

Université de Jijel

Faculté des Sciences Exactes, et des  
Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie  
Moléculaire et Cellulaire



M.M.B.06/12

جامعة جيجل

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة  
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

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

Option : *Microbiologie Appliquée*

Thème

*Propriétés probiotiques des cellules libres et encapsulées  
d'un Lactobacillus curvatus bactériocinogène d'origine  
humaine*



**Membres de jury:**

**Président:** Mr. Khennouf Tarek

**Examineur:** Mme. Bousdira Fathia

**Encadreur:** Dr. Sifour Mohamed



**Présenté par:**

**Gharbi Nour el yakine**

**Graidia Houda**

**Année universitaire: 2011-2012**



# REMERCIEMENT

*Après avoir accomplir notre travail qui a conservé 3 mois de notre temps, d'efforts et de sacrifices, grâce au Bon dieu que nous avons réussi, nous remercions Allah, qui nous à porter chance à atteindre notre but. Merci Allah.*

*A cette occasion, nous remercions l'honorable Dr. Sifour Mohamed, qui a sacrifié de son temps afin de nous soutenir et nous guider pour pouvoir entamer ce travail pour le quel, il nous a fait confiance. Merci une autre fois Dr. Sifour, de votre comportement envers nous, pas seulement comme enseignant mais plus que ça, parce que grâce à vous et votre assurance qu'on a pu atteindre notre but.*

*Nous tenons à remercier monsieur le président des membres de jury Mr. Khennouf Tarek,*

*Nous remercions aussi, Mme. Bousdira Fathia pour le temps que vous avez disposé afin de consulter et évaluer notre travail, et espérant qu'il soit à l'hauteur.*

*Merci à tous les employés du laboratoire pour leur aide et la qualité de leurs prestations.*

*Un grand merci pour tous nos enseignants. Nous sommes très reconnaissantes à tous ceux qui ont participé pendant nos années d'études, d'enrichir nos savoirs et c'est grâce qu'on est arrivées à ce niveau.*

*Sans oublier de présenter un grand remerciement à nos chers parents, qui nous ont beaucoup soutenu et aider sur tous les plants de nos naissances jusqu'à ce jour, Merci à nos frères et sœurs, spécialement Rachida, Asma et Bouthaina, Merci à nos amies surtout Hadjer qui a nous a beaucoup aider, sans oublier Takoua, Radja, Wissem et Fela.*

*Merci aussi à tous ceux qui ont aidés de près ou de loin.*



# Sommaire

	<b>Page</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>I</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTE DES ABRIVIATIONS</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>VII</b>

## Partie I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
<b>I. LES PROBIOTIQUES ET LES BACTERIES LACTIQUES</b> .....	3
<b>I.1. Caractères généraux des bactéries lactiques</b> .....	3
<b>I.2. Le genre <i>Lactobacillus</i></b> .....	3
<b>I.3. Historique et définition des probiotiques</b> .....	4
<b>I.4. Les microorganismes probiotiques</b> .....	4
<b>I.5. Critères de sélection des probiotiques</b> .....	5
<b>I.5.1. Résistance aux conditions hostiles du tractus gastro-intestinal</b> .....	6
<b>I.5.2. La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale</b> .....	6
<b>I.5.3. La production de composés antimicrobiens</b> .....	7
<b>I.5.3.1. Le pH et les acides organiques</b> .....	7
<b>I.5.3.2. Le peroxyde d'hydrogène</b> .....	7
<b>I.5.3.3. Les bactériocines</b> .....	8
<b>I.5.3.3.1. Définition</b> .....	8
<b>I.5.3.3.2. Classification</b> .....	8
<b>I.5.3.3.3. Le mode d'action</b> .....	9
<b>I.6. Effet bénéfique des probiotiques sur la santé</b> .....	11
<b>I.6.1. Les infections gastro-intestinales</b> .....	12
<b>I.6.2. Diarrhées associées aux antibiothérapies</b> .....	12
<b>I.6.3. Infections intestinales à <i>Helicobacter pylori</i></b> .....	12
<b>I.6.4. Renforcer le système immunitaire</b> .....	13
<b>I.6.5. Allergies-eczéma</b> .....	13
<b>I.6.6. Syndrome du côlon irritable</b> .....	13



I.6.7. Un effet sur le cholestérol.....	13
I.6.8. Des effets anticancéreux.....	13
I.6.9. Intolérance au lactose.....	13
I.6.10. Constipation.....	14
II. Les probiotiques encapsulés.....	14
II.1. Définition de la microencapsulation.....	14
II.2. Approche méthodologique de la microencapsulation des probiotiques.....	14
II.3. Les avantages de la microencapsulation.....	15
II.4. Domaines d'application des probiotiques encapsulés.....	16
II.4.1. Les probiotiques encapsulés dans les produits alimentaires.....	16
II.4.2. Les probiotiques encapsulés dans les produits pharmaceutiques.....	16

## Partie II : ETUDE EXPERIMENTALE

<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>18</b>
I. Matériels.....	18
I.1. Matériel biologique : souches bactériennes.....	18
I.2. Produits et réactifs.....	18
I.3. Appareillage.....	18
II. Méthodes.....	19
II.1. Revivification de la souche bactérienne.....	19
II.2. Microencapsulation de la souche probiotique dans un gel d'alginate de sodium à 2% Préparation de la souche.....	19
II.3. Evaluation des aptitudes probiotiques de la souche <i>Lb. curvatus</i> G6 <i>in vitro</i> .....	19
II.3.1. Tolérance aux acides.....	19
II.3.2. Tolérance aux sels biliaires.....	20
II.3.3. Tolérance aux enzymes pancréatiques par la simulation des conditions intestinales.....	20
II.4. Evaluation des aptitudes technologiques de la souche <i>Lb. curvatus</i> G6 <i>in vitro</i> .....	20
II.4.1. Tolérance à différentes températures.....	20
II.4.2. Résistance à la conservation au froid.....	20
II.5. Tests complémentaires pour la confirmation des aptitudes probiotiques.....	20
II.5.1 Test d'adhésion aux cellules épithéliales.....	21
II.5.2. Test d'hydrophobicité.....	21
II.5.3. Test d'autoagrégation et coagrégation.....	22
<b>III. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>23</b>
III.1. Aspect et taille des billes.....	23
III.2. Evaluation des aptitudes probiotiques de <i>Lb. curvatus</i> G6 <i>in vitro</i> .....	23
III.2.1. Test de la tolérance de <i>Lb. curvatus</i> G6 libre et encapsulé aux conditions acides.....	23
III.2.2. Test de la tolérance de <i>Lb. curvatus</i> G6 libre et encapsulé aux sels biliaires.....	25
III.2.3. Test de la tolérance de <i>Lb. curvatus</i> G6 libre et encapsulé aux enzymes pancréatiques par simulation du fluide intestinal.....	26
III.3. Evaluation des aptitudes technologiques de <i>Lb. curvatus</i> G6 <i>in vitro</i> .....	28
III.3.1. Test de la thermorésistance de <i>Lb. curvatus</i> G6 libre et encapsulé.....	28
III.3.2. Test de la conservation à 4°C de <i>Lb. curvatus</i> G6 libre et encapsulé.....	30
III.4. Tests complémentaires pour la confirmation des aptitudes probiotiques.....	31

<b>III.4.1.</b> Test d'adhésion aux cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et le rôle de l'hydrophobicité de surface.....	31
<b>III.4.2.</b> Test d'agrégation : autoagrégation et coagrégation.....	32
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	35
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	36
<b>ANNEXE</b>	
<b>RESUME</b>	



## Liste des abréviations

CaCl <sub>2</sub>	Chloride de calcium
DO	densité optique
FAO	Food and Agriculture Organization
GRAS	Generally regarded as safe
M	molarité
ME	microencapsulation
N	normalité
nm	nanomètre
OMS	Organisation mondiale de la santé
PMF	force proton motrice
SIF	fluide intestinal simulé
TGI	tractus gastrointestinal
UFC	unité formant colonie

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> : Micro-organismes considérés comme probiotiques.....	5
<b>Tableau 2.</b> Proposition de critères de sélection des probiotiques à application intestinale.....	6
<b>Tableau 3.</b> Effets positifs des probiotiques sur la santé humain.....	12
<b>Tableau 4.</b> Les souches probiotiques commercialisées comme produits pharmaceutiques en chine.....	17
<b>Tableau 5.</b> Souches utilisées pour tester la coagrégation.....	18
<b>Tableau 6.</b> Résultats du test d'hydrophobicité.....	32

# Partie I

## Analyse Bibliographique



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques.....	11
<b>Figure 2.</b> Procédés d'encapsulation des microorganismes par les techniques d'extrusion et d'émulsification.....	15
<b>Figure 3.</b> L'aspect des billes d'alginate de sodium à 2%.....	23
<b>Figure 4.</b> Effet de l'acidité (pH2) sur la survie de <i>Lb. curvatus</i> G6 libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%.....	24
<b>Figure 5.</b> Survie de <i>Lb. curvatus</i> G6 libre et encapsulé dans l'alginate de sodium incubé à 0.3% de sels biliaires.....	26
<b>Figure 6.</b> Effet de la pancréatine sur la survie de <i>Lb. curvatus</i> G6 libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%.....	27
<b>Figure 7.</b> Effet de la température sur la survie de <i>Lb. curvatus</i> G6 libre et encapsulé dans l'alginate de sodium 2%.....	29
<b>Figure 8.</b> Effet de la conservation à 4°C sur la survie de <i>Lb. curvatus</i> G6 libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%.....	30
<b>Figure 9.</b> Photomicrographie d'adhésion de la souche <i>Lb. curvatus</i> G6 aux cellules épithéliales.....	31
<b>Figure 10.</b> Le pourcentage de l'autoagrégation et la coagrégation de <i>Lb. curvatus</i> G6 avec les différentes souches.....	33

**Introduction**

**Générale**

# Introduction Générale

Chaque jour, nous ingérons un grand nombre de bactéries vivantes. Parfois celles-ci sont présentes de manière fortuite dans les aliments, alors que certaines sont introduites intentionnellement dans quelques produits (fromage, lait fermenté, saucisson etc), où elles participent à leur transformation. Cependant, depuis une dizaine d'années, de nouvelles bactéries (probiotiques) sont sélectionnées et incorporées aux produits alimentaires pour leur capacité à modifier les caractères organoleptiques du produit, mais également pour induire des effets bénéfiques sur la santé humaine (AFSSA, 2005).

D'autre part, le concept de probiotiques issu des travaux de Metchnikoff, réalisés au tout début du XX<sup>e</sup> siècle, qui a supposé que la longévité et la bonne santé des paysannes Bulgares était le résultat de la consommation de produits laitiers fermentés contenant des ferments du genre *Lactobacillus* (Morelli, 2000).

A la même époque, Henry Tissier, pédiatre Français, a observé que les selles d'enfants souffrant de diarrhée, contenaient un petit nombre de bactéries caractérisées par une morphologie particulière, bactéries abondantes chez les enfants sains. A son avis ces dernières pourraient être administrées aux patients souffrants de diarrhée afin de les aider à rétablir une flore intestinale saine (Guarner et al., 2008).

De nos jours, les probiotiques sont définis comme étant des microorganismes viables qui, ingérés en nombre suffisant, ont un effet bénéfique sur la prévention et le traitement de pathologies spécifiques (Anal et Singh, 2007). Ces microorganismes correspondent à une large gamme de germes notamment les bactéries, mais aussi des 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 peuvent être dues à la production d'acides et/ou de bactériocines, les concurrences avec les agents pathogènes et la stimulation du système immunitaire (Burgain et al., 2011).

Par ailleurs, l'effet bénéfique des probiotiques n'apparaît que s'ils atteignent la lumière intestinale en quantité suffisante. Toutefois, plusieurs recherches ont montré que la viabilité et la capacité de survie des probiotiques dans le tractus gastrointestinal (TGI) ainsi que dans les produits fermentés, sont diminuées à cause de leur exposition aux facteurs environnementaux défavorables tels que, les conditions acide-bile du TGI, le traitement thermique et la longue période de conservation. ce qui a encouragé les chercheurs à développer de nouvelles méthodes pour améliorer la viabilité des probiotiques (Anal et Singh, 2007) telle que la microencapsulation dans une matrice alimentaire.

La technologie de la microencapsulation, par rapport à d'autres approches d'amélioration de la viabilité, semble plus prometteuse étant donné qu'elle permet aux probiotiques d'atteindre, sous forme active et plus concentrée, leur présumés sites d'actions. Différentes techniques de microencapsulation ont été développées comme l'émulsion, l'extrusion et le séchage par atomisation. Quant à la matrice alimentaire employée, l'alginate, additif alimentaire biocompatible avec les microorganismes probiotiques, a la capacité de se lier avec les cations comme le  $\text{Ca}^{+2}$  (Malmo et al., 2011).

Dans ce travail, on s'intéresse à mettre le point sur une technique de microencapsulation des cellules dans un gel d'alginate et son effet sur quelques aptitudes probiotiques et technologiques.

## I. LES PROBIOTIQUES ET LES BACTERIE LACTIQUES

### I.1. Caractères généraux des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles sont non pigmentées, aérobies-anaérobies facultatives, Gram-positif, catalase négatives à l'exception de certains genres à pseudocatalase et tolérantes à des pH acides. Leur forme peut être coccoïde, coccobacillaire, ou bacillaire. Elles sont généralement mésophiles (**Smaoui, 2010**). Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. Lorsque l'acide lactique est le seul produit terminal, il s'agit des bactéries lactiques homofermentaires (Certaines espèces peuvent produire au moins 18 moles d'acide lactique par mole de glucose fermenté). Parfois, en plus de l'acide lactique, d'autres composés constitués principalement d'acide acétique, d'éthanol et de gaz carbonique sont produits : c'est le cas des hétérofermentaires (produisent uniquement 1 mole d'acide lactique par mole de glucose fermenté) (**Bekhouche, 2006**). Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Makhloufi, 2012**).

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (**Dortu et Thonart, 2009**).

Enfin, les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se font attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe). Cependant, parmi elles quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (**Makhloufi, 2012**).

### I.2. 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 (**Bekhouche, 2006**). Les cellules, à coloration de Gram positive, non sporulées et généralement non mobiles, peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs et fins, ou très courts, ou incurvés ou même ovoïdes. La formation de chaînes de cellules est courante (**Tailliez, 2004**). 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 aérotolestants et acidophiles, avec un optimum de pH entre 5,5 et 6,2, leurs pourcentages en GC sont de 36 à 47. De plus ces microorganismes sont auxotrophes avec de fortes exigences en facteurs de croissance (**Privat et Thonart, 2011**).

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 curvatus*

Les cellules sont des bacilles courbées avec des extrémités arrondies, elles se présentent en paires ou en courtes chaînes, qui sont fréquemment observées et habituellement immobiles.



L'espèce *Lactobacillus curvatus* appartient au groupe des hétérofermentaires facultatifs. 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 (Klein *et al.*, 1996). Comme exemple la souche *Lb. curvatus* G7 a été isolée à partir du jabot de poulet, il a été montré que cette souche présente une bonne activité probiotique qui se traduit par l'activité antimicrobienne contre plusieurs bactéries pathogènes, la capacité à adhérer aux cellules épithéliales ainsi que la viabilité dans les conditions hostiles de tractus gastrointestinale (Oueled-Haddar *et al.*, 2012). L'espèce *Lb. curvatus* a la capacité de produire la curvacine, une bactériocine 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.3. Historique et définition des probiotiques

Le terme probiotique dérive de deux mots grecs, *pros* et *bios*, qui signifient littéralement « pour la vie ». En 1907 Metchnikoff fut le premier travail sur le concept des probiotiques, qui suggéra que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes accroît la longévité en réduisant dans le tube digestif la population de bactéries putréfiantes ou produisant des toxines. En 1965 Lilly et Stillwell ont défini les probiotiques comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes ». D'après Parker (1974), les probiotiques sont « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». Plus tard, Fuller propose une définition très proche du sens actuel : « supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale ».

Une dizaine d'année après, la FAO et l'OMS (2002), ont établi la définition suivante : « micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère » (Reid *et al.*, 2003 ; Ait Belgnaoui, 2006 ; Makhloufi, 2012).

### I.4. Les microorganismes probiotiques

Sont considérés comme probiotiques, différentes souches bactériennes ainsi que les levures, comme cité dans le **Tableau 1**, qui présentent un effet bénéfique pour l'hôte. Ils sont principalement des bactéries lactiques et des bifidobactéries (Ait Belgnaoui, 2006 ; Vasiljevic *et Shah*, 2008).



**Tableau 1 : Micro-organismes considérés comme probiotiques (Ait Belgnaoui, 2006).**

Lactobacillus	Bifidobacterium	Autres bactéries lactiques	Autres micro-organismes
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus</i> spp,
<i>L. amylovirus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain Nissle
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>L. cellobius</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilis</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. farciminis</i>		<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. fermentum</i>			
<i>L. gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Les bactéries de l'acide lactique, y compris des espèces de *Lactobacillus*, utilisées pour la conservation de la nourriture par fermentation depuis des milliers d'années, peuvent jouer un double rôle comme agents de fermentation alimentaire et comme agents bénéfiques pour la santé. La fermentation des aliments leur donne un goût particulier et diminue le pH, ce qui empêche la contamination par des agents pathogènes potentiels. La fermentation concerne globalement un vaste ensemble de produits agricoles (céréales, racines, tubercules, fruits, légumes, lait, viande, poissons, etc.) (Guarner et al., 2008).

Les bifidobactéries d'origine humaine ou animale appartiennent à la flore intestinale normale et possèdent une bonne résistance aux sucs gastriques. La population de *Bifidobacterium* diminue avec l'âge et leurs espèces varient selon l'âge (Robin et Rouchy, 2001). Une bifidobactérie a d'abord été isolée par Henry Tissier (de l'Institut Pasteur) à partir d'un enfant nourri au sein, et il l'appela *Bacillus bifidus communis*. Tissier affirma que la bifidobactérie réduirait la bactérie protéolytique qui cause la diarrhée et il recommanda l'administration de bifidobactéries aux enfants souffrant de ce symptôme (Guarner et al., 2008).

### 1.5. Critères de sélection des probiotiques

Afin de satisfaire à la définition des probiotiques, les microorganismes doivent survivre, être actifs et persister temporairement dans le tractus digestif. Ils doivent aussi posséder des effets positifs pour 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 (AFSSA, 2003 ; Rousseau, 2004). Les microorganismes potentiellement probiotiques doivent donc être sélectionnés selon différents critères décrits dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2 :** Proposition de critères de sélection des probiotiques à application intestinale (Rousseau, 2004).

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ souche pour l'usage humain d'origine humaine (isolée du tractus intestinal d'un homme sain) ou alimentaire (utilisée dans les produits fermentés)</li> <li>▪ souche déposée dans une collection de culture reconnue internationalement</li> <li>▪ souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques</li> <li>▪ historique de non pathogénicité</li> <li>▪ pas de déconjugaison excessive des sels biliaires au risque d'induire des lyses cellulaires</li> <li>▪ pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques</li> <li>▪ pas de dégradation excessive du mucus</li> </ul>
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ tolérance à l'acidité et aux enzymes gastriques</li> <li>▪ tolérance à la bile et aux enzymes digestives</li> <li>▪ adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus gastro-intestinal</li> <li>▪ immunostimulation</li> <li>▪ production de substances antimicrobiennes et antagonisme vis-à-vis des pathogènes</li> <li>▪ effets sur la santé documentés</li> </ul>
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini</li> <li>▪ conservation des propriétés probiotiques après production</li> </ul>

### I.5.1. 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 microorganismes, à cause de la production de plusieurs agents bactéricides, notamment la zone de l'estomac à cause de son contenu acide: l'acide chlorhydrique sécrété par la muqueuse gastrique, ce qui 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 (Merritt et Donaldson, 2009 ; Gbassi, 2010).

La zone de l'intestin grêle est aussi considérée comme une zone défavorable à cause de la bile qui y est présente ; raison pour laquelle la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Plusieurs bactéries lactiques d'origine intestinale ont développé des mécanismes pour résister à l'action détergente des sels biliaires et acquies la capacité de les transformer ; cette activité est la déconjugaison des sels biliaires grâce à l'enzyme « bile salt hydrolase ».

Il a été proposé que la déconjugaison des sels biliaires possède des effets bénéfiques sur l'hôte comme la diminution des niveaux de cholestérol (Roy, 2006 ; Gbassi, 2010). Récemment la tolérance aux enzymes pancréatique a été proposée comme un critère principal de sélection des probiotiques (Robin et Rouchy, 2001 ; Denis *et al.*, 2006 ; Gbassi, 2010).

### I.5.2. La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale

La capacité des souches à adhérer à la muqueuse intestinale est un des principaux critères de sélection des bactéries probiotiques. Il est largement accepté que plus une bactérie passe du

temps dans le tractus gastro-intestinal, plus elle aura de chances d'exercer un effet bénéfique pour l'hôte. La capacité d'adhésion au mucus ou aux cellules épithéliales conditionne le temps de résidence intestinale et par conséquent la capacité de colonisation, au moins temporaire, du tractus gastro-intestinal. Ainsi les bactéries adhérentes peuvent séjourner dans l'intestin plus longtemps que ce que permettrait le transit normal, contrairement aux bactéries non-adhérentes qui sont facilement évacuées à cause du péristaltisme (**Izquierdo, 2009**).

Par ailleurs, plusieurs des effets bénéfiques des bactéries probiotiques sont directement liés à la capacité d'adhésion. Ainsi, l'adhésion est importante pour l'immunomodulation, car seules les bactéries adhérentes sont en contact avec les cellules immunes de l'épithélium. Elle est également importante pour le déplacement et l'inhibition des pathogènes par des mécanismes de compétition (**Robin et Rouchy, 2001 ; Izquierdo, 2009**).

### **1.5.3. 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 bactéries lactiques 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 bactéries lactiques qui ont des avantages considérables pour la concurrence avec les agents pathogènes et d'autres bactéries nocives et qui comprennent des acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les mieux étudiés sont les «bactériocines» (**Labioui et al., 2005**).

#### **1.5.3.1. Le pH et les acides organiques**

Par leur présence impérative dans les produits fermentés, les bactéries lactiques créent des conditions d'acidité inhibant d'autres microorganismes. Cette inhibition est due à deux facteurs principaux qui doivent être pris en compte : le pH et les acides organiques (**Piard et al., 1992**). Les acides organiques sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires. Grâce à cette production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe. Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération de protons, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (**Smaoui, 2010**). Les acides organiques sont un des agents classiques de préservation des aliments et sont reconnus comme additifs alimentaires. Les acides couramment utilisés sont les acides benzoïque, sorbique, acétique, fumarique, propionique et lactique (**Dortu et Thonart, 2009; Smaoui, 2010**).

#### **1.5.3.2. Le peroxyde d'hydrogène**

Il a été démontré que dans certaines conditions, notamment en présence d'oxygène, les bactéries lactiques peuvent produire du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui est un composé toxique pour différentes bactéries et surtout sur celles dépourvues de catalase ou de pseudocatalase capable de dégrader ce composé toxique (**Chamba et al., 1994**).



Certaines bactéries lactiques peuvent néanmoins se protéger contre le peroxyde d'hydrogène qu'elles produisent par la synthèse de catalase hexamérique ou tétramérique contenant du manganèse et qui sont parfois décrites comme étant des pseudocatalases. Le peroxyde d'oxygène peut s'accumuler et être inhibiteur de différents microorganismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (**Dortu et Thonart, 2009; Smaoui, 2010**). D'autre part, il a été démontré que l' $H_2O_2$  active le système lactoperoxydase thiocyanate dans le lait en produisant un dérivé oxydé du thiocyanate qui en plus de son action bactéricide sur les germes Gram négatifs, induit l'inhibition des enzymes de la glycolyse, des systèmes de transport des sucres et des acides aminés (**Piard et al., 1992**).

### **I.5.3.3. Les bactériocines**

La biosynthèse des bactériocines semble assez commune chez les bactéries lactiques. Des études ont montré que des bactéries peuvent synthétiser des bactériocines actives non seulement contre d'autres bactéries lactiques, mais également contre d'autres bactéries Gram+, et selon certains, contre des bactéries Gram-, parmi lesquelles on rencontre des entérobactéries et des germes pathogènes (**Roger, 2005**).

#### **I.5.3.3.1. Définition des bactériocines**

Les bactériocines sont des substances antimicrobiennes de nature protéique ou partiellement protéique et dont l'activité inhibitrice est dirigée contre des espèces taxonomiquement proches du microorganisme producteur (**Tagg et al., 1976; Cenatiempo et al., 1996; Daoudi, 2000; Lachance, 2000**). Il a été montré que les bactériocines peuvent avoir un effet bactéricide sur les souches sensibles qui ne sont pas nécessairement proches sur le plan phylogénétique de la cellule productrice (**Daoudi, 2000**).

#### **I.5.3.3.2. Classification des bactériocines**

Afin de faciliter leur identification, différentes méthodes de classification ont été proposées. La première est fondée sur les spectres d'action (**Klaenhammer 1988**). Les connaissances acquises ont permis de créer une classification reposant sur les structures et les mécanismes d'action des bactériocines (**Klaenhammer 1993**). Cette dernière a été modifiée par l'ajout de sous-classes et est actuellement utilisée (**Jasniewski, 2008**).

Cette classification se décompose en quatre classes distinctes :

#### **Classe I- Lantibiotiques**

Il s'agit de peptides de taille réduite (<5kDa) contenant des acides aminés inhabituels obtenus par modification post-traductionnelle. Un de ces acides aminés caractéristiques est la lanthionine, c'est pourquoi les bactériocines appartenant à la classe I sont appelées lantibiotiques pour « *lanthionine containing antibiotics* » (**Jasniewski, 2008**). Ils sont stables à la chaleur (**Smaoui, 2010**). La nisine, la lacticine 481, la carnocine UI49 et la lactocine font partie de cette classe (**Daoudi, 2000**). Ils peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui contient des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés (**Dortu et Thonart, 2009**). Et la classe Ib qui contient les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (**McAuliffe et al., 2001 ; Twomey et**

*al.*, 2002; **Jasniewski, 2008**). Certains lantibiotiques n'appartiennent ni au type A ni au type B, comme la mutacine II (**Woodruff et al., 1998 ; Jasniewski, 2008**).

### Classe II

Cette classe regroupe les petites bactériocines (<10kDa) thermostables et ne subissant de modification post-traditionnelle ; cependant elles sont généralement synthétisées sous forme d'un peptide qui sera mûri lors de son excrétion dans le milieu extracellulaire (**Jasniewski, 2008**). Ces peptides sont hydrophobes, cationiques et adoptent une structure secondaire en hélice  $\alpha$  en milieu apolaire (**Wang et al., 1999 ; Sprules et al., 2004 ; Jasniewski, 2008**). Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10 (**Dortu et Thonart, 2009 ; Smaoui, 2010**).

Ces bactériocines peuvent être divisés en trois sous classes :

-La sous-classe IIa : ces bactériocines contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (**Fimland et al., 2000 ; Richard et al., 2006 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Smaoui, 2010**).

-La sous-classe IIb : la classe IIb correspond à des bactériocines à deux composants. L'activité optimale dépend de l'action conjuguée des deux peptides. Ces peptides peuvent être soit actifs individuellement, mais ils agissent de façon synergique quand ils sont associés (comme l'entérocoque L50A/L50B) (**Cintas et al., 1998 ; Jasniewski, 2008**) soit inactifs individuellement, et leur activité antagoniste est subordonnée à l'association des deux peptides (**Van Belkum et al., 1991 ; Nissen-Meyer et al., 1992 ; Diep et al., 1996 ; Jasniewski, 2008**).

-La sous-classe IIc : il a été proposé par **Hécharde et Sahi (2002)**, que les bactériocines de la classe II n'appartenant pas aux sous-classe IIa et IIb précédemment décrites seront considérées comme étant de sous-classe IIc.

### Classe III

Les bactériocines de classe III sont caractérisées par leur grande taille, il s'agit de protéines dont la masse est supérieure à 30 kDa (**Joerger et Klaenhammer, 1990**). Ces protéines, contrairement aux peptides de la classe II, ne sont pas thermostables (**Jasniewski, 2008**). Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (**Nilsen et al., 2003 ; Nigutova et al., 2007 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Smaoui, 2010**).

### Classe IV

Les bactériocines de classe IV étaient définies comme des protéines associées à une composante non protéique, lipidique et/ou oligosaccharidique, nécessaires à leur activité biologique (**Jimenez-diaz et al., 1993**). Cette classe est très peu représentée voire éliminée (**Drider et al., 2006**). Un exemple de type, la plantaricine S, qui possède une activité antibactérienne sensible à des enzymes lipolytiques et glycolytiques (**Jimenez-diaz et al., 1993**).

#### I.5.3.3.3. Le mode d'action :

Le mode d'action des bactériocines est leur effet « macroscopique » sur une population de bactéries cibles. Il est généralement admis que les bactériocines produites par des bactéries

lactiques agissent sur les cellules cibles en deux temps : adsorption de la bactériocine sur la surface cellulaire suivi d'un effet létal (Tagg et al., 1976 ; Jasniewski, 2008). Après leur adsorption sur les bactéries sensibles, les bactériocines peuvent avoir trois types d'effets : (i) un effet bactériostatique, c'est-à-dire un ralentissement ou un arrêt de la croissance, sans mortalité cellulaire. Une reprise de croissance peut être observée dans certains cas après un certain temps de contact entre les bactéries et la bactériocine ; (ii) un effet bactéricide ; une mort cellulaire est observée mais les bactéries gardent leur intégrité physique, car il n'y pas de lyse ; (iii) un effet bactériolytique ; la mort des bactéries est principalement due à leur lyse (Jasniewski, 2008).

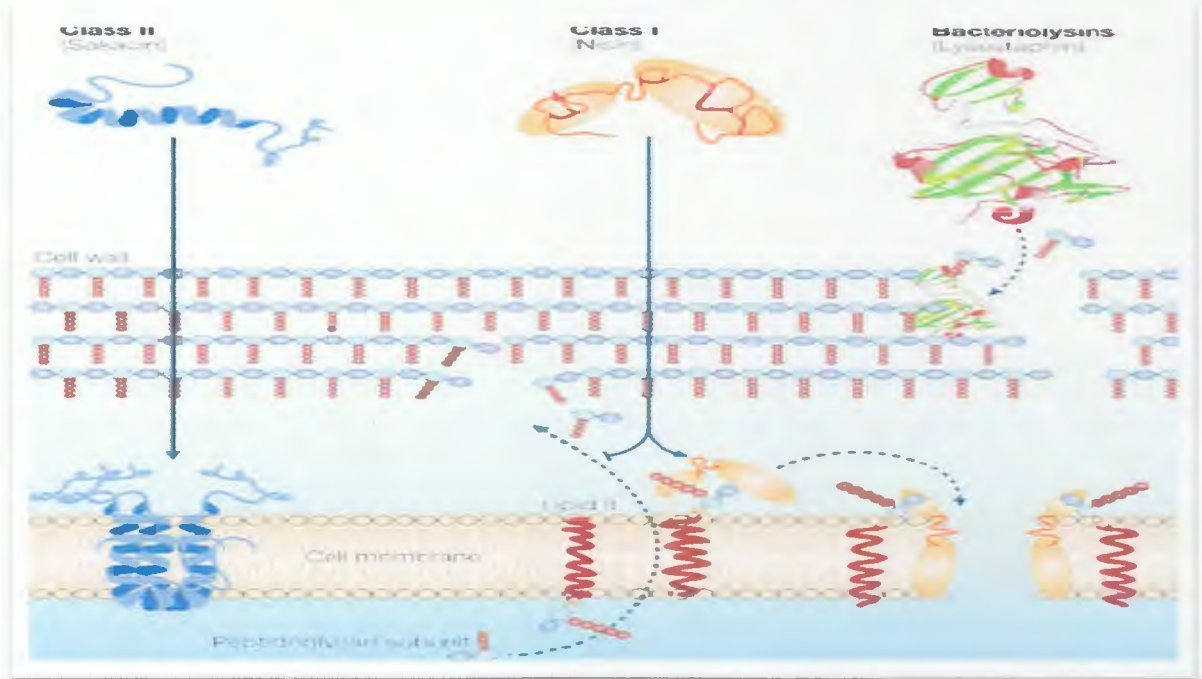
La taille de bactériocines de classe I ou II ne permettant pas à une seule molécule de perforer la membrane plasmique, les modèles existants font appel à une action coopérative de plusieurs molécules de bactériocines pour aboutir à la création de pores, dont la taille dépend du nombre de molécules associées (Cenatiempo et al., 1996).

Les bactériocines de la classe II représentent le cas typique de bactériocines agissant sur la membrane cytoplasmique des cellules sensibles en dissipant la force proton motrice (PMF) par la formation de petits pores membranaires. Ceci est précédé par une interaction des résidus chargés positivement et des régions hydrophobes de structure hélicoïdale de la bactériocine avec les membranes cytoplasmiques, caractérisées par un potentiel transmembranaire élevé et des phospholipides chargés négativement (Naghmouchi, 2007 ; Parada, 2007 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Izquierdo, 2009).

D'un autre côté, certains lantibiotiques, comme par exemple la nisine, montrent un mode d'action double : d'une part elles s'attachent au lipide II, le principal transporteur des unités de peptidoglycane du cytoplasme à la paroi cellulaire, ce qui empêche la synthèse correcte de la paroi cellulaire, causant la mort de la cellule ; d'autre part elles utilisent le lipide II comme point d'ancrage pour initier le processus d'insertion dans la membrane et la formation de pores provoquant la mort rapide de la cellule (Izquierdo, 2009).

Une exception au mode d'action membranaire est représentée par les bactériocines de la classe III (bactériolysines), telles que la lysostaphine, dont l'action bactéricide consiste à cliver la partie peptidique du peptidoglycane des cellules cibles. Ces différents modes d'action sont représentés dans la **Figure 1** (Izquierdo, 2009).





**Figure 1:** Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques. (Izquierdo, 2009).

### I.6. Effet bénéfique des probiotiques sur la santé

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle de l'intestin (Guarner *et al.*, 2008). Leur intérêt est non seulement fonctionnel pour améliorer la physiologie digestive et l'immunité, mais aussi thérapeutique pour le traitement de certaines pathologies digestives (Robin et Rouchy, 2001). Quelques préparations de probiotiques ont été utilisées pour prévenir la diarrhée induite par les antibiotiques, ou comme part d'un traitement contre une dysbiose liée aux antibiotiques. Des études ont établi les effets des probiotiques sur un grand nombre de troubles gastro-intestinaux et extra-intestinaux, y compris les maladies inflammatoires de l'intestin, le syndrome de l'intestin irritable, les infections vaginales et des améliorations immunitaires. On a aussi cherché à connaître les effets des probiotiques sur l'eczéma atopique, l'arthrite rhumatoïde et la cirrhose du foie. Bien qu'il y ait quelques évidences cliniques du rôle des probiotiques sur la diminution du taux de cholestérol, cela reste encore controversé (Guarner *et al.*, 2008). Les effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, attribués aux probiotiques sont nombreux et les plus importants sont cités dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3 : Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine (Rousseau, 2004).**

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 - Élimination des bactéries impliquées dans la production de cancérogènes

### I.6.1. Les infections gastro-intestinales

L'un des usages les mieux reconnus des probiotiques est la prévention et le traitement des diarrhées. Plusieurs études ont démontré des améliorations lorsque des troubles diarrhéiques aigus incluant des infections à Rotavirus (Fuller, 1991), des diarrhées du voyageur (résultant d'un brusque changement d'alimentation, ou contact avec les bactéries pathogènes) ou des infections bactériennes plus sérieuses, telles celles à *Clostridium difficile* sont traités par des probiotiques (Marteau et Seksik, 2005). Chez les enfants, les probiotiques semblent avoir des effets sur les diarrhées virales probablement par une stimulation des anticorps IgA antirotavirus. L'ensemble de ces données suggérerait que les probiotiques pourraient significativement réduire la durée de la diarrhée, voire la prévenir (Reid et al., 2003).

### I.6.2. Diarrhées associées aux antibiothérapies

Les diarrhées associées aux traitements antibiotiques constituent la première indication des probiotiques. Ils limitent l'agression des antibiotiques sur la flore endogène intestinale et permettent une meilleure tolérance générale (Reid et al., 2003 ; Marteau et Seksik, 2005). *Clostridium difficile* cause presque 25% des cas de diarrhées associées aux antibiotiques, ce qui le rend le plus communément identifié et traitable dans ce cas (Narayan et al., 2010).

### I.6.3. Infections intestinales à *Helicobacter pylori*

La colonisation de la muqueuse gastrique par *Helicobacter pylori* est fréquente et souvent associée à une gastrite, un ulcère ou un cancer. Il a été prouvé in vitro que différentes souches de

probiotiques et en particulier, les lactobacilles développent une activité contre *Helicobacter pylori*. Ils agissent sur la viabilité de la bactérie et sur son adhérence aux cellules de la muqueuse intestinale (Reid et al., 2003 ; Marteau et Seksik, 2005)

### **I.6.4. Renforcer le système immunitaire**

Les sujets âgés sont plus vulnérables face aux infections en raison du déclin de leur système immunitaire et en particulier, celui de l'activité des cellules lymphoïdes. Des études ont montré qu'une supplémentation avec des probiotiques combat certains effets de l'affaiblissement du système immunitaire et en particulier, renforce l'activité des cellules naturelles tueuses (a été augmentée de 147%), suggérant que le *Lactobacillus* (*Lb. rhamnosus*) stimulait l'immunité cellulaire systémique (Foligne et al., 2007).

### **I.6.5. Allergies-eczéma**

Des perturbations de la barrière mucoale semblent être impliquées dans l'apparition de la dermatite atopique, ou eczéma. Des travaux suggèrent qu'une supplémentation en probiotiques pourrait restaurer la fonction intestinale de barrière chez des enfants souffrant de cette maladie (Drouault-Holowacz et al., 2006).

### **I.6.6. Syndrome du côlon irritable**

Le syndrome du côlon irritable provoque des crampes digestives douloureuses, des diarrhées alternant avec une constipation et d'autres symptômes. Les causes de ce syndrome ne sont pas précisément connues mais pourraient être une perturbation de la santé des bactéries intestinales. La plupart des syndromes du côlon irritable sont postérieurs à une infection. Chez l'homme, le syndrome du côlon irritable pourrait être prévenu en utilisant des probiotiques pour réduire la durée de la gastro-entérique aigue (Maragkoudakis et al., 2006).

### **I.6.7. L'effet sur le cholestérol**

Des études préliminaires ont révélé que la consommation de yaourt ou de lait fermenté contenant des probiotiques entraîne une diminution du taux de cholestérol dans le sang. *In vitro*, certaines souches de *Lactobacillus* ont la capacité d'assimiler le cholestérol. Dans des études de laboratoire, les niveaux sériques de cholestérol de rats alimentés avec du lait riche en *Lactobacillus* mélangé à leur nourriture étaient plus faibles que ceux d'animaux témoins. Les souches de *Lactobacillus* semblaient éliminer directement le cholestérol (Reid et al., 2003).

### **I.6.8. Des effets anticancéreux**

Plusieurs travaux ont mis en évidence une association inverse entre la consommation de produits laitiers fermentés, en particulier de yaourt, et le risque de tumeurs colorectales ou cancers. Chez l'homme et sur des modèles animaux, l'ingestion de bactéries lactiques diminue la concentration d'enzymes responsables de la libération d'agents mutagènes dans le côlon (Rafter, 2003 ; AFSSA, 2005).

### **I.6.9. Intolérance au lactose**

L'intolérance au lactose est provoquée par l'absence de synthèse de la lactase ou  $\beta$ -galactosidase par les cellules de la surface épithéliale de l'intestin. De ce fait, n'étant pas assimilé, le lactose, principal glucide du lait, est responsable de troubles intestinaux chez les



personnes déficientes en cette enzyme. Les bactéries lactiques produisent la  $\beta$ -galactosidase qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose : plus de 50% du lactose du lait est utilisé par les *Lactobacillus*. L'utilisation des bactéries lactiques comme probiotique facilite la digestibilité du lactose chez les personnes atteintes d'intolérance (Reid et al., 2003 ; AFSSA, 2005 ; Amrouche, 2005).

### I.6.10. Constipation

La constipation s'explique par le manque d'exercices physiques, un régime alimentaire présentant une carence en fibres, ou la prise de certains médicaments. La constipation entraîne souvent flatulences, douleurs abdominales, en bref un sentiment général de malaise. La prise de probiotiques pendant 4 semaines diminue de 50% la constipation (Reid et al., 2003).

## II. LES PROBIOTIQUES ENCAPSULES

### II.1. Définition de la microencapsulation

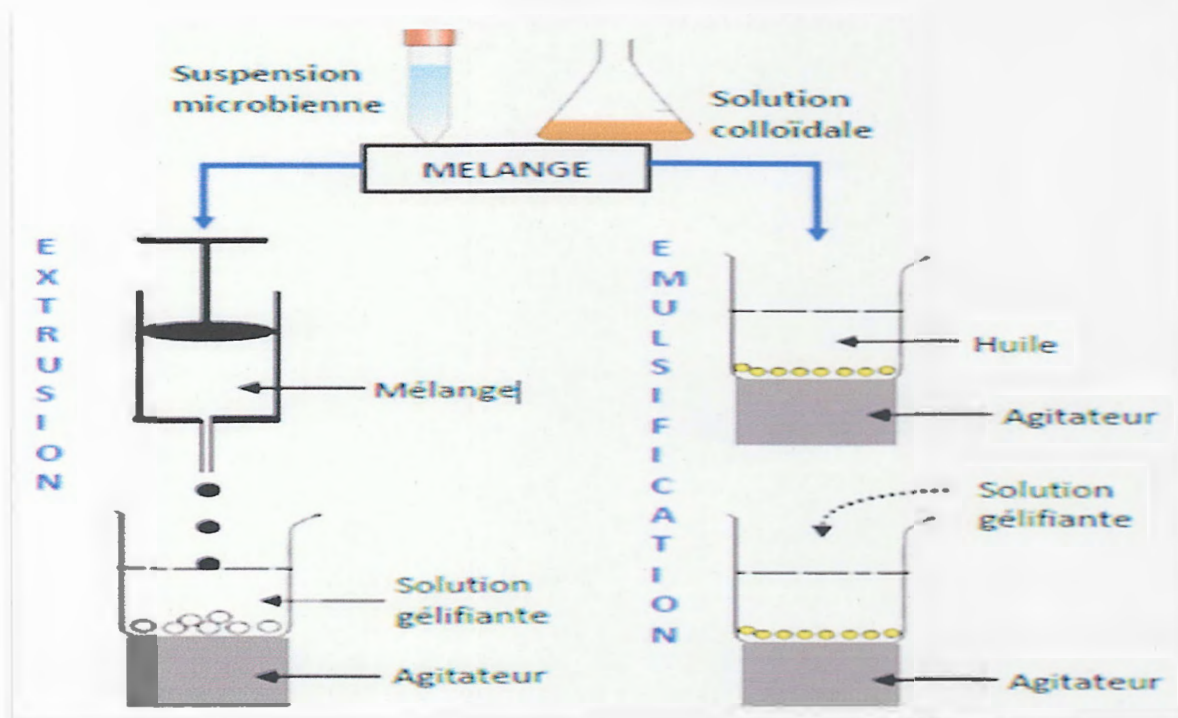
L'encapsulation est un processus physicochimique qui permet de piéger une substance ou une cellule vivante dans un matériau, afin de produire des microparticules ou des microcapsules. Ce procédé permet de former une barrière protectrice pour les probiotiques. Les matériaux utilisés doivent être de qualité alimentaire. Il s'agit le plus souvent de polymères naturels, tels que l'alginate, le carraghénane, la gomme gellane, la gélatine, l'amidon ou les protéines de lait. Les technologies utilisées pour l'encapsulation sont par exemple l'atomisation, l'émulsification ou l'extrusion (Rokka et Rantamak, 2010 ; Doleyres et Lacroix, 2011 ; Tisserand, 2011).

La taille des capsules peut varier de submicrons à quelques millimètres et elles peuvent être présentes sous différentes formes (sphérique ou elliptique). Chaque microcapsule est constituée d'une membrane (couche) semi perméable qui entoure les cellules bactériennes, peut avoir des surfaces lisses ou rugueuses, contenir une ou plusieurs cellules et peut être recouverte par une double couche (Vidhyalakshmi et al., 2009).

### II.2. Approche méthodologique de la microencapsulation des probiotiques

La microencapsulation des probiotiques nécessite de recourir à des méthodes qui soient douces, non agressives pour les cellules, et à des matériaux qui soient non toxiques et biocompatibles (Gbassi, 2010). Les premières méthodes d'encapsulation développées pour améliorer la durée de vie et conservation des cultures bactériennes consistaient à transformer des bouillons de culture en poudre sèche concentrée. Les méthodes de séchage par atomisation, par lyophilisation ou encore par lit d'air fluidisé ont montré leurs limites : faible protection vis-à-vis de l'environnement de la matrice alimentaire, absence de protection en présence d'acide ou de bile (Rokka et Rantamak, 2010).

D'autres méthodes ont fait leur apparition pour davantage améliorer la protection des cultures bactériennes. Ces méthodes avaient pour but de formuler des billes ou des capsules. Ces formes galéniques ont été réalisées à partir de solutions colloïdales, et ont fait appel aux techniques d'extrusion ou d'émulsification (Figure 2) (Gbassi, 2010).



**Figure 2:** Procédés d'encapsulation des microorganismes par les techniques d'extrusion et d'émulsification (Gbassi, 2010).

Dans l'extrusion, la solution colloïdale (à base de biopolymère) est mélangée à la suspension microbienne. Le mélange obtenu est introduit dans un dispositif d'extrusion, en général une seringue. Une pression exercée sur le piston de la seringue laisse tomber goutte à goutte le contenu de la seringue dans une solution gélifiante, sous une faible agitation. La taille et la forme des gouttes dépendent du diamètre de l'aiguille, et de la distance séparant l'aiguille de la solution gélifiante. L'extrusion est une méthode simple, de réalisation aisée, permettant la rétention d'un nombre élevé de cellules microbiennes. Des procédés automatisés exploitant ce principe sont disponibles de nos jours (Gbassi, 2010 ; Rokka et Rantamak, 2010).

Dans l'émulsification, le mélange (suspension microbienne plus solution colloïdale) constitue la phase discontinue. Cette phase est dispersée par fraction dans un volume plus grand d'huile végétale (phase continue). L'émulsion eau-dans-huile (E/H) en cours de formation est continuellement homogénéisée par agitation. L'agitation est une étape déterminante et la vitesse d'agitation l'est davantage car elle conditionne la taille et la forme des gouttelettes formées. Ces gouttelettes une fois récupérées (par filtration ou décantation) subissent un phénomène de gélification après ajout de la solution gélifiante. L'utilisation de cette technique pour l'encapsulation des probiotiques a été décrite dans la littérature (Kailasapathy, 2002 ; Petrovic et al., 2007 ; Gbassi, 2010).

### II.3. Les avantages de la microencapsulation

L'encapsulation présente les avantages suivants (Rabeau, 2009 ; Gbassi, 2010) :

- L'encapsulation garantit une bonne protection de la substance encapsulée (protection du principe actif).
- Permet de contrôler la libération de la substance encapsulée.

- Facilite l'utilisation des produits d'origine liquide.
- La possibilité de transporter un agent thérapeutique de façon sélective sur un site donné sans oublier le faible coût du procédé.
- Offre des solutions nouvelles aux problèmes de stabilité des ingrédients (vitamines, microorganismes...).
- Cibler la libération d'un principe actif.

### **II.4. Domaines d'application des probiotiques encapsulés**

#### **II.4.1. Les probiotiques encapsulés dans les produits alimentaires**

Du fait de leur bénéfice potentiel sur la santé, des bactéries probiotiques sont incorporées dans des produits alimentaires, principalement des produits laitiers. Des techniques d'encapsulation sont utilisées afin d'augmenter la viabilité de ces bactéries lors de la fabrication, du stockage des produits et dans le système digestif.

Des recherches sont menées pour développer de nouveaux produits laitiers (fromages, yaourts, crèmes glacées) mais également élargir l'utilisation des probiotiques encapsulés à d'autres produits, tels que chocolat, biscuits, saucisses, jus de fruits. Des mayonnaises sont ainsi obtenues en incorporant des bifidobactéries encapsulées dans de l'alginate qui les protège contre l'effet bactéricide du vinaigre. Des probiotiques encapsulés dans des protéines de lactosérum ont été incorporés dans des biscuits et dans du jus de canneberge. Les protéines ont un effet protecteur sur les probiotiques et l'encapsulation crée un microenvironnement approprié pour la survie des bactéries dans des conditions défavorables telles que l'acidité du jus de canneberge

Durant ces dernières années, quelques produits alimentaires contenant des probiotiques encapsulés ont cependant été introduits sur le marché, notamment un chocolat. Selon le fabricant, l'addition des probiotiques n'a pas d'influence sur les propriétés organoleptiques du produit et la consommation de 13,5g par jour de ce chocolat est suffisante pour assurer l'équilibre de la microflore intestinale. Des nutraceutiques qui contiennent des probiotiques encapsulés sont également disponibles sous forme de capsules, de comprimés ou de poudre (Rokka et Rantamak, 2010 ; Tisserand, 2011).

#### **II.4.2. 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 (Ariful *et al.*, 2010). Actuellement, il existe approximativement 100 types d'organismes probiotiques produits par le marché chinois, en majorité commercialisé comme ingrédients d'aliments fonctionnels. Des essais cliniques ont été effectués pour environ 10% des produits probiotiques, et ces derniers ont été approuvés par les autorités chinoises de réglementation pour être commercialisés en tant que produits pharmaceutiques, parmi les plus importants sont présentés dans le **Tableau 4** (Bhadoria et Mahapatra, 2011).



**Tableau 4 : Les souches probiotiques commercialisées comme produits pharmaceutiques en chine (Bhadoria et Mahapatra, 2011).**

SI. 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 Kesting 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.

# Matériels et Méthodes

## MATERIEL ET METHODES

**I. Matériel****I.1. Matériel biologique : souches bactériennes****Souche probiotique**

Une souche de *Lactobacillus curvatus* G6 a été utilisée pour cette étude, la souche a été isolée à partir des selles d'un nouveau né et conservée sur bouillon MRS supplémenté par 50% glycérol par nos collègues de l'année 2010-2011. D'après **Sifour et al. (2012)** *Lb. curvatus* G6 est une souche bactériocinogène.

**Souches tests**

Les souches utilisées pour tester la coagrégation sont classées dans le **Tableau 5**

**Tableau 5:** souches utilisées pour tester la coagrégation

Souche	Origine
<i>Lb. plantarum</i> F12	Selles de nouveau né
<i>Lb. casei ssp tolerans</i> G4	Selles de nouveau né
<i>Lb. plantarum</i>	Selles de nouveau né
Méthycilin résistant <i>Staphyococcus aureus</i> (MRSA)	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-

**I.2. Produits et réactifs**

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

Milieu BN (Institut PASTEUR D'ALGER)

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

Sels biliaires (Institut PASTEUR D'ALGER)

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 urée-sulfate de magnésium pH=7

Tampon PBS pH=7.5

Xylène

Cristal Violet

**I.3. Appareillage**

pH mètre (Hanna)

Etuve (Mettler)

Four pasteur (Controls)

Spectrophotomètre (UV Shimadzu)

Centrifugeuse (Hettich)

Vortex (Minishaker IKA).

Plaque chauffante agitatrice (Bunsen)  
Balance (Denver)  
Compteur de colonies (Funke Gerber)  
Bain marie (Gerhardt Bonn)  
Balance analytique (Kern ALS 220.4N)  
Microscope optique de précision (Paralux)  
Autoclave (Slli AVX electronic)

## II. Méthodes

### II.1. Revivification de la souche bactérienne

La souche de *Lb. curvatus* G6 a été cultivée sur le bouillon MRS et incubée à 37°C pendant 24h. Le développement de bactérie se traduit par un trouble et une pastille blanche au fond de tube. La pureté de la souche a été vérifiée sur gélose MRS, les boîtes de Pétri contenant la gélose MRS préalablement coulées et solidifiées sont ensemencées par stries, l'incubation a été faite à 37°C pendant 24h, la souche est dite pure si on obtient des colonies homogènes de même forme, même taille et de même couleur, pour confirmer la pureté on réalise une coloration de Gram.

### II.2. Microencapsulation de la souche probiotique dans un gel d'alginate de sodium à 2%

#### Préparation de la souche

La souche de *Lb. curvatus* G6 a été cultivée dans le bouillon MRS à 37°C pendant 20h, ensuite les cellules sont recueillies par centrifugation (4000 g pendant 3 minutes). Le culot a été lavé une fois avec de l'eau physiologique et suspendu dans 5 ml de l'eau physiologique.

#### Méthode d'encapsulation

L'encapsulation a été réalisée selon la méthode de **Boyaval et al. (1985)** avec quelques modifications. 5 mL de la suspension bactérienne ont été mélangés avec 45 mL d'une solution d'alginate de sodium à 2% préalablement stérilisée à l'autoclave (120 °C, 20 min), ce qui a permis d'obtenir un inoculum bactérien. Ce dernier a été introduit dans une seringue stérile. La pression manuelle exercée sur le piston de la seringue, a permis de laisser tomber goutte à goutte le contenu de la seringue dans une solution stérile et refroidie de CaCl<sub>2</sub> (0.05 M) supplémenté avec 0.1% (v/v) de Tween 80.

Après un temps de contact de 30 min, les gouttes gélifiées obtenues ont été séparées de la solution de CaCl<sub>2</sub>. Un contrôle visuel des billes a permis d'effectuer un tri, afin de rejeter certains défauts de fabrication, notamment des défauts de forme (billes creuses, billes avec extrémité très effilée). Les billes retenues ont été des billes pleines, ressemblant plus ou moins à une sphère. Les billes étaient alors lavées deux fois avec l'eau distillée stérile afin d'éliminer l'excès de calcium. 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. Evaluation des aptitudes probiotiques de la souche *Lb. curvatus* G6 *in vitro*

#### II. 3.1. 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 bouillon MRS (pH 2.0) a été inoculé par 8.10<sup>12</sup> UFC/mL de cellules encapsulées et 10<sup>12</sup> UFC/mL de cellules libres de *Lb. curvatus* G6, puis incubé 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. Le protocole de dénombrement a consisté à réaliser des dilutions en séries dans de l'eau physiologique (9 mL, 9 g/L) de chacun des prélèvements de 1 mL. Ensuite, un volume de 0,03 mL de la dilution appropriée a été étalé sur des boîtes de gélose MRS. Ces dernières ont été incubées à 37°C pendant 48h. Ainsi le taux de survie a été estimé par la comparaison entre le nombre initial des cellules viable et celles dénombrées à 1h et 2h. Le taux de survie des cellules libres et encapsulées est estimé en calculant le log UFC/mL.

### II.3.2. Tolérance aux sels biliaires

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 biliaires à pH 5.8, est inoculé par  $8.10^{12}$  UFC/ml de cellules encapsulées et  $10^{12}$  UFC/ml de cellules libres de *Lb. curvatus* G6, puis incubé à 37°C pendant 8h. Des échantillons sont recueillis à 0h, 4h et 8h et des séries de dilutions décimales, ont été réalisées. Ensuite, un volume de 0,03 mL de la dilution appropriée a été étalé sur des boîtes de gélose MRS. Ces dernières ont été incubées 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. La tolérance à la bile de chaque souche est déterminée par la comparaison du nombre d'UFC après 4h et 8h avec le nombre initial à 0h.

### II.3.3. Tolérance aux enzymes pancréatiques par la simulation des conditions intestinales

La simulation d'un modèle expérimental de tractus intestinal a été réalisée selon la méthode de **Woraharn et al. (2010)**. Dans ce modèle ; la solution de 9g/L de NaCl, 10 g/L de pancréatine, 10 g/L de trypsine et 3 g/L de sels biliaires, avec un pH de 6.5 a été choisi comme liquide intestinal artificiel. 1 mL des cellules libres et un nombre approprié de capsules a été incubé à 37°C dans bouillon MRS contenant cette solution pendant 3h. Trois échantillons sont recueillis à 0h, 1.5h et 3h et des séries de dilutions décimales, ont été réalisées. La séquestration des cellules, le dénombrement et le calcul du taux de survie ont été réalisés comme déjà décrit précédemment.

## II.4. Evaluation des aptitudes technologiques de la souche *Lb. curvatus* G6 *in vitro*

### II.4.1. Tolérance à différentes températures

La tolérance de *Lb. curvatus* G6 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 25°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 a 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.3.1**.

### II.4.2. Résistance à la conservation au froid

La viabilité de *Lb. curvatus* G6 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  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ . 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  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 48h, les colonies ont été dénombrées pour mesurer le taux de survie.

### II.5. Tests complémentaires pour la confirmation des aptitudes probiotiques

#### II.5.1 Test d'adhésion aux cellules épithéliales

Ce test consiste à étudier la capacité des bactéries à effet probiotiques de s'adhérer à l'épithélium intestinal et le colon. Pour se faire, la méthode décrite par **Lin et al. (2007)** qui comporte trois étapes, a été impliquée :

**Préparation des cellules épithéliales :** Avant de mettre en œuvre le test d'adhésion, un segment de l'iléon d'un poulet a été ouvert et laver avec du tampon phosphate salin stérile (PBS pH 7.2), puis tenu dans le PBS à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 30 min pour être laver. Par la suite, les tissus ont été repris, laver 10 fois avec du PBS stérile puis laisser au repos à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 3 h. Les cellules ont été récupérées en grattant la surface tapissant l'intestin par une lame stérile. Des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à  $10^{-4}$ , cette suspension cellulaire a été examiné par microscope pour assurer n'était pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales est approximativement  $5 \times 10^4$  cellules/mL.

**Préparation de culture bactérienne:** une culture bactérienne d'une nuit après cultivation sur bouillon MRS et centrifugation à 6000 tours / 10 min, le culot a été récupéré dans 2 ml du PBS, des dilutions décimales (V/9V) jusqu'à ( $10^{-8}$ ) ont été préparées. A partir de cette dernière, on a réalisé une coloration simple avec du violet de gentiane suivis d'une observation microscopique (Gx100) pour que le nombre soit approximativement de  $10^8$  cellules/mL.

**Réalisation du test :** 1 mL de la suspension cellulaire est mélangé avec 1 mL de la dilution  $10^{-4}$  de la suspension des cellules épithéliales. Après incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 40 min, une préparation de frottis et une coloration au cristal violet 0.5% pendant 5 min a été réalisée pour observer l'adhésion au microscope optique. Le test est considéré comme positif si le nombre de bactéries adhérees est supérieur à 15.

#### II.5.2. Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité a été déterminée selon la méthode décrite par **Iyer et al. (2009)**. Le culot bactérien d'une culture jeune a été récupéré par centrifugation à froid à 12000g/15 min suivie de 2 lavages successifs par le tampon urée-sulfate de magnésium, puis resuspendus dans 1.2 mL de même tampon. La densité optique initiale de la suspension, lue à 450nm ( $\text{DO}_{450i}$ ) a été ajustée approximativement à 1. Ensuite 0.6mL du xylène a été ajouté doucement à 3mL de la suspension bactérienne puis incubée à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min, ce mélange a été agité par vortex pendant 2 min.

Après 15min, la phase aqueuse est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur et on procède à la mesure de la densité optique finale dans la même longueur d'onde ( $\text{DO}_{450f}$ ).

La différence de la densité optique est considérée comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire ; le pourcentage de l'hydrophobicité est calculé par l'équation suivante :



$$\text{Hydrophobicité}\% = \frac{(\text{DO450i} - \text{DO450f}) \times 100}{\text{DO450i}}$$

### II.5.3. Test d'autoagrégation et coagrégation

#### L'autoagrégation

L'autoagrégation de *Lb. curvatus* G6 a été déterminée selon la méthode de **Todorov et al. (2009)**. Le culot bactérien d'une culture de 24h à 37°C a été récupéré par centrifugation à (7000 g, 10 min, 20°C), lavé et resuspendus dans l'eau physiologique stérile (0.85% NaCl), la densité optique initiale à 660 nm (DO<sub>0</sub>) de la suspension bactérienne a été ajustée à 0,3.

Après 60 minutes d'incubation à 37°C ; la suspension cellulaire a été centrifugée à (300g, 2 min, 20 °C), et la densité optique de surnageant (DO<sub>60</sub>) est mesurée dans la même longueur d'onde. L'expérience a été exécutée en double. L'autoagrégation a été déterminée par l'équation suivante :

$$\text{Autoagrégation}\% = \frac{(\text{DO0} - \text{DO60}) \times 100}{\text{DO0}}$$

#### La coagrégation

La coagrégation de *Lb. curvatus* G6 avec les souches suivantes : *Lb. plantarum* F12, *Lb. casei ssp tolerans* G4, *Lb. plantarum*, MRSA, *Listeria monocytogenes*, a été déterminée d'une manière similaire que l'autoagrégation selon **Todorov et al. (2009)** ; le culot bactérien des cultures jeunes des souches a été récupéré par centrifugation à 7000g pendant 10 min à 20°C, les culots sont lavés puis resuspendus dans l'eau physiologique stérile (0.85% NaCl), La densité optique initiale à 660 nm (DO<sub>i</sub>) des suspensions bactériennes a été ajustée à 0,3, un volume de 500 µL de la souche de *Lb. curvatus* G6 a été mélangé avec un volume égale de chaque souche, les suspensions sont ensuite incubées à 37°C pendant 60 min.

Après incubation, les suspensions cellulaires ont été centrifugées à (300g, 2min, 20°C), et la densité optique des surnageant (DO<sub>f</sub>) a été mesurée dans la même longueur d'onde et la coagrégation avec chaque souche a été déterminée par l'équation suivante :

$$\text{Coagrégation}\% = \frac{(\text{DOi} - \text{DOf}) \times 100}{\text{DOi}}$$



# Résultats et Discussion

### III. RESULTATS ET DISCUSSION

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

La microencapsulation de *Lb. curvatus* G6 a été réalisée en utilisant l'alginate de sodium à 2%, les billes préparées par la technique d'extrusion ont une forme sphérique de 3 mm de diamètre, le nombre de cellules microencapsulées par bille a été déterminé après lyse des billes et dénombrement des cellules viables sur gélose MRS, la moyenne du nombre de cellules est égale à  $15 \times 10^{11}$  UFC/bille. La Figure 3 représente l'aspect des billes d'alginate à 2%.

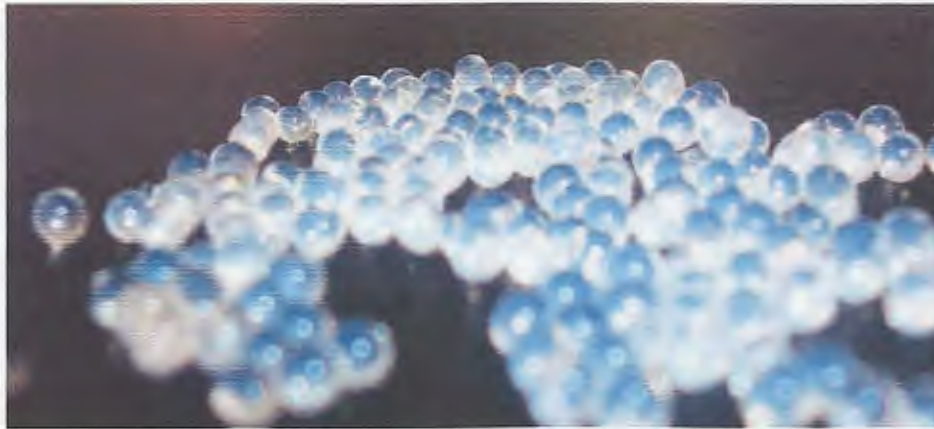


Figure 3: L'aspect des billes d'alginate de sodium à 2%.

#### III.2. Evaluation des aptitudes probiotiques de *Lb. curvatus* G6 *in vitro*

##### III.2.1. Test de la tolérance de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé aux conditions acides

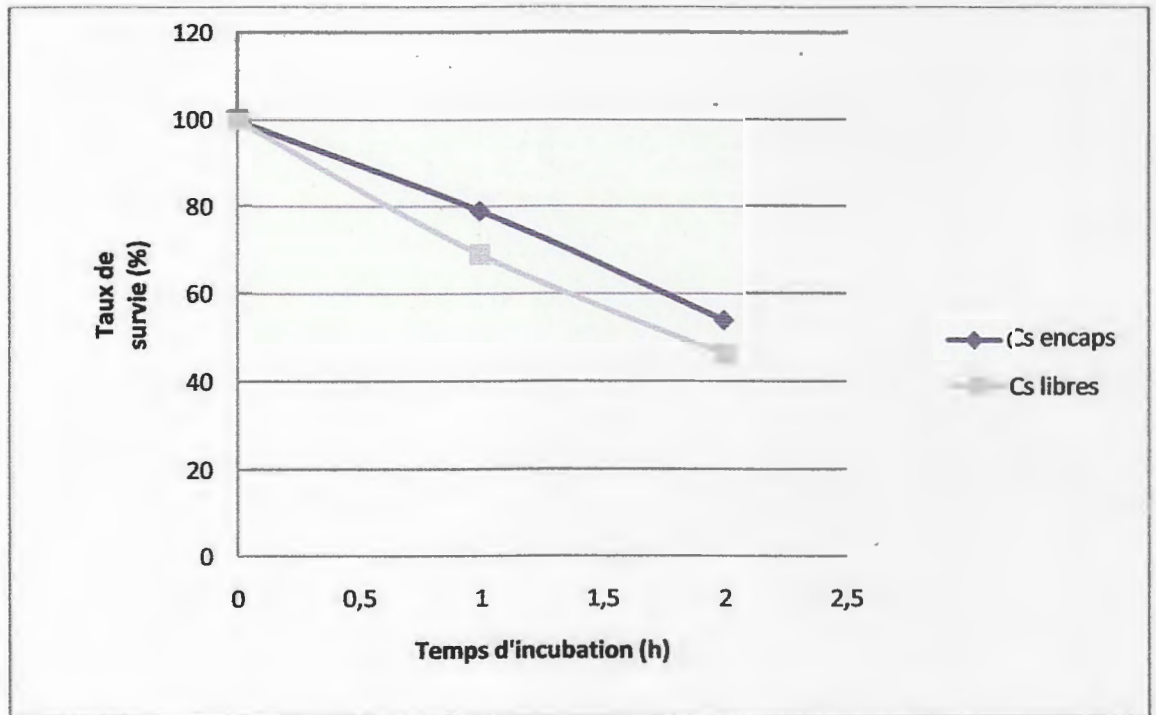
La capacité de survivre à un pH acide comme celui rencontré dans l'estomac, est l'un des caractères principaux des souches potentiellement probiotiques (Todorov *et al.*, 2011). Chaque jour l'estomac humain secrète environ 3L de jus gastrique avec un pH aussi faible que 1.5 et la période de passage du bol alimentaire à travers l'estomac est estimée à environ 90 min où le stress pour les microorganismes commence. 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 le but de comparer la tolérance des cellules libres et encapsulées de la souche *Lb. curvatus* G6 aux conditions acides similaires à ceux de l'estomac, environ  $11 \times 10^{12}$  UFC/mL des cellules libres et  $45 \times 10^{13}$  UFC/mL des cellules encapsulées dans l'alginate de sodium à 2% de cette souche ont été incubées à un pH 2,0 pendant 2h. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 4.

Après 1h d'incubation, une perte significative des cellules de *Lb. curvatus* G6 à l'état libre a été observée et leur concentration atteint  $10^9$  UFC/mL qui se présente le taux de survie 69%, cette concentration diminue également et atteint environ  $10^6$  UFC/mL présentant ainsi le taux de survie 46% après 2h d'incubation aux conditions acides. Dans les mêmes conditions le nombre des cellules encapsulées de *Lb. curvatus* G6 a diminué également et atteint  $36 \times 10^{10}$  UFC/mL qui se traduit par le taux 79% après 1h d'incubation, la diminution se continue et le nombre des cellules atteint  $83 \times 10^6$  UFC/mL avec un taux de survie de 54% après 2h d'incubation.



D'après ces résultats, il apparaît que la microencapsulation des souches avec l'alginate de sodium à 2% a amélioré la viabilité de la souche *Lb. curvatus* G6 contre les conditions acides (pH=2) similaires aux conditions de l'estomac par l'augmentation du taux de survie avec 8%.



	Temps (h)		
Taux de survie (%)	0	1	2
taux de survie des cellules encapsulées	100	79	54
Taux de survie des cellules libres	100	69	46

**Figure 4 :** Effet de l'acidité (pH 2.0) sur la survie de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%. Cs encaps=cellules encapsulées, Cs libres= cellules libres, cellules encapsulées dans l'alginate de sodium à 2%=noire, cellules libres=grise.

Nos résultats sont similaires aux résultats observés par plusieurs auteurs qui ont testé la viabilité des bactéries probiotiques dans des conditions acides de l'estomac, parmi lesquels citons l'étude réalisée par **Ouled-Haddar et al. (2012)** sur *Lb. curvatus* G7 libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 1% avec une augmentation de 9% dans le taux de survie. De la même manière **Todorov et al. (2011)** ont rapporté les taux de survie suivants 85,71% et 40,47% sur les cellules encapsulées et libres de *Lb. plantarum* ST16Pa, respectivement ; cette étude a été réalisée à pH 1.6 pendant 3h. En plus des résultats obtenus par **Sabikhi et al. (2008)** qui ont encapsulé une souche de *Lb. acidophilus* LA1 dans l'alginate de sodium, ainsi les taux de survie avoisinaient 57,76%, 85,12% pour les cellules libres et encapsulés, respectivement ; donc le taux d'augmentation est de 27,36%, ces résultats sont obtenus lorsque les cellules sont exposées pendant 2h à pH 2.0. Une autre étude réalisée par **Sridar et al. (2003)** indique que l'encapsulation par l'alginate de sodium à 2% augmente la survie de *Lb. acidophilus* par 15,9% et de *Bifidobacterium* sp. par 16,7% par rapport aux cellules libres.

Les résultats de **Kneifel et al. (1993)** et **Lourens-Hattingh et Viljoen (2001)** indiquent que la microencapsulation a été utilisée d'une manière satisfaisante pour augmenter la survie des microorganismes probiotiques dans les produits fermentés à haute acidité tel que le yaourt.

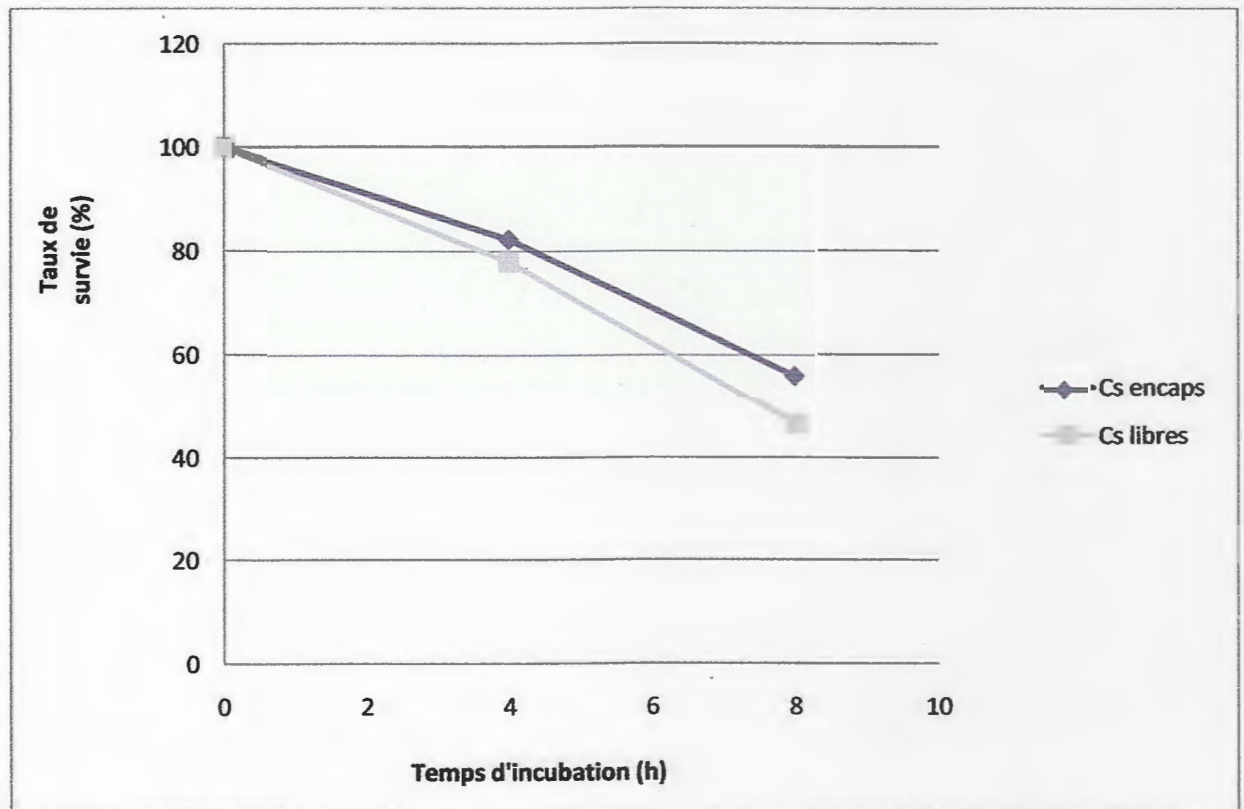
### **III.2.2. Test de la tolérance de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé aux sels biliaries**

Les sels biliaries sont l'une des barrières à franchir par les bactéries probiotiques pour gagner leur site d'action, pour cette raison la tolérance de la souche *Lb. curvatus* G6 à l'état libre et encapsulée aux sels biliaries à pH 5,8 a été évaluée et les résultats sont illustrés dans la **Figure 5**.

D'après ces résultats, une réduction significative dans la concentration des cellules à l'état libre (de  $8 \times 10^{12}$  UFC/mL à  $11 \times 10^9$  UFC/mL) a été remarquée après incubation pendant 4h dans les sels biliaries et le taux de survie marqué est de 78%, cette réduction a été continuée après 8h d'incubation, le nombre des cellules atteint  $10^6$  UFC/mL présentant ainsi le taux de survie 46,5%. En ce qui concerne les celles encapsulées, le nombre de départ est de  $42 \times 10^{13}$  UFC/mL, ce dernier a diminué après 4h d'exposition aux sels biliaries pour atteindre  $11 \times 10^{11}$  UFC/mL, après 8h d'incubation la diminution est encor observée et le nombre de cellules atteint  $15 \times 10^7$  UFC/mL, ainsi les taux de survie marqués sont de 100% à 82,34% jusqu'à 56%.

A l'issu de cette expérience, on peut dire que la ME a fournis à une protection efficace des cellules de *Lb. curvatus* G6 en présence de sels biliaries (0,3%), qui se traduit par un taux d'amélioration de l'ordre de 9,5%.





Temps (h)	0	4	8
Taux de survie (%)			
taux de survie des cellules encapsulées	100	82.34	56
Taux de survie des cellules libres	100	78	46.5

**Figure 5:** Survie de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé dans l’alginate de sodium incubé à 0.3% de sels biliaries. Cs encaps=cellules encapsulées, Cs libres=cellules libres, cellules encapsulées dans l’alginate de sodium à 2%=noire, cellules libres=grise.

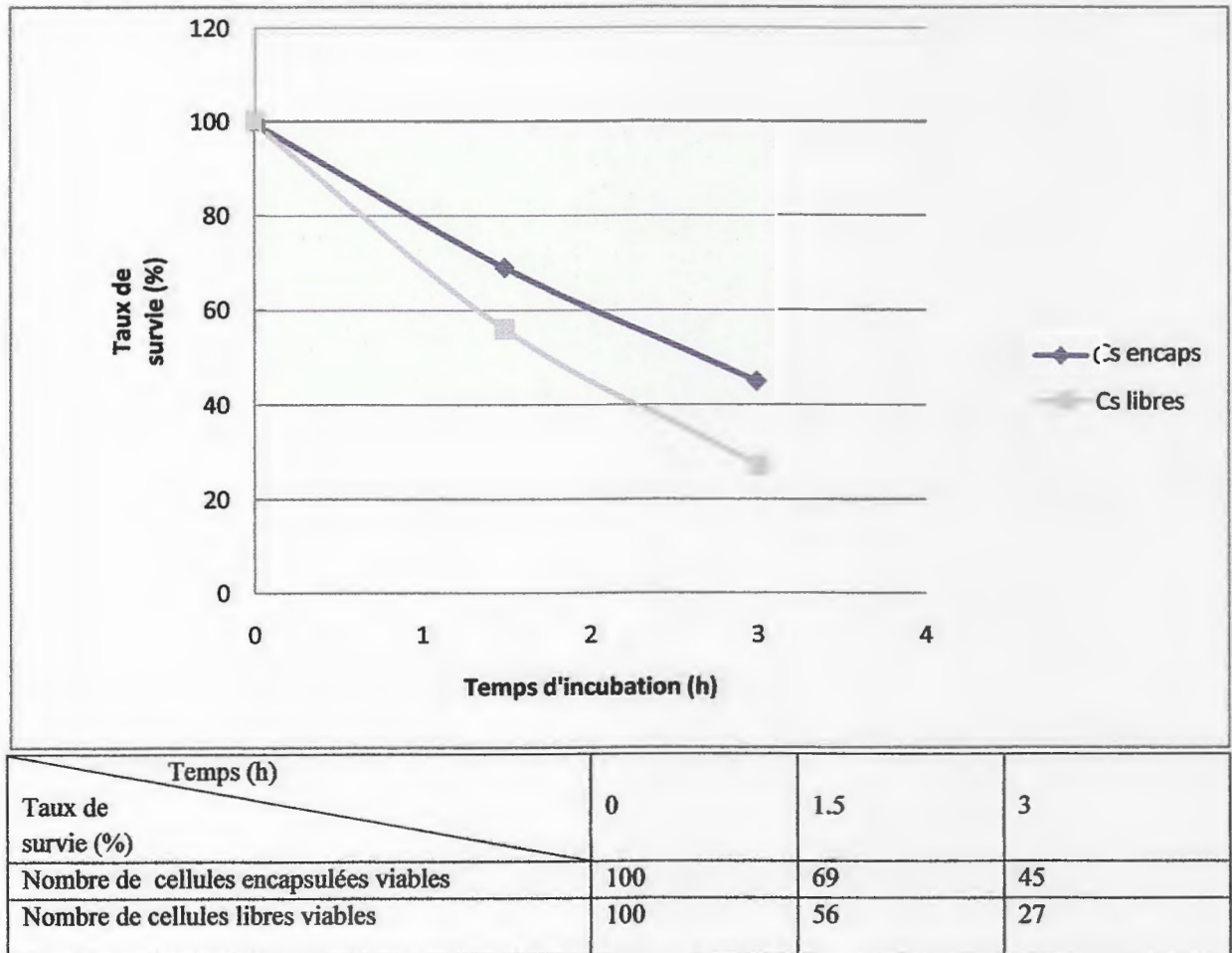
Nos résultats sont proches de ceux obtenus par **Ding et Shah (2009)**, où les bactéries probiotiques appartenant aux genres *Lb. plantarum* et *Bifidobacterium lactis* type *Bi-07* présentaient une faible tolérance aux sels biliaries (taux de survie est égal à 39%). Cependant après encapsulation dans l’alginate de sodium à 3% et incubation dans les mêmes conditions, leur survie a été augmentée environ 2 fois. Dans une autre étude **Chandramouli et al. (2004)** ont rapportés que l’encapsulation de *Lb. acidophilus* dans l’alginate de sodium à 2% a augmenté considérablement la viabilité dans 1% de sels biliaries.

Dans le sens contraire, **Trindade et Grosso (2000)**, ont rapporté que l’encapsulation de *Lb. acidophilus* et *Bifidobacterium bifidum* dans l’alginate de sodium n’était pas efficace pour protéger les cellules incubées à 2% et 4% de sels biliaries.

### III.2.3. Test de la tolérance de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé aux enzymes pancréatiques par simulation du fluide intestinal

Les enzymes pancréatiques modifient les conditions du fluide intestinal, de ce fait une étude de la viabilité de *Lb. curvatus* G6 à l’état libre et encapsulé en présence des enzymes pancréatiques a été réalisée. La **Figure 6** illustre les résultats de cette expérience.

Pour les cellules à l'état libre, l'expérience a été débutée par le nombre  $13 \times 10^{11}$  UFC/mL, qui a diminué considérablement après 1,5h d'incubation en présence des enzymes pancréatiques pour atteindre  $7 \times 10^6$  UFC/mL qui se traduit par le taux 56%, la diminution se poursuit après 3h d'incubation, le nombre de cellules atteint  $2 \times 10^3$  UFC/mL présentant ainsi le taux de survie 27%. Alors que pour les cellules encapsulées, le nombre initial est égal à  $20 \times 10^{12}$  UFC/mL, ce dernier a été diminué après 1,5 h d'incubation dans les mêmes conditions et atteindre  $20 \times 10^8$  UFC/mL présentant le taux 69%, après 3h d'incubation le nombre diminue également et atteindre  $11 \times 10^5$  UFC/mL, qui se traduit par le taux 45%.



**Figure 6:** Effet de la pancréatine sur la survie de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%. Cs encaps=cellules encapsulées, Cs libres=cellules libres, cellules encapsulées dans l'alginate de sodium à 2%=noire, cellules libres=grise.

Ces résultats nous montrent qu'il y avait une meilleure protection des cellules de *Lb. curvatus* G6 vis-à-vis les conditions défavorables simulant le fluide intestinal marquant ainsi le taux d'amélioration 18%.

Après comparaison de l'effet des sels biliaries seuls à celui du fluide intestinal simulé (SIF) sur la viabilité des cellules encapsulées, il apparait que le taux de survie marqué après seulement 3h d'exposition au SIF est inférieur à celui marqué après 8h d'exposition aux sels biliaries. Ce

qui montre que le suc pancréatique a un effet négatif sur la survie de *Lb. curvatus* G6 dans le transit intestinal.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par **Woraharn *et al.* (2010)** qui ont étudié la survie de la souche *Lb. plantarum* CMU-FP002 dans les mêmes conditions qu'on a utilisé et ils ont obtenu un taux de survie avoisinant 60% pour les billes d'alginate à 2%. De la même manière, **Gbassi (2010)** a rapporté les taux de survie suivants 46%, 49,01% et 47,52% des trois souches encapsulées dans l'alginate de sodium *Lb. plantarum* 800, *Lb. plantarum* CIPA 159 et *Lb. plantarum* 299v, respectivement ; ces dernières sont incubées en présence de 10g/L de pancréatine, 3g/L de sels biliaires à pH 6.

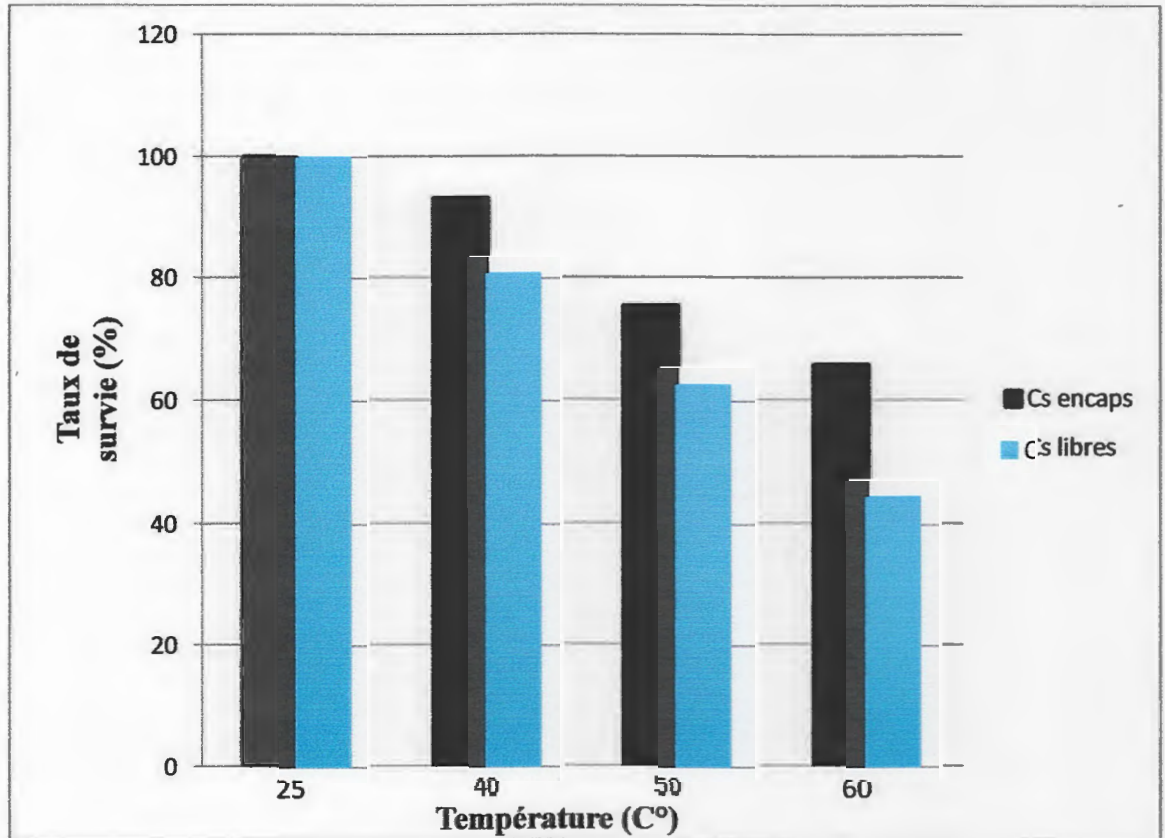
### III.3. Evaluation des aptitudes technologiques de *Lb. curvatus* G6 *in vitro*

#### III.3.1. Test de la thermorésistance de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé

La pasteurisation est l'un des traitements thermiques applicables à différents produits alimentaires dans le but d'éliminer les microorganismes nuisibles et pathogènes responsables de la détérioration de produit afin de prolonger sa durée de vie et sa qualité sanitaire. Il est donc important de protéger les organismes bénéfiques contre les traitements thermiques, pour cette raison on fait appel à la microencapsulation. Cette expérience a tenté de simuler un traitement thermique léger dans lequel la survie de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé a été évaluée.

Les résultats du test de la thermorésistance de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé aux différentes températures sont illustrés dans la **Figure 7**. Au départ, le même nombre de cellules libres et encapsulées et qui est avoisiné de  $62 \times 10^{11}$  UFC/mL a été utilisé. Concernant les cellules de *Lb. curvatus* G6 à l'état libre, une réduction significative dans la viabilité en fonction de l'augmentation de la température a été remarquée :  $21 \times 10^9$  UFC/mL à 40°C,  $10^8$  UFC/mL à 50°C et  $5 \times 10^5$  UFC/mL à 60°C, présentant les taux de survie : 80,78%, 62,60% et 44,59%, respectivement. Tandis que, les cellules encapsulées résistent mieux, présentant ainsi les taux : 93,13% ( $82 \times 10^{10}$  UFC/mL), 75,38% ( $44 \times 10^8$  UFC/mL), et 65,78% ( $26 \times 10^7$  UFC/mL), après exposition à 40°C, 50°C et 60°C respectivement.





Température (°C)	25	40	50	60
Taux de survie (%)				
Nombre de cellules encapsulées viables	100	93.13	75.38	65.78
Nombre de cellules libres viables	100	80.78	62.60	44.59

**Figure7 :** Effet température sur la survie de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé dans l'alginate de sodium 2%. Cs encaps= cellules encapsulées, Cs libres=cellules libres, cellules encapsulées dans l'alginate de sodium à 2%=noire, cellules libre=bleue.

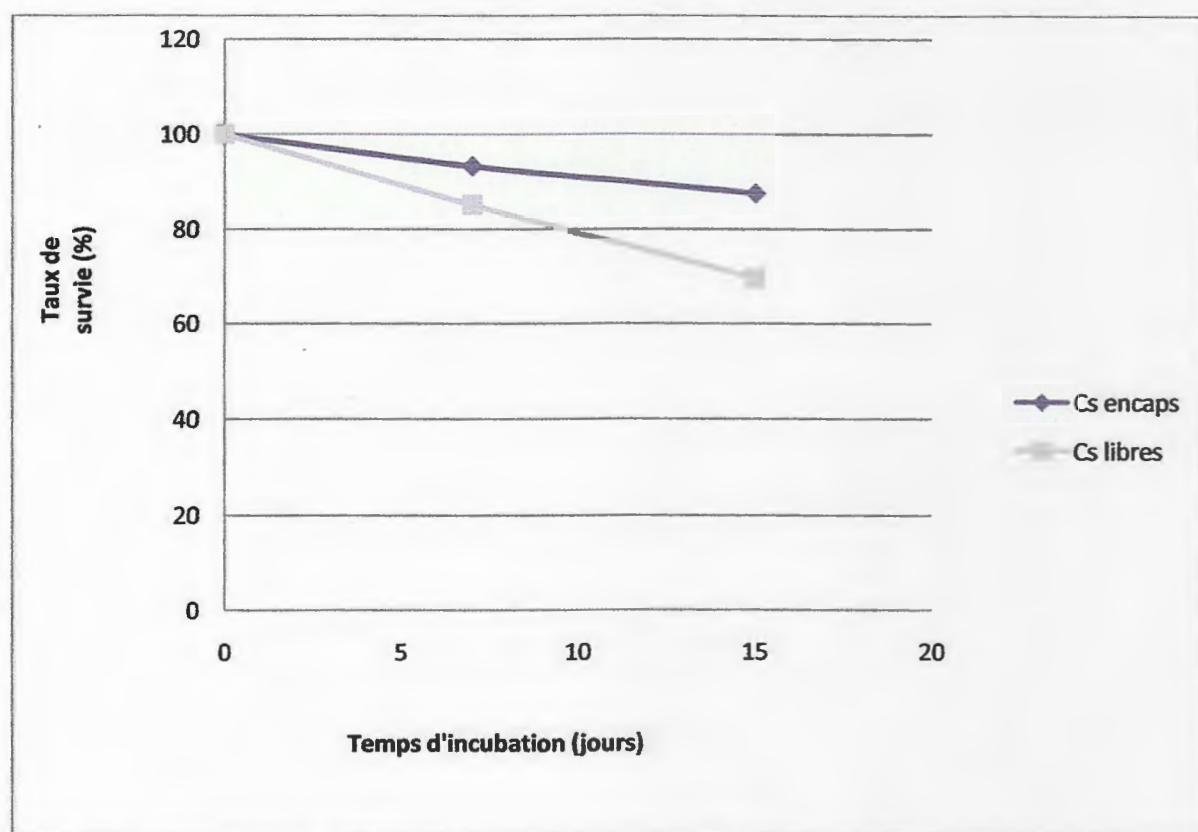
D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué qu'il y avait une protection importante des cellules de *Lb. curvatus* G6, marquant ainsi les taux d'augmentation 12,35%, 12,78% et 21.19% à 40°C, à 50°C et 60°C, respectivement.

Nos résultats sont proches de ceux observés par plusieurs chercheurs, parmi lesquels on cite **Mandal et al. (2006)** qui ont été rapportés le taux de survie 70% après exposition de la souche *Lb.casei* NCDC-296 encapsulée dans l'alginate de sodium à 2% à 65°C, et **Kim et al. (2008)** qui ont marqué les taux de survies 77% et 90% de *Lb. acidophilus* ATCC 43121 libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%, respectivement, après exposition pendant 30 min à 65°C. De la même manière, **Sabikhi et al. (2008)**, ont testé la viabilité de *Lb. acidophilus* LA1 à différentes températures, ils ont marqué les taux de survie 9.2% et 84% pour les cellules libres et encapsulés, respectivement après incubation pendant 30 s à 72°C. Dans un autre papier de recherche **Teoh et al. (2011)** qui ont étudié la viabilité des souches *Lb. acidophilus* LA-5 et *Bifidobacterium pseudocatemilatum* G4 libres et encapsulées dans l'alginate à 4% en combinaison avec 2% d'amidon, les taux de survie de *Lb. acidophilus* LA-5 libre et encapsulé

sont 42,96% et 78,10%, respectivement, ainsi les taux de survie de *Bifidobacterium pseudocatemulatum* G4 libre et encapsulé sont 42,90% et 90,72%, respectivement. Ding et Shah (2007) ont aussi montré que la ME protège efficacement les souches probiotiques contre les traitements thermiques (65°C).

**III.3.2. Test de la conservation à 4°C de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé**

La température est un facteur critique qui influe la viabilité des microorganismes probiotiques pendant la période de stockage. De ce fait un test de conservation à 4°C de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé a été effectué afin d'évaluer l'efficacité de l'encapsulation dans la protection de cette souche dans la période de réfrigération et les résultats obtenus sont portés dans la Figure 8.



**Figure 8:** Effet de la conservation à 4°C sur la survie de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé dans l'alginate de sodium à 2%. Cs encaps=cellules encapsulées, Cs libres=cellules libres, cellules encapsulées dans l'alginate de sodium à 2%=noire, cellules libres=grise.

Une réduction remarquable dans le taux de survie des cellules libres a été montrée (85,12% sont viables après une semaine et 69,44% seulement sont viables après deux semaines).



Cependant les cellules encapsulées, préservent leur viabilité, présentant les taux de survie de 93,28% et 87,51% après une et deux semaines, respectivement.

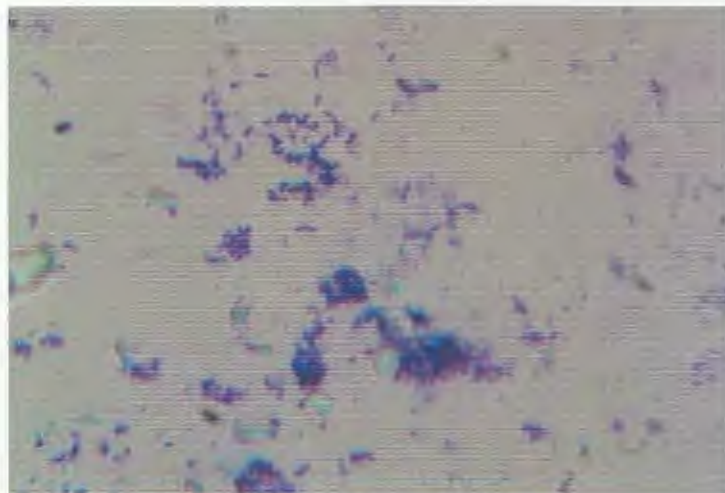
D'après les résultats, on peut dire que la ME protège efficacement les cellules de *Lb. curvatus* G6 vis-à-vis des conditions de réfrigération, présentant ainsi le taux d'amélioration de l'ordre de 18,07%.

Nos résultats s'avèrent en parfaite concordance avec ceux obtenus par plusieurs chercheurs parmi lesquels on cite **Moayednia et al. (2010)** qui ont étudié l'effet de la réfrigération sur deux souches *Lb. acidophilus* et *Bifidobacterium lactis* encapsulées dans l'alginate de sodium à 2%, lorsqu'ils ont stockés la souche de *Lb. acidophilus* à 5°C pendant 8 jours, ils ont marqués un taux de survie de 95,48%, contrairement pour *Bifidobacterium lactis* le taux de survie était égal à 34,39%, ce qui signifie que la ME n'a pas été efficace pour protéger cette souche contre ces conditions. Dans une autre étude, **Woraharn et al. (2010)** ont testé la souche *Lb. plantarum* CMUF-002 à 4°C, portant ainsi des taux de survie de 96,10% et 75% après 2 et 8 semaines respectivement. **Akhiar (2010)** a aussi testé la viabilité de *Lb. acidophilus* DD910 libre et encapsulé à 4°C pendant 7 semaines, et les taux de survie enregistrés étaient 46,66% et 73,33% pour les cellules libres et encapsulées, respectivement.

### III.4. Tests complémentaires pour la confirmation des aptitudes probiotiques

#### III.4.1. Test d'adhésion aux cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et le rôle de l'hydrophobicité de surface

La capacité à adhérer aux cellules épithéliales de la muqueuse intestinale est un des critères les plus importants pour sélectionner les souches potentiellement probiotiques. Pour mettre en évidence la capacité de *Lb. curvatus* G6 à adhérer aux cellules de la lumière intestinale, le test d'adhésion sur les cellules épithéliales de l'iléon du tube digestif du poulet a été effectuée. D'après la **Figure 9** qui représente l'aspect microscopique des cellules épithéliales du tube digestif en présence de *Lb. curvatus* G6, il apparait que la souche présente une excellente adhésion aux cellules épithéliales de l'iléon de poulet, caractérisée par un nombre assez important de cellules de *Lb. curvatus* G6 fixées sur les cellules épithéliales.



**Figure 9** : Photomicrographie d'adhésion de la souche *Lb. curvatus* G6 aux cellules épithéliales.

D'après Denis *et al.* (2006), l'une des propriétés désirables des bactéries probiotiques est l'adhésion aux cellules épithéliales, cette colonisation est nécessaire pour exercer leurs effets bénéfiques par l'inhibition des bactéries pathogènes et la stimulation du système immunitaire. L'adhésion des lactobacilles aux cellules épithéliales de l'hôte est étroitement liée à la présence de certaines molécules spécifiques (récepteurs) sur les cellules épithéliales. 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 mettre en évidence la présence des interactions de type hydrophobes, le test d'hydrophobicité a été réalisé en utilisant le xylène comme hydrocarbure. Les résultats de ce test sont portés dans le **Tableau 6**

**Tableau 6:** Résultats du test d'hydrophobicité.

DO	DO <sub>i</sub>	DO <sub>f</sub>
La souche		
<i>Lb. curvatus</i> G6	0.91	0.87

D'après les données portées dans le **Tableau 6**, le pourcentage de l'hydrophobicité montré par la souche *Lb. curvatus* G6 est comme suit :

$$H\% \text{ } Lb. \text{ curvatus } G6 = 4,4\%$$

D'après les résultats, une faible hydrophobicité (4,4%) de la souche *Lb. curvatus* G6 pour le xylène a été constatée. Ce résultat est similaire à ce rapporté par Todorov *et al.* (2009) qui ont évalué l'hydrophobicité d'*Enterococcus mundtii* en utilisant le *n*-hexadecane comme hydrocarbure, présentant ainsi le pourcentage de 5,57%.

A l'issue de ces deux test, l'adhésion de *Lb. curvatus* G6 aux cellules épithéliales n'est pas attribuée aux interactions hydrophobes, qui est l'une des propriétés qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules intestinales de l'hôte. Cette interaction initiale non spécifique précède le mécanisme d'adhésion qui sert d'intermédiaire pour des mécanismes plus spécifiques (Todorov *et al.*, 2009).

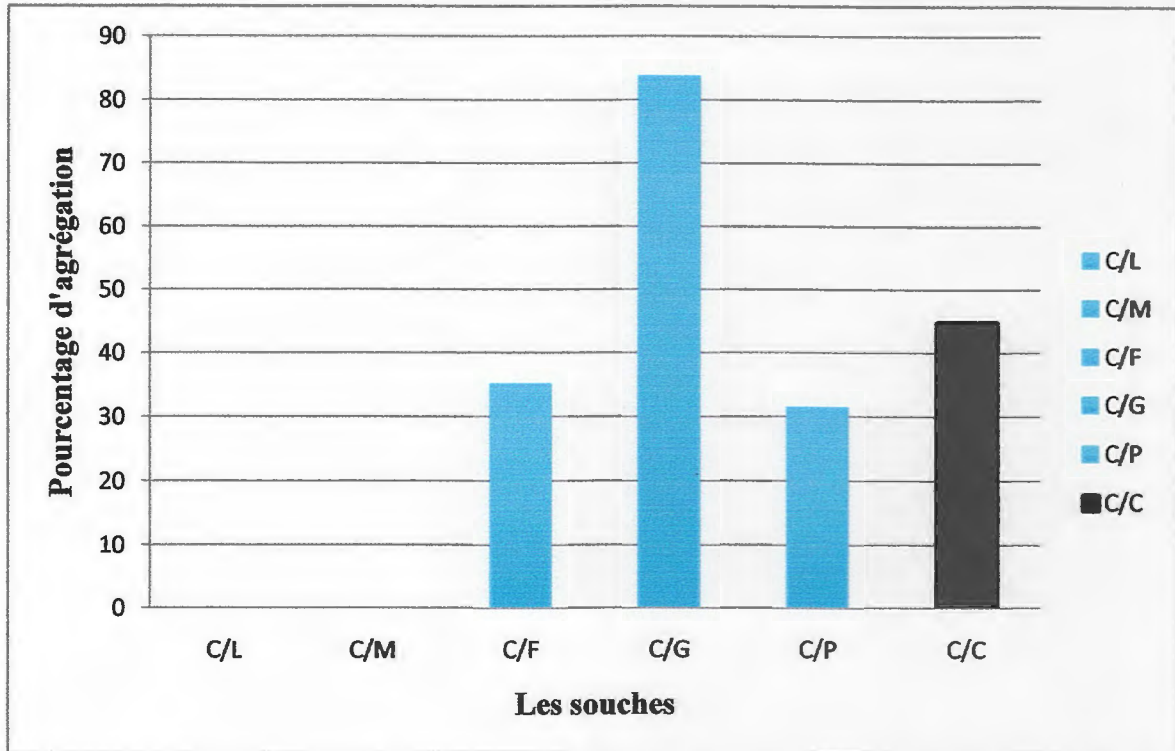
Todorov *et al.* (2009) ont montré que l'hydrophobicité peut aider les cellules à adhérer aux cellules épithéliales, mais n'est pas une condition préalable pour la colonisation. De ce fait, l'adhésion de *Lb. curvatus* G6 implique d'autres types d'interactions faisant appel à d'autres facteurs tels que les protéines de surface, les adhésines ou les pilis, ceux-ci nécessitent une recherche plus approfondie pour déterminer le moyen par le quel s'effectue l'adhésion.

#### III.4.2. Test d'agrégation : autoagrégation et coagrégation

L'agrégation des bactéries entre eux est un mécanisme à l'origine de la formation de biofilms. Elle est l'un des mécanismes d'inhibition des microorganismes pathogènes, pour cela on peut le considérer comme un critère de sélection des souches potentiellement probiotiques. Pour mettre en évidence la capacité des cellules de *Lb. curvatus* G6 à s'autoagréger entre elles et de coagréger avec les microorganismes cités dans le **Tableau 5 section I.1** un test d'agrégation a été réalisé. Les résultats sont illustrés dans la **Figure 10**. La valeur d'autoagrégation a été égale à



44,82%. Différentes valeurs de coagrégation ont été obtenues, 0%, 0%, 35%, 83,63% et 31,33% avec les souches *Listeria monocytogenes*, Methycilin resistant *Staphyococcus aureus* (MRSA), *Lb. plantarum* F12, *Lb. casei ssp tolerans* G4 et *Lb. plantarum* respectivement.



**Figure10** : le pourcentage de l'autoagrégation et la coagrégation de *Lb. curvatus* G6 avec les différentes souches. L'autoagrégation=noire, la coagrégation=bleue, C= *Lb. curvatus* G6, L= *Listeria monocytogenes*, M= Methycilin resistant *Staphyococcus aureus*, F= *Lb. plantarum* F12, G= *Lb. casei ssp tolerans* G4, P= *Lb. plantarum* .

D'après **Todorov et al. (2009)**, l'autoagrégation de la souche *Enterococcus mundtii* ST4V a été égale à 41,34%. En ce qui concerne la coagrégation, différentes valeurs ont été rapportées, 40%, 30%, 30% et 50% pour les souches *Lb. plantarum* AMA-K, *Lb. plantarum* ST8KF, *Listeria innocua* LMG 13568 et *Listeria ivanovii ssp. ivanovii* ATCC19119, respectivement.

**Todorov et al. (2011)**, ont discuté la coagrégation d'une souche de *Lb. plantarum* ST16Pa, tenant en compte le spectre d'action de sa bactériocine et ils ont rapportés que si cette bactériocine n'inhibe pas la souche à coagrérer avec *Lb. plantarum* ST16Pa, donc les deux souches peuvent se coexister facilitant ainsi la formation de biofilm. Dans le sens contraire, si la bactériocine de *Lb. plantarum* ST16Pa est active contre la souche à coagrérer, ce qui facilite le mode d'action bactéricide de la bactériocine aboutissant ainsi à l'élimination de la souche à coagrérer, donc elle n'existe pas dans le système de biofilm et ça ce qui est probablement passé dans notre cas, contre les deux souches MRSA et *Listeria monocytogenes* (le pourcentage de coagrégation est 0% avec les souches).

Certains lactobacilles sont capables de s'autoagrérer entre eux mais peuvent aussi coagrérer avec des microorganismes pathogènes. Ils créent ainsi un microenvironnement particulier autour du pathogène avec une concentration plus importante des substances

inhibitrices dirigées contre celui-ci. Les molécules impliquées dans l'agrégation sont soit localisées à la surface des cellules (acides lipotéichoïques, protéines ou glucides), soit sécrétées par celles-ci (peptides ou protéines solubles) (**Rousseau, 2004**).



# Conclusion Générale

## Conclusion Générale

Notre étude expérimentale, a été menée sur la capacité d'une bactérie lactique *Lb. curvatus* G6 encapsulée dans l'alginate de sodium à 2% 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 :

La microencapsulation par l'alginate de sodium à 2% a exercée un effet bénéfique en améliorant la résistance de la souche testée 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.

*Lb. curvatus* G6 a montré une capacité d'adhérence aux cellules épithéliales de l'iléon *in vitro*, malgré la faible hydrophobicité de sa surface, ce qui nous montre que l'adhésion n'est pas attribuée aux interactions hydrophobes, mais également aux autres interactions faisant appel à d'autres facteurs tels que les protéines de surface, les adhésines ou les pilis.

*Lb. curvatus* G6 a montré une capacité de s'autoagréger et former des biofilms contre les microorganismes pathogènes, présentant ainsi un pourcentage de 44,82%.

*Lb. curvatus* G6 a montré une capacité de se coagrérer avec *Lb. plantarum* F12, *Lb. casei ssp tolerans* G4 et *Lb. plantarum*, présentant les différents pourcentages : 35%, 83,63% et 31,33%. Cependant aucune coagrégation n'a été marquée avec *Listeria monocytogenes*, Methycilin résistant *Staphyococcus aureus* (MRSA), ainsi le pourcentage marqué est de 0%.

En fin, il est nécessaire d'effectuer des études *in vivo* pour confirmer l'efficacité de la microencapsulation 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

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFSSA (2003).** Alimentation infantile et modification de la flore intestinale. Rapport du groupe de travail. <http://www.afssa.fr>.
- AFSSA (2005).** Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. Rapport du groupe de travail. <http://www.afssa.fr>.
- Ait Belgnaoui A. (2006).** Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique. p. 1-191.
- Akhiar A.N.S.M. (2010).** Enhancement of probiotics survival by microencapsulation with alginate and prebiotics MMG 445. *Basic Technol.* 6: 13-18.
- 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.
- Anal A.K. et Singh H. (2007).** Recent advances in Microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci. Technol.* 18: 240-251.
- Ariful I.M.; Yun C.H.; Choi Y.J. et Cho C.S. (2010).** Microencapsulation of Live Probiotic Bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20 (10): 1367–1377.
- Bekhouhe F. (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes Pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de Doctorat. Université de Mentouri, Constantine.
- Bhadoria P.B.S. et Mahapatra S.C. (2011).** Prospects, technological aspects and limitations of probiotics. *Eur. J. Food Res. Rev.* 1 (2): 23-42.
- 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.
- Brinques G. et Ayub M.A.Z. (2011).** Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *J. Food Eng.* 103: 123–128.
- Burgain J.; Gaiani C.; Linder M. et Scher J. (2011).** Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.* 104: 467–483.
- Cenatiempo Y.; Berjeaud J. M.; Biet F; Fermaux C.; Hechard Y. et Robichon D. (1996).** Bactériocines de bactéries lactiques: Données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Le Lait.* 76: 169-177.



- Chamba J.F.; Duong C.; Fazel A. et Prost F. (1994).** Sélection des bactéries lactiques. *In*-Bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques. Technique et documentation, Loriga, Paris. 01: 499-518.
- 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. *J. Microbiol. Methods.* 56: 27– 35.
- Cintas L.M.; Casaus P.; Fernandez M.F. et Hernandez P.E. (1998b).** Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289-298.
- Daoudi L. (2000).** Purification, développement d'anticorps monoclonaux spécifiques et détection immunoenzymatique de la nisine Z, une bactériocine produite par *Lactococcus lactis ssp. Lactis* biovar. *Diacetylactis* UL719. Mémoire de maître ès science. Université Laval.
- Denis R.; Amiot J.; Boutin Y et Lamoureux M. (2006).** Innocuité, qualité et efficacité des probiotiques. Québec : Université de LAVAL. Canada.
- Diep D.B.; Havarstein L.S.; Nes I.F. (1996).** Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* 178: 4472-4483.
- Ding W.K. et Shah N.P. (2007).** Acid, bile, and heat Tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *J. Food Sci.* 72 (9): 446–450.
- 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. *J. Food Sci.* 74 (2): 51-36.
- Doleyres Y. et Lacroix C. (2011).** Cell immobilisation for the dairy industry. *J. food Eng.* 104 : 367-370.
- Dortu C. et Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : Caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1): 143-154.
- Drider D.; Fimland G.; Héchard Y.; Mc Mullen L.M. et Prevost H. (2006).** The Continuing story of class IIa bacteriocin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (2): 564-582.
- Drouault-Holowacz S.; Foligne B.; Dennin V. ; Goudercourt D. ; Terpend K. ; Burckel A. et Pot B. (2006).** Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolérance : In vitro and in vivo considerations. *Clin. Nutr.* 25: 994-1003.
- Fimland G.; Johnsen L.; Axelsson L.; Brurberg M. B.; Nes I. F.; Eijsink V. G. et**

- Nissen-Meyer J. (2000).** A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.* 182: 2643-2648.
- Foligne B.; Nutten S.; Grangette C.; Dennin V.; Goudercourt D.; Poiret S.; Dewulf J.; Brassard D.; Mercenier A. et Pot B. (2007).** Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J. Gastroenterol.* 13(2): 236-243.
- Fuller R. (1991).** Probiotics in human medicine. *Intest. Microbiol. Consultant.* 32: 439-442.
- Gbassi G.K. (2010).** Aspect physico-chimique de la microencapsulation et de la descapsulation des probiotiques. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg, France.
- Guarner F.; Khan A.; Garisch J.; Eliakim R.; Gangl A.; Thomson A.; Krabshuis J. et Mair T. (2008).** Probiotiques et Prébiotiques. Organisation Mondiale de Gastroentérologie. [http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/fr/pdf/guidelines/19\\_probiotics\\_prebiotics\\_fr.pdf](http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/fr/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics_fr.pdf).
- Hécharde Y. et Sahl H.G. (2002).** Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochem.* 84: 545-557.
- Iyer R.; Tomar S.K.; Kapila S.; Mani J. et Singh R. (2009).** Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Res. Inter.* 43: 103-110.
- Izquierdo A.E. (2009).** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg, France.
- Jasniewski J. (2008).** Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe IIa. These de doctorat. Nancy-University, Paris.
- Jimenez-Diaz R.; Rios-Sanchez R.M.; Desmazeaud M.; Ruiz-Barba J.L. et Piard J.L. (1993).** Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1416-1424.
- Joerger M.C. et Klaenhammer T.R. (1990).** Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *J. Bacteriol.* 172: 6339-6347.
- Joerger R.D. (2002).** Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *J. Poultry Sci. Association.* 82: 640-647.
- Kailasapathy K. (2002).** Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr. Iss. Intest. Microbiol.* 3: 39-48.
- Khater A.A.; Ali M.A. et Ahmed E.A.M. (2010).** Effect of encapsulation on some probiotic criteria. *J. Am. Sci.* 6 (10): 836-845.

- 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 Sci. Technol. 41: 493-500 .
- Klaenhammer T.R. (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie. 70: 337-349.
- Klaenhammer T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12(1-3): 39-85.
- 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. Inter. J. Sys. Bacteriol. 46 (2): 367-376.
- Kneifel W.; Jaros D. et Erhard F. (1993).** Microflora and acidification properties of yoghurt and yoghurt-related products fermented with commercially available starter cultures. Inter. J. Food Microbiol. 18 (3): 179-189.
- Labioui H.; Elmoualdi L.; El Yachioui M. et Ouhssine M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 144: 237-250.
- Lachance M. (2000).** Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* MJC15. Mémoire de maitre és science. Université Laval, Québec. 66-87.
- Lia 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.
- Lourens-Hattingh A. et Viljoen B. C. (2001).** Yoghurt as probiotic carrier food. Inter. Dairy. J. 11(1-2): 1-17.
- Makhloufi K. (2012).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat. Université de Pierre et Marie curie, Sorbonne.
- Malmo C.; Storia A.L. et Mauriello G. (2011).** Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 Cells Coated in Alginate Beads with Chitosan by Spray Drying to Use as a Probiotic Cell in a Chocolate Soufflé. Food Bioprocess Technol. 11: 755-758.
- Mandal S.; Puniya A.K. et Singh K. (2006).** Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. Inter. Dairy. J. 16: 1190-1195.

- Maragkoudakis P.A.; Zoumpopoulou G. ; Miaris C. ; Kalantzopoulos G. ; Pot B. et Tsakalidou E. (2006).** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Inter. Dairy. J.* 16: 189-199.
- Marteau P. et Seksik P.** Bactéries lactiques et probiotiques. (2005). In : Luquet F et Fronsois M. *Probiotiques et alicaments.* Paris : Lavoisier. p. 255-289.
- McAuliffe O.; Ross R.P. et Hill C. (2001).** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode d'action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 285-308.
- Merritt M. et Donaldson J. (2009).** Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *J. Med. Microbiol.* 58(12): 1533-1541.
- Moayednia N.; Ehsani M.; Emamdjomeh Z.; Asadi M.; Mizani M. et Mazaheri A. (2010).** Effect of réfrigération on viability of immobilized probiotic bacteria in alginate coat of straw berry. *World Appl. Sci. J.* 10(4): 472-476.
- Morelli L. (2000).** *In vitro* Selection of Probiotic Lactobacilli: A Critical Appraisal. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 1: 59-67.
- Naghmouchi K. (2007).** Divergicine M35, une nouvelle bactériocine produite par *Carnobactérium divergens* M35 : caractérisation moléculaire du mécanisme d'action antimicrobien et du phénomène de résistance. Thèse de Doctorat. Université Laval, Québec.
- Narayan S.; Jalgaonkar S.; Shahani S. et Kulkarni V. (2010).** Probiotics: current trends in the treatment of diarrhea. *Hong Kong Med J.* 16-3.
- Nigmatova K.; Morovsky M.; Pristas P.; Teather R.M.; Holo, H. et Javorsky, P. (2007).** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enLA homologues among ruminal Gram-positive cocci. *J. Appl. Microbiol.* 102(2): 563-569.
- Nilsen T.; Nes I.F.; Holo H. (2003).** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(5) : 2975-2984.
- Nissen-Meyer J.; Holo H.; Havarstein L.S.; Sletten K. et Nes I.F. (1992).** A novel laticoccal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174: 686-692.
- Oelschlaeger T.A. (2010).** Mechanisms of probiotic actions-a review. *Inter. J. Med. Microbiol.* 300: 57-62.
- Ouled-Haddar H.; Idoui T.; Sifour M.; Guezira M. et Bouthabet M. (2012).** Isolation, characterization et microencapsulation of probiotic *Lactobacillus curvatus* G7 from chicken crop. *Online. J. Sci. Technol.* 2: 1-6.



- Parada J.; Caron C.; Medeiros A. et Soccol C. (2007).** Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, proprieties and use as biopreservatives. *Braz. Archiv.Biol. Technol.* 50 (3):521-542.
- Petrović T.; Nedivić V.; Branković S.; Burgaski B. et Lacroix C. (2007).** Protection of probiotic buy microencapsulation. *CI. CFQ.* 1353 : 169-174.
- Piard J.C.; Muriana P.M.; Desmazeaud M.J. et Klaenhammer T.R. (1992).** Purification and partial characterization of lacticin 481 a lanthionine containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(1):279-284.
- Privat K. et Thonart P. (2011).** Action des cultures protectrices : cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(2) : 339-348.
- Rabeau S. (2009).** Etude d'un procédé continu de microencapsulation basé sur un micromélangeur. Thèse de Doctorat. Nancy-université, France.
- Rafter J. (2003).** Probiotics and colon cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17: 849-859.
- Reid G.; Jass J.; Sebulsky M.T. et McCormik J.K. (2003).** Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 658-672.
- Richard C.; Canon R.; Naghmouchi K.; Bertrand D.; Prévost H. et Drider D. (2006).** Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.* 23(2): 175-183.
- Robin J. M. et Rouchy A. (2001).** Les probiotiques. *Nutrithérapie INFO.*
- Roger D. (2005).** Mise au point d'un ferment mixte destine a la bioconversion des tubercules de manioc cyanogene. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro-industrielles, Université de Ngaoundéré.
- Rokka S. et Rantamäki P. (2010).** Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications *Eur. Food Res. Technol.* 231: 1–12.
- Rousseau V. (2004).** Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale. Thèse de Doctorat. Institut Nationale Des Sciences Appliqués, Toulouse.
- Roy D. ; Amiot J. ; Boutin Y. et Lamoureux M. (2006).** Innocuité, Qualité et Efficacité des probiotiques. *Biotechnologie des cultures lactiques d'intérêt laitier et probiotique.* Canada.
- Sabikhi L.; Babu R.; Thompkinson D. et Kapila S. (2008).** Resistance of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to Processing Treatments and Simulated Gut Conditions. *Food Bioprocess Technol.* 3:586–593.

- Sifour M.; Idoui T.; Ouled Haddar H.; Namous H. et Aissaoui S. (2012).** Production and characterization of *Lactobacillus plantarum* F12 with inhibitory activity against *Listeria monocytogenes*. Online. J. Sci. Technol. 2 :55-61.
- Smaoui S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.
- Sprules T.; Kawulka K. E. et Vederas J. C. (2004).** NMR solution structure of ImB2, a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin, carnobacteriocin B2. Biochimie.43: 11740-11749.
- Sridar M.; Nguyen B. et Kailasapathy K. (2003).** Studies on the effect of encapsulation on the survival of probiotic microorganisms under high acid and bile conditions. J. Food Sci. Technol. 40:458-460.
- Tagg J.R.; Dajani A.S. et Wannamaker L.W. (1976).** Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40:722-756.
- Tailliez P. (2004).** Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. Antibiotiques, 2004. Masson, Paris. 6, pp.35-41.
- Teoh P.L.; Mirhosseni S.H. et Manap M.A.Y. (2011).** Tolerance of free and encapsulated probiotics towards heat treatment and high sodium concentration. J. Food Agri. Environ. 9(1): 69-73.
- Tisserand F. (2011).** Encapsulation des probiotiques. J. food Eng., p.467-483.
- Todorov S.D. (2009).** Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*—production, genetic organization and mode of action. Rev. Braz. J. Microbiol. 40:209–221.
- Todorov S.D.; Prevost H.; Lebois M.; Dousset X.; Le Blanc J.G. et Franco B. (2011).** Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. World J. Microbiol. Biotechnol. 104:465–477.
- Trindade C. et Grosso C. (2000).** The effect of the immobilization of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. Milchwissenschaft. 55:496–499.
- Twomey D.P.; Ross R.P.; Ryan M.; Meaney B. et Hill C. (2002b).** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and application. Antonie Van Leeuwenhoek. 82:165-185.
- Van Belkum M.J.; Hayema B.; Jeeninga R.; Kok J. et Venema G. (1991a).** Organisation and nucleotide sequences of two bacteriocin determinant from lactococcal bacteriocin operons. Appl. Environ. Microbiol. 58: 572-577.

**Vasiljevic T. et Shah N.P. (2008).** Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *Inter. Dairy. J.* 18: 714-728.

· **Vidhyalakshmi R.; Bhagyaraj R. et Subhasree R.S. (2009).** Encapsulation “The Future of Probiotics”. *Adv. Biol. Res.* 3 (3-4): 96-103.

**Wang Y.; Henz M.E.; Gallagher N.L.; Chai S.; Gibbs A.C.; Yan, L.Z.; Stiles M.E.; Wishart D.S. et Vederas J.C. (1999).** Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochimie.* 38: 15438-15447.

**Woodruff W.A.; Novak J. et Caufield P.W. (1998).** Sequence analysis of *mutA* and *mutM* genes involved in the biosynthesis of the lantibiotic mutacin II in *Streptococcus mutans*. *Gene.* 206: 37-43.

**Woraharn S.; Chaiyasut C; Sirithunyalug B. et Sirithunyalug J. (2010).** Survival enhancement of probiotic *Lactobacillus plantarum* CMU-FP002 by granulation and encapsulation techniques. *Afr. J. Microbiol. Res.* 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

**Tableau 1 :** Effet de l'acidité (pH2) sur la survie de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé.

Temps (h)	0	1	2
Nombre de cellules viables (UFC/ml)			
taux de survie des cellules encapsulées	$45 \times 10^{13}$	$36 \times 10^{10}$	$83 \times 10^6$
Taux de survie des cellules libres	$11 \times 10^{12}$	$10^9$	$10^6$

Temps (h)	0	1	2
Log UFC/ml			
Cellules encapsulées	14.65	11.55	7.91
Cellules libres	13.04	9	6

**Tableau 2 :** Survie de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé incubé à 0.3% de sels biliaries.

Temps (h)	0	4	8
Nombre de cellules viables (UFC/ml)			
taux de survie des cellules encapsulées	$42 \times 10^{13}$	$11 \times 10^{11}$	$15 \times 10^7$
Taux de survie des cellules libres	$8 \times 10^{12}$	$11 \times 10^9$	$10^6$

Temps (h)	0	4	8
Log UFC/ml			
Cellules encapsulées	14.62	12.04	8.17
Cellules libres	12.9	10.04	6

**Tableau 3 :** Effet de la pancréatine sur la survie de *Lb. curvatus* G6 libre et encapsulé.

Temps (h)	0	1.5	3
Nombre de cellules viables (UFC/ml)			
Nombre de cellules encapsulées viables	$30 \times 10^{12}$	$20 \times 10^8$	$11 \times 10^5$
Nombre de cellules libres viables	$13 \times 10^{11}$	$7 \times 10^6$	$2 \times 10^3$

Temps (h)	0	1.5	3
Log UFC/ml			
Cellules encapsulées	13.47	9.3	6.04
Cellules libres	12.11	6.84	3.3

**Tableau 4 :** Résultat du test d'autoagregation.

DO		
La souche	DO <sub>i</sub>	DO <sub>f</sub>
<i>Lb. curvatus</i> G6	0.29	0.16

**Tableau 5:** Résultat du test de coagregation.

DO		
Les souches	DO <sub>i</sub>	DO <sub>f</sub>
<i>Lb. curvatus</i> G6/ <i>Listeria</i>	0.30	0.41
<i>Lb. curvatus</i> G6/MRSA	0.35	0.43
<i>Lb. curvatus</i> G6 /F12	0.36	0.234
<i>Lb. curvatus</i> G6/G4	0.33	0.054
<i>Lb. curvatus</i> G6/ <i>Lb.plantarum</i>	0.3	0.206

réalisé par :

- Gharbi Nour el yakine
- Graïdia Houda

Président : M<sup>r</sup> khennouf Tarek

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

Encadreur : D<sup>r</sup> Sifour Mohamed

Thème :

**Propriétés probiotiques des cellules libres et encapsulées d'un *Lactobacillus curvatus* bacteriocinogène d'origine humaine**

الملخص:

إن استعمال البكتيريا البروبيوتكية في العديد من الأغذية من أجل أدوارها الصحية زاد من أهميتها و من أجل هذا كرس هذا البحث لدراسة فاعلية الكبسلة الدقيقة لسلالة من البكتيريا اللبنية البروبيوتكية بواسطة هلام الألبينات ، وذلك لحمايتها من الظروف غير الملائمة الموجودة في الجهاز الهضمي، تمت دراسة مدى مقاومة السلالة البروبيوتكية *Lb. curvatus* G6 للحموضة المنخفضة (pH=2) والأملاح الصفراوية و كذلك للأنزيمات البنكرياسية ، بالإضافة إلى تأثير بعض على العوامل التقنية من خلال دراسة تأثير التخزين في درجة حرارة منخفضة 4 °م والمعالجة الحرارية. و من أجل إثبات مميزاتها البروبيوتكية، لجريت المزيد من الاختبارات مثل قابلية التصاق بالخلايا المعوية. وأظهرت النتائج أن هذه السلالة مقاومة للحموضة و سمية الأملاح الصفراوية وللهمض بواسطة أنزيمات البنكرياس وكذلك للتخزين والمعالجة الحرارية وخصوصا في حالة الكبسلة في هلام الألبينات فيما يبرهن فعالية الكبسلة في تحسين نسبة الحيوية في الظروف المشابهة لظروف الجهاز الهضمي.

الكلمات المفتاحية : بروبيوتيك ، الكبسلة الدقيقة، الألبينات، الحيوية.

Résumé :

L'utilisation des bactéries probiotiques dans de nouveaux produits alimentaires pour fournir des effets bénéfiques à la santé est aujourd'hui d'intérêt croissant dans l'industrie alimentaire. Cependant, le processus de stabilité des probiotiques n'est pas toujours optimale. Cette étude a été dirigée dans le but d'affirmer l'efficacité de la microencapsulation d'une bactérie lactique probiotique bactériocinogène *Lb. curvatus* G6 dans un gel d'alginate de sodium à 2% pour le maintien de sa viabilité durant le processus de production et de stockage et contre les conditions hostiles du tractus gastrointestinal. La tolérance de la souche de *Lb. curvatus* G6 à l'acidité (pH=2), aux sels biliaires et aux enzymes pancréatiques par simulation des conditions gastrointestinales a été évaluée. En plus de quelques aptitudes technologiques par l'étude de l'effet de la conservation au froid (4°C) et les traitements thermiques. Pour confirmer son potentiel probiotique, des tests complémentaires ont été réalisés pour vérifier sa capacité d'adhésion aux cellules intestinales et sa capacité d'agréger et former des biofilms. Les résultats montraient que la souche est résistante 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, ce qui confirme l'efficacité de la microencapsulation dans l'amélioration de la survie de *Lb. curvatus* G6.

Mots clés : probiotique, microencapsulation, alginate, viabilité.

Abstract:

The use of probiotic bacteria in novel foods to provide beneficial health effects is today of increasing interest in the food industry. The stability of probiotics is, however, not always optimal. This study was conducted to affirm the protective effect of microencapsulation of a bacteriocinogenic probiotic lactic acid bacteria *Lb. curvatus* G6 by sodium alginate gel to maintain its viability during food product processing and storage and against the hostile gastrointestinal tract conditions. The tolerance of *Lb. curvatus* G6 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 its ability to aggregate and to form biofilms. The results showed that strain is resistant to low pH, bile salts, digestion by pancreatic enzymes, cold storage and heat treatment, particularly when encapsulated in sodium alginate, what confirms the efficiency of the microencapsulation in the improvement of the *Lb. curvatus* G6 survival.

Key words: probiotic, microencapsulation, alginate, viability.