avait été soumis à 65

°C pendant 30 min avec un taux de survie de 90%, ces différents auteurs s'accordent sur le fait que l'alginate à 2% améliore considérablement la viabilité des cellules encapsulées par rapport à celle libres ceci avec les différentes espèces de *Lactobacillus*.

**III.5.2. Test de la conservation 4°C des cellules libres et encapsulées**

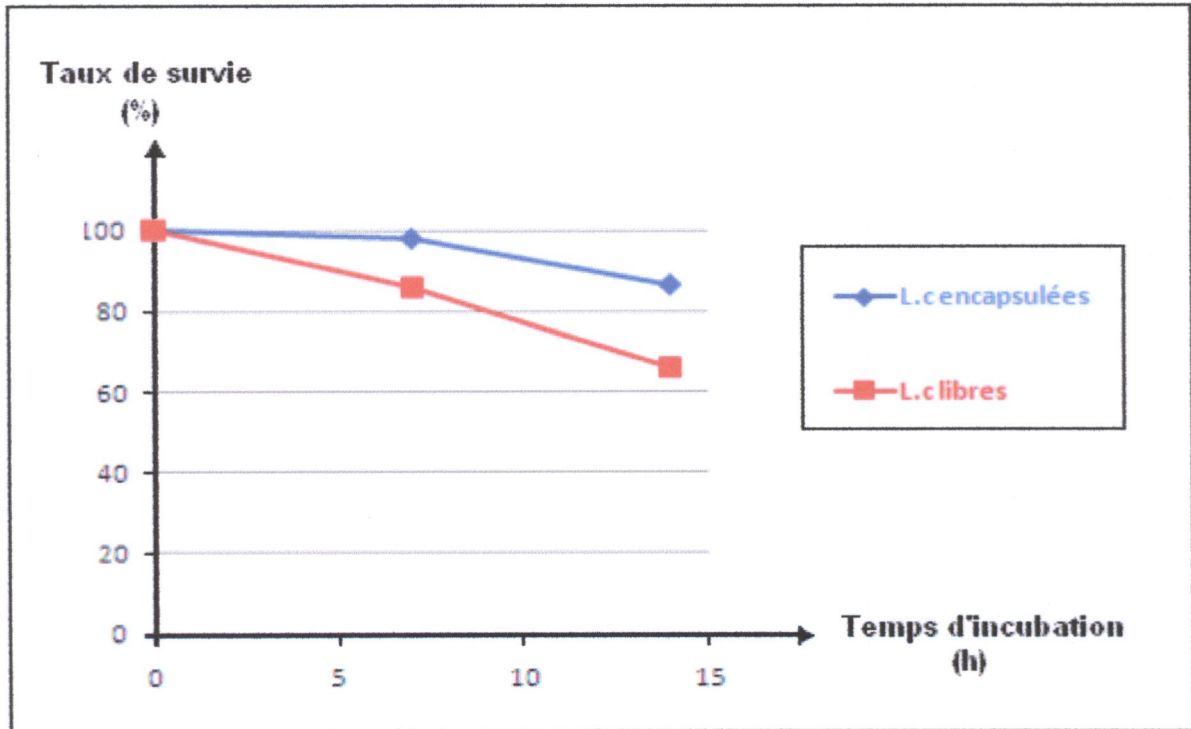
Comme il se produit une perte significative des cellules bactériennes pendant le stockage, des expériences ont été effectuées afin d'évaluer l'efficacité de l'encapsulation pour réduire les pertes de viabilité des probiotiques par la réfrigération, les figures 17 et 18 illustrent les résultats obtenus pour *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* respectivement après 15 jours de conservation à 4°C. Les résultats obtenus, montrent que le nombre de cellules de *Lb. plantarum* à l'état libre est considérablement réduit, (95% sont viables après une semaine, et seulement 63% peuvent survivre après deux semaines). Cependant, à l'état encapsulé, les cellules préservent leur viabilité, et le taux de survie après deux semaines reste relativement élevé (93.4%).



Temps (semaines)	0	1	2
Taux de survie des cellules encapsulées	100	95,4	93,4
Taux de survie des cellules libres	100	89,3	63

**Figure 19:** Effet de la conservation à 4°C sur la survie de *Lb. plantarum* libre et encapsulé dans l'alginate de sodium 2%

Des résultats similaires ont été obtenus pour *Lb. curvatus*, les cellules à l'état libre résistent moins à la conservation à 4°C et perdent leur viabilité jusqu'à atteindre 66% après 2 semaines, par contre les cellules encapsulées ont été maintenues viables jusqu'à 86% après deux semaines.



Taux de survie (%) \ Temps (semaines)	0	1	2
Taux de survie des cellules encapsulées	100	98	86,6
Taux de survie des cellules libres	100	86	66

**Figure 20:** Effet de la conservation à 4°C sur la survie de *Lb. curvatus* libre et encapsulé dans l’alginate de sodium 2%

Dans ce même contexte, on peut dire que la ME a réussi à protéger les cellules des deux souches vis à vis de la réfrigération, ainsi l’efficacité de la protection était égale à 30.4% pour *Lb. plantarum* et 20.6% pour *Lb. curvatus*.

Selon **Brinques et al. (2010)**, l’encapsulation de *Lb. plantarum* BL011 dans un gel d’alginate contourne l’effet de la conservation prolongée dans le froid et ceci en introduisant les capsules dans les aliments, par exemple dans le yaourt, le taux de survie était égal à 27% après 36 jours de stockage. Dans une autre expérience, **Woraharn et al. (2010)** ont testé la souche *Lb. plantarum* CMUF-002 qui était capable de survivre même après 8 semaines de conservation au froid avec un taux de survie avoisinant 75%.

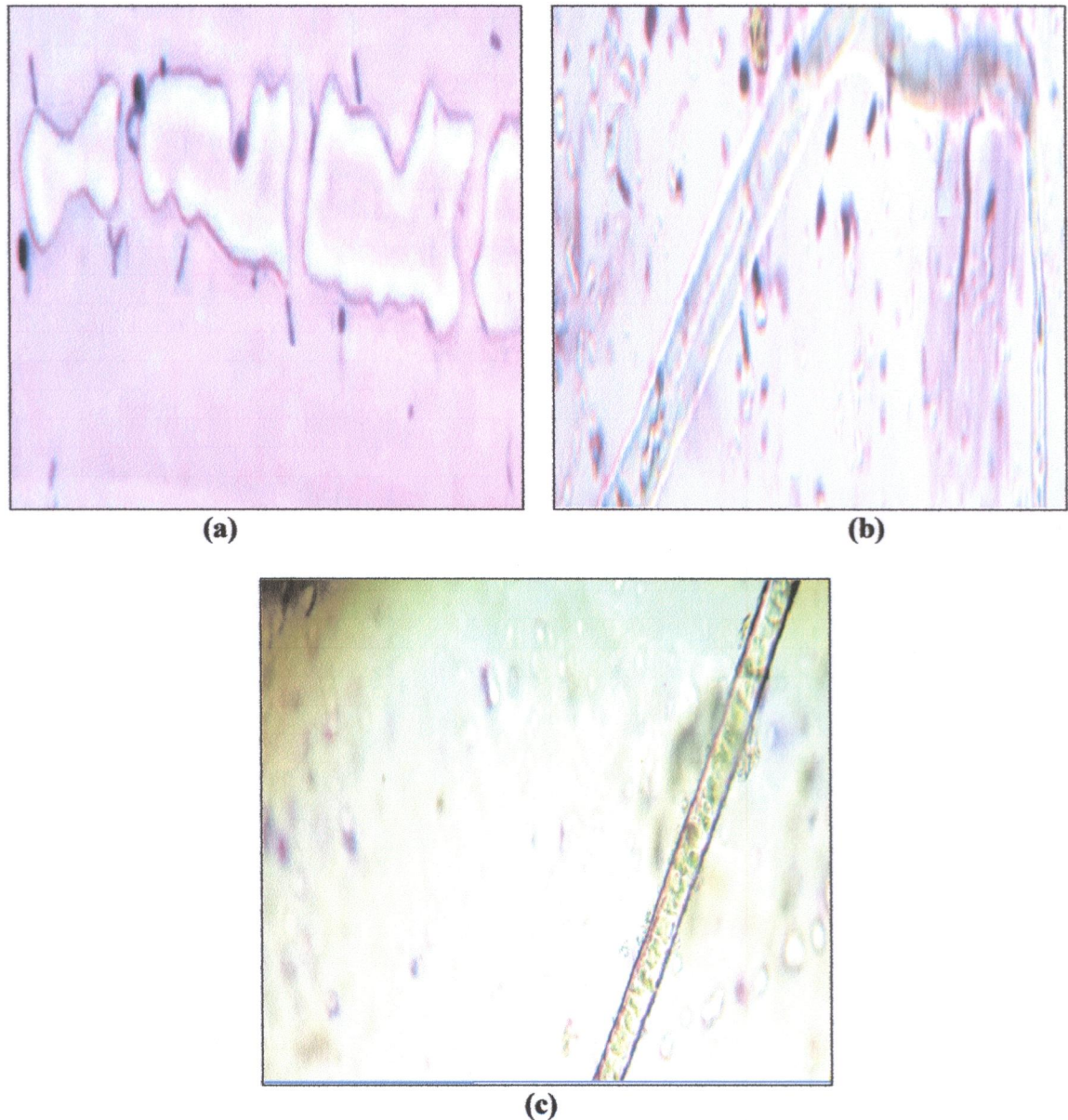


### III.6. Tests complémentaires pour la confirmation des aptitudes probiotiques

#### III.6.1. Test d'adhésion : le rôle de l'hydrophobicité de surface

Dans le but de mettre en évidence, la capacité des cellules probiotiques à adhérer aux cellules de la lumière intestinale, le test d'adhésion sur les cellules épithéliales du colon et de l'iléon du tube digestif du poulet a été effectuée.

La **figure 21** représente l'aspect microscopique des cellules épithéliales du tube digestif en présence des bactéries probiotiques. Les cellules de *Lb. plantarum* ont une adhésion apparente moyenne aux cellules intestinales plus ou moins élevée au niveau du colon que l'iléon, du fait que le nombre des bactéries adhérentes aux cellules du colon est plus élevé que celui observé sur le tissu de l'iléon, alors qu'on n'a pas pu démontrer que *Lb. curvatus* pouvait s'adhérer à ces mêmes cellules.



**Figure 21** : Photomicrographie d'adhésion des souches *Lb. plantarum* dans le colon (a) et l'iléon (b) et *Lb. curvatus* dans l'iléon (c).

L'adhésion est un mécanisme complexe mettant en jeu plusieurs facteurs liés aussi bien aux cellules réceptrices qu'aux cellules probiotiques. Ce mécanisme est précédé par des interactions initiales entre les deux types de cellules, notamment des interactions de type hydrophobes, des interactions ioniques et des interactions de type récepteur-ligand (Oelschlaeger, 2010). Pour cette raison, un test d'hydrophobicité basé sur l'interaction entre la surface des cellules et un hydrocarbure tel que le xylène a été réalisé. Le **tableau 8** montre les résultats du test de l'hydrophobicité pour les deux souches bactériennes étudiées.

**Tableau 8** : Résultats du test d'hydrophobicité.

DO Souches	DO <sub>i</sub>	DO <sub>f</sub>
<i>Lb. plantarum</i>	1.07	1.0
<i>Lb. curvatus</i>	1.15	1.15

En exploitant les données portées dans le **tableau 8**, le pourcentage de l'hydrophobicité montré par les souches est comme suit :

**H% *Lb. curvatus* = 0%**

**H% *Lb. plantarum* = 6.5%**

D'après les résultats obtenus en calculant le pourcentage de l'hydrophobicité des deux souches, la surface des cellules de *Lb. curvatus* ne présentent aucune hydrophobicité pour le xylène, de l'autre coté, une faible hydrophobicité (6.5%) est constatée pour les cellules de *Lb. plantarum*.

A l'issu de ces deux tests, l'adhésion des deux bactéries probiotiques aux cellules épithéliales n'est pas attribuée aux interactions hydrophobes, qui est l'une des propriétés physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules intestinales de l'hôte cependant cette interaction initiale non spécifique précède le mécanisme d'adhésion qui sert d'intermédiaire pour des mécanismes plus spécifiques (Guglielmotti *et al.*, 2007).

Guglielmotti *et al.* (2007) ont suggéré que l'hydrophobicité facilite probablement l'adhésion des probiotiques, mais qu'elle n'est pas totalement requise pour une forte capacité d'adhésion. Cs mêmes auteurs ont trouvé que des cellules de *Lb. delbrueckii subsp. lactis* avaient une forte adhésion aux cellules de la lignée cellulaire CaCo-2/TC-7, sans montrer une haute hydrophobicité de surface (6.5%). De ce fait, l'adhésion de *Lb. plantarum* implique d'autres type d'interactions faisant appel à d'autres facteurs tels que les protéines de surface, les adhésines ou les pilis, ceux-ci recommandent une recherche plus approfondie pour déterminer le moyen par le quel s'effectue l'adhésion (Oelschlaeger, 2010).

### III.6. 2. Test de sensibilité aux antibiotiques

En ce basant sur les valeurs critiques citées par **Joffin et Leyral (2006)**, le test de sensibilité des deux souches aux antibiotiques a révélé que la souche *Lb. plantarum* est sensible au Céfotaxime, aux Tétracyclines, et à la Pénicilline G, cependant, avec Amoxicilline et Streptomycine la souche présente une résistance. D'autre part *Lb. curvatus* a montré le même profil de sensibilité ou de résistance aux antibiotiques testé pour *Lb. plantarum*, tout ces résultats sont portés sur le **tableau 9**.

**Tableau 9** : Résistance et sensibilité de *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* aux antibiotiques

la souche Antibiotique	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. curvatus</i>
Céfotaxime	S	S
Tertacycline	S	S
Amoxicilline	R	R
Streptomycine	R	R
Pénicilline G	S	S

R : résistant

S : sensible

Il existe des obstacles majeurs pour la détermination de la résistance des BL aux antibiotiques ce qui peut conduire à des difficultés dans l'évaluation de la sécurité. Premièrement, il n'y a pas de normes approuvées pour l'évaluation phénotypique et génotypique des résistances aux antibiotiques des isolats alimentaires car les concentrations critiques varient considérablement en fonction des moyens et de l'antibiotique utilisé (**Hummel et al., 2007**).

La résistance à la Pénicilline G et aux tétracyclines de *Lb. plantarum* BFE440 isolé de saucissons fermentés a été préalablement rapportée par **Hummel et al. (2007)**. Par ailleurs, d'autres BL testées par **Iyer et al. (2010)**, telles que *Streptococcus. thermophilus* RD102 était sensible à la fois à la Pénicilline G et aux Tétracyclines, et résistantes à la Streptomycine.

Nos résultats ressemblent à ces derniers, et par conséquent nos probiotiques ne présentent pas le risque de transfert de la résistance aux antibiotiques les plus utilisés aux agents pathogènes.

# Conclusion Générale

## Conclusion Générale

Notre étude expérimentale, a été menée sur la capacité de deux souches de bactéries lactiques *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* encapsulées dans différentes matrices à survivre aux conditions hostiles similaires à celles du tractus digestif et dans des conditions de stockage et de traitement thermique, les résultats obtenus ont permis de noter les conclusions suivantes :

- L'alginate de sodium à 2% est la matrice de choix pour l'encapsulation des probiotiques, montrant un taux de relargage relativement faible comparé à ceux trouvés pour les autres matrices.
- La microencapsulation par l'alginate de sodium à 2% a exercé un effet bénéfique en améliorant la résistance des deux souches testées dans les conditions simulées du tractus gastro-intestinal et qui sont l'acidité, les sels biliaires et les enzymes pancréatiques, et par ailleurs, dans les processus technologiques ; stabilité pendant les périodes de stockage et les traitements thermiques.
- La microencapsulation a été plus efficace en protégeant les cellules de *Lb. plantarum* que *Lb. curvatus* et ceci est probablement dû au taux de relargage plus élevé qui a été démontré en testant la libération des cellules par les capsules d'alginate de sodium à 2% dans les conditions d'acidité et de sels biliaires.
- *Lb. plantarum* a montré une capacité d'adhérence aux cellules épithéliales de l'iléon et du colon *in vitro*, alors que *Lb. curvatus* n'a montré aucun pouvoir d'adhérence, malgré la faible hydrophobicité de sa surface, mais on ne peut affirmer avec certitude que *Lb. curvatus* ne possède pas des caractéristiques d'adhésion aux cellules épithéliales de la lumière intestinale.
- Nos deux souches présentent une sensibilité à la plupart des antibiotiques testés, en précisant que, la résistance à la Streptomycine est une résistance naturelle ce qui exclue tout danger potentiel sur la santé du consommateur.

Enfin, il est nécessaire de réaliser des études génétiques et moléculaires pour approfondir les connaissances sur le profil métabolique des deux souches, ce qui pourrait éclaircir les interactions entre le germe et la matrice d'encapsulation, en plus, des tests de la viabilité dans un système *in vivo* sont requis afin d'étudier avec plus de précision l'efficacité de la ME en terme de livraison ciblée des probiotiques et leur libération contrôlée dans le TGI, et notre dernière perspective, concerne l'application de cette technique dans divers produits alimentaires, particulièrement, les produits laitiers.

Références

Bibliographiques

## Références Bibliographiques

1. **Akhiar A.N.S.M. (2010).** Enhancement of probiotics survival by microencapsulation with alginate and prebiotics MMG 445. *Basic Biotechnology*. 6 : 13-18.
2. **Amrouche T. (2005).** Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : Analyse *in vitro* et étude *ex vivo* des mécanismes moléculaire impliqués. Thèse de Doctorat. Université de Québec. Canada
3. **Anal A.K. et Singh H. (2007).** Recent advances in Microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 18 : 240-251.
4. **Ariful I.M.; Yun C.H.; Choi Y.J. et Cho C.S. (2010).** Microencapsulation of Live Probiotic Bacteria. *Journal of Microbiology & Biotechnology*. 20 (10) : 1367–1377.
5. **Babu G.; Rath S. et Nithyalakshmi V. (2011).** Probiotic Viability of Freeze Dried Synbiotic Microcapsules in Skim Milk Powder at Ambient Storage Condition. *Internet Journal of Food Safety*. 13 : 62-6.
6. **Begley M.; Hill C. et Gahan C.G.M. (2006).** Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (3) : 1729–1738.
7. **Bhadoria P.B.S. et Mahapatra S.C. (2011).** Prospects, technological aspects and limitations of probiotics. *European Journal of Food Research & Review*. 1 (2) : 23-42.
8. **Boyaval P.; Lebrun A. et Goulet J. (1985).** Etude de l'immobilisation de *Lactobacillus helveticus* dans des billes d'alginate de calcium. *Le Lait*. 65 (649-650) : 185-199.
9. **Brinques G. et Ayub M.A.Z. (2011).** Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*. 103 : 123–128.
10. **Burgain J.; Gaiani C.; Linder M. et Scher J. (2011).** Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 104 : 467–483.
11. **Champagne C.P. et Fustier P. (2007).** Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 18 : 184–190.

12. **Chandramouli V.; Kailasapathy K.; Peiris P. et Jones M. (2004).** An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*. 56 : 27– 35.
13. **Cenatiempo Y., Berjeaud J.M., Biet F., Fermaud C., Hechard Y. and Robichon D. (1996).** Bactériocines des bactéries lactiques : Données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Lait*. 76 : 169-177. Elsevier. INRA.
14. **Chávarri M.; Marañón I.; Ares R.; Ibáñez F.C.; Marzo F. et Villarán M.d.C. (2010).** Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 142 : 185–189.
15. **Crittenden R.; Bird A.R.; Gopal P.; Henriksson A; Lee Y.K. et Playne M.J. (2005).** Probiotic research in Australia, New Zealand and the Asia-Pacific region. *Current Pharmaceutical Design*. 11 : 37-53.
16. **Cruz A.G.; Cadena R.S.; Walter E.H.M.; Mortazavian A.; Granato D.; Faria J.A.F. et Bolini H.M.A. (2010).** Sensory Analysis: Relevance for prebiotic, probiotic, and synbiotic product development. *Institute of Food Technologists*. 9 : 358- 373.
17. **Denis R.; Amiot J.; Boutin Y et Lamoureux M. (2006).** Innocuité, qualité et efficacité des probiotiques. Québec : Université de LAVAL. Canada.
18. **Ding W.K. et Shah N.P. (2009).** An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during Storage. *Journal of Food Science*. 74 (2): 51-36.
19. **Ding W.K. et Shah N.P. (2007).** Acid, bile, and heat Tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*. 72 (9) : 446–450.
20. **Gagnon M. (2007).** Collection Mémoires et thèses électroniques, Chapitre 1. Revue de littérature. Québec : Université de LAVAL. Canada.
21. **Gbassi G.K. (2010).** Aspect physico-chimique de la microencapsulation et de la desencapsulation des probiotiques. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg. France.
22. **Givry S. (2006).** Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifementans*. Thèse de Doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne. France.
23. **Guglielmotti D.M.; Marco M.B.; Golowczyc M.; Reinheimer J.A. et Quiberoni A.L. (2007).** Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *International Dairy Journal*. 17 : 916-925.
24. **Halász A.; Zalán Z.; Nagy A.; Hegyi F et Gelencsér E. (2009).** Can probiotic lab strains be used to improve nutritional quality of bread?. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Congress Flour-Bread 09. 7<sup>th</sup> Croatian Congress of Cereal Technologists, Opatija, Croatia*. 30-38.



25. Heidebach T.; Först P. et Kulozik U. (2009). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*. 23 (7) : 1670-1677.
26. Hummel A.S.; Hertel C.; Holzapfel W.H. et Franz C.M.A.P. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (3) : 730-739.
27. Iyer R.; Tomar S.K.; Kapila S.; Mani J. et Singh R. (2010). Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Research International*. 43: 103-110.
28. Izquierdo A.E. (2009). Les proteines bacteriennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg. France.
29. Joerger R.D. (2002). Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *Poultry Science Association*. 82 : 640-647.
30. Joffin J.N. et Leyral G. (2006). Microbiologie alimentaire. Edition Dictionnaire des techniques. pp.12-239. France.
31. Kailasapathy K. (2002). Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 3: 39-48.
32. Kailasapathy K. et Chin J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*. 78 : 80-88.
33. Kalui C.M.; Mathara J.M. et Kutima P. (2010). Probiotic potential of spontaneously fermented cereal based foods – A review. *African Journal of Biotechnology*. 9 (17) : 2490-2498.
34. Khater A.A.; Ali M.A. et Ahmed E.A.M. (2010). Effect of encapsulation on some probiotic criteria. *Journal of American Science*. 6 (10) : 836-845.
35. Kim K. et Lee S.J. (2009). Effects of extrusion on k-carrageenan/agar mixed gel type. *Journal of Texture Studies*. 40 : 646-656.
36. Kim S.J.; Cho S.Y.; Kim S.H.; Song O.J.; Shin I.S.; Cha D.S. et Park H.J. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Swiss Society of Food Science and Technology*. 41 : 493-500 .
37. Kimse M. (2009). Caractérisation de l'écosystème caecal et santé digestive du lapin: Contrôle nutritionnel et interaction avec la levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. France.
38. Klein G.; Dicks L.M.T.; Pack A.; Hack B.; Zimmerma K.; Dellaglio F. et Reuter G. (1996). Emended Descriptions of *Lactobacillus sake* (Katagiri, Kitahara, and Fukami) and *Lactobacillus curvatus* (Abo-Elnaga and Kandler): Numerical classification revealed by protein fingerprinting and identification based on biochemical patterns and DNA-DNA hybridizations. *International Journal of System Bacteriology*. 46 (2) : 367-376.

39. **Klinkenberg G.; Lystad K.Q.; Levine D.W. et Dyrset N. (2001).** Cell Release from Alginate Immobilized *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in chitosan and alginate coated beads. *Journal of Dairy Science*. 84 : 1118–1127.
40. **Kotikalapudi B.L. (2009).** Characterization and encapsulation of probiotic bacteria using a pea-protein alginate matrix. Thèse de Master. Université de Québec. Canada.
41. **Krasaekoopt W.; Bhandari B. et Deeth H. (2004).** The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 14 : 737–743.
42. **Kunz B. et Krämer J. (2003).** Influence of different capsule materials on the physiological properties of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. Thèse de Doctorat. Université de Bonn, Allemagne.
43. **Lakkis J.M. (2007).** Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In : Chen M.J. et Chen K.N. *Encapsulation and controlled release : Technology in food systems*. pp.83-112. USA.
44. **Leroy F.; Falony G et De Vuyst L. (2008).** Latest Developments in Probiotics. In: De Vuyst L. *Meat biotechnology*. Edition Toldra F. Belgium. pp.217-230. Spain.
45. **Lin W.H.; Yu B.; Jang S.H. et Tsen Y.H. (2007).** Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*. 13 : 107-113.
46. **Ljungh A. et Wadström T. (2005).** Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects. *Issues Intestinal Microbiology*. 7 : 73–90.
47. **Mahasneh A.M et Abbas M.M. (2010).** Probiotics and Traditional Fermented Foods: The Eternal Connection. *Jordanian Journal of Biological Sciences*. 3 (4) : 133 – 140.
48. **Maldonado A.; Jiménez-Díaz R. et Ruiz-Barba J.L. (2004).** Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific Gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *Journal of Bacteriology*. 186 (5) : 1556–1564.
49. **Mandal S.; Puniya A.K. et Singh K. (2006).** Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*. 16 : 1190–1195.
50. **Meiners J.A. (2009).** Micro-Encapsulation of Probiotics. Springer Science&Business Media. 806-833.
51. **Morgan J.R. et Yarmush M.L. (1999).** Microencapsulation. In : Chang T.M.S. *Tissue engineering methods and protocols*. Edition Humana Press. pp.317-330. USA.
52. **Mortazavian A.; Razavi S.H.; Ehsani M.R.; Sohrabvandi S. (2007).** Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5 (1): 1-18.

53. **Muthukumarasamy P. et Holley R.A. (2006).** Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. International Journal of Food Microbiology. 111 : 164–16.
54. **Nazzaro F.; Fratianni F.; Coppola R.; Sada A. et Orlando P. (2009).** Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. Journal of Functional Foods. 1-5.
55. **Oelschlaeger T.A. (2010).** Mechanisms of probiotic actions-a review. International Journal of Medicine & Microbiology. 300 : 57-62.
56. **Petrović T.; Nedivić V.; Branković S.; Burgaski B. et Lacroix C. (2007)** Protection of probiotic by microencapsulation. CI & CFQ. 1353 : 169-174.
57. **Petterson C.A. (2004).** Four provinces support new venture : wellness west technology watch. Pathfinders Research & Management. 1 (1) : 1-12. Canada.
58. **Reddy K.; Raghavendra P.; Kumar B.; Misra M. et Prapulla S. (2007).** Screening of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Kanjika, an ayurvedic lactic acid fermented product: An *in vitro* evaluation. The Journal of General and Applied Microbiology. 53: 207–213.
59. **Richard J. et Benoit J.P. (2000).** Microencapsulation. In : Microencapsulation. Edition Techniques d'ingénieur. pp.1-20. France.
60. **Rokka S. et Rantamäki P. (2010).** Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications European Food Research Technology. 231 : 1–12.
61. **Saad N. (2010)** Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v avec l'hôte : approche *in vitro*. Thèse de Doctorat. Université de Limoge.
62. **Sanders M.E. (2007).** Probiotics Basics. California Dairy Research Foundation. USA.
63. **Sekhon B.S. et Jairath S. (2010).** Prebiotics, probiotics and synbiotics: an overview. Indian Journal of Pharmaceutical Education. 1 (2) : 13-36.
64. **Socol C.R.; Porto de Souza Vandenberghe L.; Spier M.; Medeiros A.; Yamaguishi C.; De Dea Lindner J.; Pandey A. et Thomaz-Socol V. (2010).** The potential of probiotics. Food Technology & Biotechnology. 48 (4) : 413–434.
65. **Soma P.K.; Williams P.D et Lo Y.M. (2009).** Advancements in non-starch polysaccharides research for frozen foods and microencapsulation of probiotics. Frontiers of Chemical Engineering in China. 10 : 1-18.
66. **Subirade M. et Maltais A. (2008).** La microencapsulation : un outil d'avenir pour l'industrie alimentaire. Bio-Tendances. Québec : Université de LAVAL. Canada.
67. **Sultana K.; Godward G; Reynolds N.; Arumugaswamy R.; Peiris P. et 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 : 47–55.

68. **Talwalkar A. et Kailasapathy K. (2004).** A Review of Oxygen Toxicity in Probiotic Yogurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3 : 117-124.
69. **Tredez M.L.H. (2008).** Méta-analyse des effets protecteurs des probiotiques sur la cancérogenèse coloréctale chez les rongeurs. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. France.
70. **Tuomola E.; Crittenden R.; Playne M.; Isolauri E. et Salminen S. (2001).** Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *American Society for Clinical Nutrition*. 73 : 393–8.
71. **Vasiljevic T. et Shah N.P. (2008).** Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*. 18 : 714-728.
72. **Vidhyalakshmi R.; Bhakayaraj R. and Subhasree R.S. (2009).** Encapsulation “The Future of Probiotics”. *Advances in Biological Research*. 3 (3-4) : 96-103.
73. **Von Mollendorff J.W. (2008).** Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria from fermented beverages and optimization of starter cultures. Thèse de Master. University de Stellenbosch. South Africa.
74. **Wijffels R.H. (2000).** Immobilised Cells. Edition Springer Lab Manuel. pp.1-261. Germany.
75. **Woraharn S.; Chaiyasut C; Sirithunyalug B. et Sirithunyalug J. (2010).** Survival enhancement of probiotic *Lactobacillus plantarum* CMU-FP002 by granulation and encapsulation techniques. *African Journal of Microbiology Research*. 4 (20) : 2086-2093.

# Annexe

# Annexe

## Milieu MRS pour 1L

Peptone.....	10g
Extrait de viande .....	8g
Extrait de levure .....	4g
Acétate de sodium .....	5g
Phosphate bipotassique .....	2g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium, 7H <sub>2</sub> O.....	0.2g
Sulfate de manganèse, 4H <sub>2</sub> O.....	0.05g
Glucose .....	20g
Tween 80.....	1ml
Eau distillée .....	1000 ml

## Gélose MRS

Bouillon MRS additionnée de 15g d'agar

## Tampon phosphate pH 7 (1M pour 100ml)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	61.5 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	38.5ml

## Chlorure de calcium (0.05) pour 1 litre

CaCl <sub>2</sub> .....	5.55 g
-------------------------	--------

## Tampon de sulfate urea magnésium sulfate buffer pH 7

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3H <sub>2</sub> O.....	22.2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	7.26g
Urea (urée) .....	1.8g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0.02g

## Tampon de PBS pH 7.4

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	10.9g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3.2g
NaCl.....	90g
Eau distillé .....	1000 ml

## Tampon citrate de sodium 2%, pH= 6

Na-CO <sub>3</sub> .....	2g
Eau distillé .....	100 ml

**Tableau 1 :** Effet de l'acidité (pH2) sur la survie de *Lb. plantarum* libre et encapsulé.

Temps (h)	0	1	2
Nombre de cellules viables (UFC/ml)			
taux de survie des cellules encapsulées	$67 \times 10^{11}$	$23 \times 10^7$	$12 \times 10^5$
Taux de survie des cellules libres	$51 \times 10^{11}$	$23 \times 10^6$	$6 \times 10^3$

**Tableau 2 :** Effet de l'acidité (pH2) sur la survie de *Lb. curvatus* libre et encapsulé.

Temps (h)	0	1	2
Nombre de cellules viables (UFC/ml)			
taux de survie des cellules encapsulées	$12 \times 10^{10}$	$10^7$	$58 \times 10^4$
Taux de survie des cellules libres	$7 \times 10^{10}$	$17 \times 10^4$	$15 \times 10^3$

**Tableau 3 :** Survie de *Lb. plantarum* libre et encapsulé incubé dans 0.3% de sels biliaries.

Temps (h)	0	1	2
Nombre de cellules viables (UFC/ml)			
taux de survie des cellules encapsulées	$11 \times 10^{10}$	$10 \times 10^8$	$64 \times 10^5$
Taux de survie des cellules libres	$8 \times 10^{10}$	$5 \times 10^7$	$9 \times 10^2$

**Tableau 4 :** Survie de *Lb. curvatus* libre et encapsulé incubé à 0.3% de sels biliaries.

Temps (h)	0	1	2
Nombre de cellules viables (UFC/ml)			
taux de survie des cellules encapsulées	$7 \times 10^{10}$	$26 \times 10^7$	$9 \times 10^6$
Taux de survie des cellules libres	$4 \times 10^{10}$	$21 \times 10^6$	$24 \times 10^5$

**Tableau 5 :** Effet de la pancréatine sur la survie de *Lb. plantarum* libre et encapsulé.

Temps (h)	0	1.5	2
Nombre de cellules viables (UFC/ml)			
taux de survie des cellules encapsulées	$30 \times 10^6$	$95 \times 10^5$	$10^4$
Taux de survie des cellules libres	$25 \times 10^6$	$22 \times 10^5$	$3 \times 10^3$

**Tableau 6 :** Effet de la pancréatine sur la survie de *Lb. curvatus* libre et encapsulé.

Temps (h)	0	1.5	3
Nombre de cellules viables (UFC/ml)			
Nombre de cellules encapsulées viables	$9 \times 10^8$	$10 \times 10^7$	$5 \times 10^4$
Nombre de cellules libres viables	$9 \times 10^8$	$5 \times 10^7$	$4 \times 10^4$

**Tableau 7 :** Effet température sur la survie de *Lb. plantarum* libre et encapsulé.

Température (°C)	25	40	50	60
Nombre de cellules viables (UFC/ml)				
Nombre de cellules encapsulées viables	$9 \times 10^{10}$	$9 \times 10^{10}$	$75 \times 10^8$	$23 \times 10^7$
Nombre de cellules libres viables	$9 \times 10^{10}$	$10^{10}$	$28 \times 10^6$	$28 \times 10^3$

**Tableau 8 :** Effet température sur la survie de *Lb. curvatus* libre et encapsulé.

Température (°C)	25	40	50	60
Nombre de cellules viables (UFC/ml)				
Nombre de cellules encapsulées viables	$6 \times 10^{10}$	$62 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$4 \times 10^5$
Nombre de cellules libres viables	$5 \times 10^{10}$	$9 \times 10^8$	$11 \times 10^6$	$9 \times 10^4$

**Tableau 9 :** Effet de la conservation à 4°C sur la survie de *Lb. plantarum* libre et encapsulé.

Temps (semaines)	0	1	2
Nombre de cellules viables (UFC/ml)			
Nombre de cellules encapsulées viables	$11 \times 10^{12}$	$25 \times 10^{11}$	$14 \times 10^{11}$
Nombre de cellules libres viables	$14 \times 10^{12}$	$39 \times 10^{10}$	$15 \times 10^7$

**Tableau 10 :** Effet de la conservation à 4°C sur la survie de *Lb. curvatus* libre et encapsulé.

Temps (semaines)	0	1	2
Nombre de cellules viables (UFC/ml)			
Nombre de cellules encapsulées viables	$16 \times 10^{10}$	$12 \times 10^9$	$5 \times 10^9$
Nombre de cellules libres viables	$12 \times 10^{10}$	$27 \times 10^8$	$15 \times 10^7$

**Tableau 11 :** Résistance et sensibilité de *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* aux antibiotiques

la souche	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. curvatus</i>
Antibiotique		
Céfotaxime	25 mm	22 mm
Tertacycline	21 mm	16 mm
Amoxicilline	0	0
Streptomycine	0	0
Penicilline G	27mm	26mm



**réalisé par :**

- Arid Somia
- Bouridane Hamida

**Président :** M<sup>elle</sup> Adjeroud Nawel

**Examineur :** M<sup>me</sup> Bousdira Fathia

**Encadreur :** D<sup>r</sup> Ouled Haddar Houria

**Thème :**

**L'effet de la microencapsulation des bactéries lactiques par différents matrice sur leur aptitude probiotiques et technologiques**

**Résumé :**

Notre étude a été consacrée à l'affirmation de l'efficacité de la microencapsulation des deux bactéries lactiques probiotiques dans différentes matrices, pour les protéger contre les conditions hostiles du tractus gastro-intestinal. La tolérance des deux souches de *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* à l'acidité (pH=2), aux sels biliaires et aux enzymes pancréatiques par simulation des conditions gastro-intestinales a été évaluée, en plus de son impact sur quelques aptitudes technologiques par l'étude de l'effet de la conservation au froid (4°C) et les traitements thermiques. Pour confirmer leur potentiel probiotique, des tests complémentaires ont été réalisés pour vérifier leur capacité d'adhésion aux cellules intestinales et son profil de résistance aux antibiotiques. Les résultats montraient que les deux souches sont résistantes à l'acidité, à la toxicité des sels biliaires, à la digestion par les enzymes pancréatiques, à la conservation au froid et aux traitements thermiques, et particulièrement à l'état encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%, ce qui confirme l'efficacité de la microencapsulation dans l'amélioration de la survie, dans les conditions similaires à celles du tractus gastro-intestinal.

**Mots clés :** Bactérie probiotique, matrice, microencapsulation, amélioration de la viabilité.

**Abstract:**

Our study has focused on the affirmation of the protective effect of microencapsulation of two probiotic lactic acid bacterium by several matrix against the hostile gastrointestinal tract conditions. The tolerance of *Lb. plantarum* and *Lb. curvatus* to acidic pH, bile salts and pancreatic enzymes was evaluated. In addition, the effect of cold storage and heat treatment on viability was also tested. To confirm their potential probiotic properties, further tests were carried out, like adherence to intestinal cells and antibiotic resistance. The results showed that both strains are resistant to low pH, bile salts, digestion by pancreatic enzymes, cold storage and heat treatment, particularly when encapsulated in sodium alginate. Microencapsulation enhances the viability of probiotic strains in gastrointestinal-like condition.

**Key words:** probiotic bacterium, Matrix, Microencapsulation, Enhancement of viability

**المخلص:**

كرس هذا البحث من أجل دراسة فاعلية الكبسلة الدقيقة لسلاطين من البكتيريا اللبنية البروبيوتكية بواسطة مواد مختلفة، وذلك لحمايتها من الظروف غير الملائمة الموجودة في الجهاز الهضمي، تمت دراسة مدى مقاومة السلالتين البروبيوتكية *Lb. plantarum* و *Lb. curvatus* للحموضة المنخفضة (pH2) والأملاح الصفراوية و كذلك للأنزيمات البنكرياسية، بالإضافة إلى تأثير بعض على العوامل التقنية من خلال دراسة تأثير التخزين في درجة حرارة منخفضة 4 °C والمعالجة الحرارية. و من أجل إثبات مميزاتها البروبيوتكية، أجريت المزيد من الاختبارات مثل قابلية التصاق بالخلايا المعوية و مدى مقاومتها للمضادات الحيوية. وأظهرت النتائج أن كلا السلالتين مقاومة للحموضة و سمية الأملاح الصفراوية وللهمض بواسطة أنزيمات البنكرياس وكذلك للتخزين وللمعالجة الحرارية وخصوصا في حالة الكبسلة في هلام الألبينات فيما يبرهن فاعلية الكبسلة في تحسين نسبة الحيوية في الظروف المشابهة لظروف الجهاز الهضمي.

**الكلمات المفتاحية :** البكتيريا البروبيوتكية، الكبسلة الدقيقة، مواد الكبسلة الدقيقة، تحسين الحيوية