

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires
Option : Master 2 Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire

Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Techniques d'encapsulation de souches bactériennes

Présenté par :

GUENDOUZ Amar

Soutenu le : 18 septembre 2021

Devant le jury composé de :

Mme. OUKIL Naima	MCA	Encadreur
Mme. AIDLI Amel	MAA	Président
Mme. TOUATI Naima	MCB	Examineur

Année universitaire : 2020 / 2021

Remerciements

Je remercie très chaleureusement mon encadreur Naima OUKIL (MCA) pour sa disponibilité, son encadrement efficace, sa compréhension, sa grande gentillesse et surtout pour la grande confiance qu'elle m'a témoigné tout au long de cette étude.

Un grand merci à la doctorante Chahinaz BOUMEZOUED pour son aide, ses conseils, sa patience et l'intérêt quelle a manifestée à ce projet.

Ce travail n'aurait pas été possible sans diverses collaborations. J'exprime toute ma reconnaissance à Mr Hafed-Eddin MANSOURI directeur de laboratoire QUALILAB ECOSS pour avoir mis à ma disposition les équipements de son laboratoire.

Je remercie vivement les membres de jury d'avoir accepter d'y participer, et d'avoir accepter d'examiner mon travail.

Je terminerai en exprimant de sincères remerciements à mes parents pour leur écoute, leur soutien et leur encouragement tout au long de mon parcours universitaire.



Dédicaces

À ma mère et mon père

À mes deux sœurs

À mes amis

Je vous dédie cette citation du grand Albert Einstein dont

J'inspire ma philosophie de vie :

« La vie, c'est comme une bicyclette, il faut avancer pour ne pas perdre

l'équilibre. »

Liste des abréviations

CP : concentration totale en polymère

F : masse de ferments ajoutée

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

GRAS : Generally Recognized As Safe

LPS : Les lipopolysaccharides

MICI : maladies inflammatoires chroniques intestinales

MO : microorganisme

MRS: gélose de Man, Rogosa, Sharpe

NK: cellules natural killer

OMS : Organisation mondiale de la santé

Listes des figures

Figure 1 : stimulation de TLR 4 par les LPS des bactéries probiotiques.....	10
Figure 2 : schéma de l'encapsulation de cellules souches et de ses avantages.....	14
Figure 3 : représentation schématique d'une microcapsule et d'une microsphère.....	15
Figure 4 : Schéma représentant la méthode de séchage par pulvérisation.....	17
Figure 5 : schéma représentant la technique d'extrusion.....	18
Figure 6 : schéma représentatif de la coacervation complexe des probiotiques.....	19
Figure 7 : principe d'encapsulation par coacervation complexe.....	23
Figure 8 : étapes de la microencapsulation d'un mélange de souches probiotique, avec l'utilisation de l'amidon et la caséine à 9.5%.....	26
Figure 9 : photo illustrant la solution de microcapsule à une concentration de 9.5%.....	27
Figure 10 : étapes d'encapsulation des probiotiques par lyophilisation.....	28
Figure 11 : appareil ROTRONIC pour mesure de l'activité de l'eau.....	29
Figure 12 : tamiseur mécanique vibrant.....	29
Figure 13 : les étapes pour le test de viabilité des probiotiques encapsulés.....	30
Figure 14 : taux d'encapsulation avec les polymères (gélatine/carraghénane).....	35
Figure 15 : représentation graphique des taux d'encapsulation avec les polymères caséine/amidon.....	38
Figure 16 : micrographie optique des microcapsules, (A) : complexe caséine/amidon. (B) : complexe gélatine/carraghénane.....	39
Figure 17 : microcapsule tamisées après broyage.....	39
Figure 18 : le taux de survie des cellules non encapsulées et encapsulées dans un pH gastrique (pH=2) à une température de 37°C.....	41

Liste des tableaux

Tableau I : Principales espèces microbiennes utilisées comme probiotiques.....	5
Tableau II : Tableau récapitulatif des différents critères de sélection des probiotiques.....	6
Tableau III : Les techniques des différents procédés de la micro-encapsulation.....	15
Tableau IV : composition du mélange de souches probiotiques.....	21
Tableau V : tampons utilisés.....	21
Tableau VI : caractéristique des biopolymère d'encapsulation des bactéries probiotiques...	22
Tableau VII : Les différentes concentrations polymères et probiotiques.....	25
Tableau VIII : concentrations des différents paramètres de la microencapsulation.....	28
Tableau IX : Résultats de la viabilité des souches encapsulées (A) et non encapsulées (B) après leur exposition à des conditions gastrique.....	32-33
Tableau X : distribution des ratios sur les six expériences d'encapsulation.....	36



Table de matière

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Partie I: synthèse bibliographique

Chapitre I : Probiotiques et microflore intestinale

Historique.....2

I. Définitions et généralités.....2

II. I-1- Généralités.....2

I-2- Définition.....3

III. Composition et sélection.....3

II-1- Principaux types de microorganismes probiotiques.....3

II-2- Evaluation et critère de sélection.....6

IV. Microbiote intestinal.....7

III-1- Généralités et définition.....7

III-2- Maturation du tube digestif.....7

III-3- Microbiote et santé.....8

III-3-1- Modulation du microbiote intestinal par les probiotiques.....9

Chapitre II : Probiotiques et santé

I. Probiotiques et effet sur l'immunité.....10

I-1- Système immunitaire associé à l'intestin.....10

I-1-2- Immuno- modulation et mécanisme d'action.....10

I-1-3- Probiotiques et infection gastro-intestinale.....11

I-1-4- Perméabilité intestinale et fonction barrière des probiotiques.....11

I-2- Prévention du cancer_ côlon, vessie.....11

II. Probiotiques et effets nutritionnels.....12

III. Effets indésirables des probiotiques.....	12
---	-----------

Chapitre III : La microencapsulation des probiotiques

Généralités.....	13
I. Définition et objectif.....	13
II. Intérêts de la Microencapsulation.....	13
III. Principe de la technique.....	13
IV. Structure des microparticules.....	14
V. Procédés d'encapsulation.....	15
V-1- Technique d'encapsulation des probiotiques.....	16
V-2- Les techniques les plus importantes utilisées pour l'encapsulation de cellules probiotiques	16
V-2-1- Technique de coacervation dans l'encapsulation des probiotiques.....	18
VI. Matériaux enrobant.....	19
VI-1- Les polysaccharides.....	20
VI-2- Les protéines.....	20
VII. Facteurs affectant l'efficacité et le taux de la microencapsulation des probiotiques.....	20

Partie II: expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

I. Matériels.....	21
I-1- Souches Probiotiques et tampons.....	21
I-2- Matériaux d'encapsulation.....	22
I-3- Conditions gastriques simulées.....	23
II. Méthodes.....	23
II-1- Encapsulation par Coacervation complexe.....	23
II-1-1- Principe.....	23
II-2- Encapsulation de bactéries probiotiques en utilisant le couple gélatine/Carraghénane.....	24
II-2-1- Expression des résultats.....	25

II-2-2- Taux d'encapsulation.....	25
II-3- Micro encapsulation par coacervation complexe en utilisant le couple caséine/amidon.....	25
II-3-1-Mode opératoire.....	25
II-3-1-1- Lyophilisation.....	27
II-3-2- Expression des résultats.....	28
III. Observation microscopique.....	28
IV. Caractérisation physico-chimique des microcapsules.....	29
V. Etude de l'Influence de la méthode d'encapsulation sur les cellules probiotiques.....	30
V-1- Dénombrement des cellules.....	31
V-2- Expression des résultats.....	31
V-3- La survie des cellules probiotiques libres et encapsulées.....	34

Chapitre II : Résultat et discussion

I. Microencapsulation par coacervation complexe des polymères (gélatine/carraghénane).....	35
II. Microencapsulation par coacervation complexe de la caséine et de l'amidon.....	36
III. Observation microscopique.....	38
IV. Caractérisation physico-chimique des microcapsules.....	39
V. Etude de l'Influence de la méthode d'encapsulation sur les cellules probiotiques....	40
V-1- La survie des cellules probiotiques libres et encapsulées.....	40
Conclusion et perspectives.....	43

Références bibliographiques

Liste des annexes

Introduction

L'Homme vit continuellement avec une population de microorganismes complexe et diversifiée habitant son tractus gastro-intestinal appelée microbiote. L'un des principaux effets bénéfique de cette alliance est la protection et l'amélioration de la résistance aux maladies infectieuses de l'organisme hôte (**Eckburg *et al*, 2005**).

Au cours des dernières décennies, il y a eu une grande tendance vers les « aliments fonctionnels », définis comme « des aliments qui, par une action physiologique bénéfique spécifique, contribuent à la santé du consommateur ». Ce terme a été introduit pour la première fois par le gouvernement japonais au milieu des années 1980. La variété des aliments fonctionnels s'est élargie au fil des années pour inclure des produits alimentaires ayant plusieurs propriétés bénéfiques pour la santé. De nos jours, les aliments contenant des bactéries probiotiques, appelés « produits probiotiques », appartiennent également à cette catégorie, ont attirés l'attention des consommateurs, en raison de leurs bienfaits pour la santé par rapport aux produits traditionnels. D'une manière générale, les probiotiques améliorent les propriétés de la flore digestive et exercent un rôle à la fois préventif et curatif, ils sont aussi capables de moduler la réponse immunitaire intestinale et systémique (**Frakolaki *et al*, 2020**).

Pour produire les effets souhaités sur la santé, la culture probiotique doit arriver métaboliquement viable dans l'intestin. Cependant, le micro-organisme probiotique sous sa forme libre peut être sensible aux stress environnementaux (oxygène, pH acide et enzymes digestives) et diminuer considérablement sa concentration dans le tractus gastro-intestinal. Au cours de notre étude, on s'est intéressé à la micro encapsulation des probiotiques par une technique la coacervation complexe en utilisant des biopolymères à différents ratios. Il s'agit du couple gélatine/carraghénane et le couple caséine/amidon.

La microencapsulation de cultures probiotiques a été proposée pour protéger les micro-organismes des conditions hostiles, permettant à un plus grand nombre de cellules viables d'arriver dans l'intestin, les premiers travaux publiés ont porté sur les ferments lactiques du yaourt, ces espèces ont été piégées dans des hydrogels d'alginate de calcium (**Angélica *et al*, 2020**).

L'encapsulation par coacervation complexe est une technique déjà employée dans l'industrie alimentaire afin de protéger des ingrédients fonctionnels tels que les probiotiques, les vitamines, les antioxydants et les acides gras (**Champagne et Fustier, 2007**).

Partie I :
Synthèse bibliographique

Chapitre I

Probiotiques

Et

Microflore intestinale

Historique

Il ya plus d'un siècle, le scientifique russe Elie Metchnikoff réalisa l'hypothèse que la santé pourrait être améliorée en apportant des modifications au niveau de la flore intestinale. Metchnikoff, Lauriat de prix Nobel en médecine (1908) et le grand père des probiotiques a fait une observation historique dont il a constaté que la consommation des produits laitiers fermentés est à l'origine de la longévité de la population paysannes bulgares, il associa cela à une bactérie appelée « *bacillbulgar* » qui a été découverte par un médecin bulgare Stamen Grigov (**Anukam et Reid, 2007**).

Durant cette même période, Henry Tissier a observé une bactérie avec une morphologie irrégulière en forme Y dans les selles des nourissants. Ce pédiatre français a remarqué une faible présence en ces bactéries caractéristiques dans les selles des nourissants qui souffrent de diarrhées, contrairement aux enfants en bonne santé, l'analyse de leurs selles a démontrée une forte abondance en ces bifides (**Anukam et Reid, 2007**). Ces bactéries étaient à l'origine appelé *Bacillus Bifidus*, En 1924 Orla Jensen a proposé que *B. bifidus* sont classées comme espèce distinct appelées *Bifidobacterium* (**Leahy et al, 2005**).

Lors de son séjour en Vietnam, le Dr Boulard apprend qu'une population locale utilise une préparation alimentaire à base de litchis (fruit tropical) pour soigner les patients qui souffrent de diarrhée. L'analyse microbiologique de cette préparation lui a permis d'identifier une nouvelle souche saccharomyces capable de se développer à une très haute température (37°C). Après son retour en France, il décida de lui attribuer son propre nom *S. boulardii*, il l'a commercialisée après sous forme d'ampoules buvables comme médicament anti diarrhéique (**Goulet, 2009**).

Malgré toutes ces découvertes sur les bactéries qui améliorent la santé humaine, le mot probiotique ne fait apparition jusqu' à 1965, c'est Lilly et Sitwell qui ont proposé cette dénomination « probiotique » pour désigner les substances produites par ces microorganismes qui influencent sur la croissance des autres microorganismes (**Lilly et Stillwell, 1965**).

I. Définitions et généralités

I-1- Généralités

La première fonctionnalité d'un aliment est d'assurer la croissance et la survie d'un être vivant. Cependant, il existe d'autres fonctionnalités particulières qui peuvent apporter des bénéfices spécifiques à la santé générale de l'individu au-delà de leurs valeurs nutritionnelles de base (**Cuiba, 2008**).

La consommation des microorganismes ayant pour objectif de moduler la flore intestinale ou d'utiliser leurs propriétés métaboliques a conduit à la naissance du concept de probiotique (**Marteau et Rambaud, 1998**). Ce terme est issu des termes grecs « pros » et « bios » signifie « pour la vie » (**Bernier, 2010**).

Les professionnels de la santé reconnaissent de plus en plus l'effet sur la santé suite à la consommation d'aliments additionnés de probiotiques, plusieurs travaux scientifiques portant sur les propriétés des microorganismes (probiotiques) ont démontré leur effet bénéfique sur la fonction immunologique, digestive et respiratoire, notamment le rôle qu'ils jouent dans la lutte contre les maladies infectieuses chez les enfants (**FAO Food and nutrition Paper 85,2006**).

I-2- Définition

Le concept relatif aux probiotiques a évolué avec le temps parallèlement à l'évolution scientifique et la réflexion des chercheurs.

Lilly et Stilwell furent les premiers à utiliser ce terme. Il désigne « les substances produites par les microorganismes et qui favorisent la croissance des autres microorganismes » (**Lilly et al, 1956 ; Bernier, 2010**).

En 1974 R.B Parker choisit d'élargir la définition et inclura donc les microorganismes producteurs de ces substances (**Parker, 1974 ; Ninane et al, 2009**), ils sont alors dits : « Organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore » (**Bernier, 2010**) Fuller reprocha une nouvelle définition avec l'inclusion potentielle des antibiotiques, il définit un probiotique comme étant « des microorganismes ajoutés à l'alimentation et influençant de manière bénéfique l'animal hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale » (**Fuller, 1991**). Cette nouvelle description souligne la nature microbienne des probiotiques.

Un groupe d'experts européens a établi récemment des lignes directrices dans l'utilisation du terme « probiotique » dans les aliments. Cette proposition a été adoptée par la FAO et l'OMS, ces deux organismes formulent la définition suivante : « microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate produisent un effet bénéfique pour la santé de l'hôte » (**consultation mixte d'expert FAO/OMS**).

II. Composition et sélection

II-1- Principaux types de microorganismes probiotiques

Les probiotiques sont des microorganismes généralement constitués de bactéries ou de levures (voir tableau I) présents naturellement chez l'homme au niveau de sa flore intestinale.

Ils peuvent être retrouvés dans les aliments notamment les produits laitiers fermentés (yaourt), soit dans des médicaments ou des compléments alimentaires. (**Sébastien *et al*, 2013**) Parmi les microorganismes ayant des propriétés probiotiques on distingue :

Les lactobacilles :

Les lactobacilles forment un groupe hétérogène de bactéries ubiquistes, très répandues dans l'environnement. Ces bactéries jouent un rôle physiologique important chez l'homme et intervient dans plusieurs processus technologiques industriels pour les préparations alimentaires telles que la production des fromages, yaourt et de nombreux autres dérivés du lait (**Tailliez, 2004**).

Lactobacillus représente le genre le plus important des bactéries lactiques qui comprennent au moins 145 espèces reconnues (**Corrieu et Luquet, 2008**). Leur métabolisme est saccharo lytique exclusivement fermentaire (**Devos *et al*, 2009**).

Bifidobacteries :

Les bifidobactéries ont été isolées à partir des selles d'enfant nourris au lait maternel, elles représentent la flore prédominante de l'intestin d'un enfant avec 85 à 99% de la flore totale tandis que les autres espèces lactiques représentent 1 à 15% (chez les jeunes enfants nourris au lait maternel). Ces bactéries sont des microorganismes anaérobies stricts mais certaines espèces sont micro aérophiles.

Concernant leur métabolisme, la majorité des bifidobactéries utilisent les sucres comme source de carbone, Contrairement aux autres bactéries lactiques qui dégradent le glucose via la voie hexoses mono phosphate, les bifidobactéries catabolisent le glucose par la voie fructose_6_phosphate grâce à l'enzyme particulière «fructose-6- phosphate_ phosphokétalase », et produisent ainsi l'acide lactique comme métabolites primaires et certains autres acides aminés, elles sont considérées comme agents aromatisants capables de produire des vitamines et des substances antimicrobiennes (**Halima, 2019**).

Levures :

Les levures sont des champignons unicellulaires eucaryotes, (**Bourgeois *et al*, 1996**) étudiées et utilisées depuis les temps anciens pour la fabrication du pain de la bière et du vin (cuisson et brassage). Actuellement le domaine de leur application s'est élargie, elles sont considérées comme un outil de biotechnologie impliquées dans le domaine de la santé humaine en tant que probiotiques capable d'exercer un effet bénéfique sur le microbiote intestinal. La levure la plus retrouvée dans les compléments alimentaires et les médicaments appartient au genre *Saccharomyces*, il s'agit de la souche *Saccharomyces cerevisiae* mais plus particulièrement *Saccharomyces cerevisiae* variété *Boulardi*. (**Benjamin, 2016**)

Le métabolisme des levures est orienté en fonction des conditions de son environnement et la source du carbone retrouvée dans son milieu on distingue : le métabolisme oxydatif, oxydo-réductatif ou fermentaire. Les glucides sont catabolisés par glycolyse et converties en pyruvate. (Marden, 2007)

Tableau I : Principales espèces microbiennes utilisées comme probiotiques. (Sébastien *et al*,2013)

Genre	Espèce
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. reuterii</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. sporogenes</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. adolescentis</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. cremoris</i> <i>L. lactis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. clausii</i> <i>B. laterosporus</i> <i>B. pumilus</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae var boulardii</i>

II-2- Evaluation et critère de sélection :

Plusieurs critères ont été adoptés par l'OMS et la FAO pour aider à sélectionner les meilleures souches à propriétés probiotiques (tableau II) Cette évaluation se base d'une manière générale sur les propriétés fonctionnelles, la viabilité et l'innocuité de la souche, mais aussi sur des critères technologiques comme la résistance au phage, la viabilité durant les procédées de fabrication et la stabilité pendant le stockage (**Bruno, 2012**).

D'autres critères importants pour évaluer un probiotique après son ingestion et qui dépendent de ses facteurs intrinsèques et les facteurs de l'hôte, on distingue principalement l'acide gastrique, les sels béliers et le potentiel redox. L'interaction avec la flore endogène est un facteur qui peut réduire la survie des probiotiques (**Marteau et al, 2003**).

Les probiotiques doivent être capables de résister à leur passage dans le tube digestif et aussi à proliférer dans l'intestin, par conséquence le choix de vecteur avec lequel les probiotiques sont ingérés est fortement recommandé, car il joue un rôle dans la viabilité des microorganismes une fois arrivé au tractus gastro-intestinale (**Marteau et al, 2003**).

Une nouvelle approche d'encapsulation vise à protéger la viabilité de ces bactéries dans le système digestif et notamment du suc gastrique qui a un effet inhibiteur sur cette flore.

Tableau II : Tableau récapitulatif des différents critères de sélection des probiotiques (**Saarela et al, 2002**).

Critères de sécurité	Spécificités de la souche(identification). Absence de toxicité et pathogénie. Pas de transmission possible degènes. Pas d'effet invasif deL'épithélium intestinal.
Critères fonctionnels	Résistance à l'acide et à la bile. Adhérence a divers lignes de

Tableau II : Tableau récapitulatif des différents critères de sélection des probiotiques (suite)

	Cellules intestinales et persistance dans le tractus intestinal. souche capable de moduler l'immunité. Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé.
Critères technologiques et organoleptiques	Stabilité tout au long du processus de production et dans les produits finaux. Conservation des propriétés probiotiques et organoleptiques.

III. Microbiote intestinal

III-1- Généralités et définition :

Plusieurs microbiotes sont associés au corps humain et garantissent diverses fonctions pour l'hôte, le microbiote le plus étudié est celui de l'intestin.

Le microbiote intestinal, appelé au paravent « flore intestinale » est défini comme étant l'ensemble des bactéries qui colonisent le tube digestif (**Bertholom, 2017**).

Le tube digestif humain est un écosystème complexe qui héberge environ 10^{14} bactéries, soit dix fois plus que notre organisme compte de cellules (**Corthier et al, 2007**) Cette niche écologique est caractérisée par une grande biodiversité qui varie tout au long de tube digestif selon un gradient croissant en fonction du pH et l'oxygène existant. L'analyse de la composition de cette population microbienne a fait ressortir trois groupes phylogénétiques qui sont : les firmicutes, les bacteroidetes et les actinobactéries (**Bertholom, 2017**).

III-2- Maturation du tube digestif

À la naissance le tube du nouveau-né est dépourvu de bactéries, la formation du microbiote intestinale débute dès la rupture de la membrane fœtale, le fœtus est rapidement colonisé au contact de la flore vaginale et l'environnement de l'accouchement (**Campeotto et al, 2007 ; Butel, 2014**) La colonisation du tube digestif suit un schéma organisé avec l'intervention de plusieurs facteurs endogènes et exogènes. La diversification alimentaire, les conditions environnementales et l'antibiothérapie, font l'ensemble des facteurs exogènes

Qui influencent cette diversité microbienne chez le nourrisson, les facteurs endogènes incluent l'ensemble des sécrétions du tube digestif et les produits des premières bactéries qui s'installent dans ce biotope. (Corthier *et al*, 2007)

D'autres facteurs secondaires peuvent modifier le microbiote intestinal, l'absence d'hygiène lors de l'accouchement fait appel à l'installation d'une flore sous dominante d'anaérobies facultatif, dont *Escherichia coli* (Corthier *et al*, 2007 ; Bertholom, 2017), les études aujourd'hui ont démontrées que la colonisation du tube digestif par cette flore commensale est réduite et retardée de quelques jours à six mois dans les pays industrialisés par rapport aux pays en voie de développement (Nowrouzian *et al*, 2003).

III-3- Microbiote et santé :

Le microbiote est aujourd'hui considéré comme un organe caché et multifonctionnel. De nombreuses fonctions associées au Microbiote intestinal contribuent à l'amélioration de la santé humaine et participent dans l'équilibre de la digestion des aliments.

La population microbienne hébergée dans notre intestin exerce une fonction métabolique essentielle, elle assure la biotransformation des substrats provenant des fibres alimentaires non digérées par l'hôte pour libérer des acides gras à courtes chaînes et des vitamines, des peptides et acides aminés essentielles à partir des protéines. L'ensemble de ces métabolites permet aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire pour leurs croissances mais la plupart sont absorbés et utilisés par l'organisme et ont ainsi un rôle systématique et nutritionnel (Corthier *et al*, 2007 ; Campeotto *et al*, 2007).

Le microbiote intestinal garantie aussi une fonction de défense et participe à la maturation du système immunitaire, il sert comme barrière qui s'oppose à la prolifération des bactéries exogènes. Enfin, le microbiote intestinal provoque la progression de l'immunité grâce à certaines bactéries commensales qui exercent un effet spécifique sur le tissu lymphoïde au niveau des cellules T (Campeotto *et al*, 2007).

En effet, la perturbation du microbiote intestinal peut être l'origine du développement de plusieurs pathologies comme les MICI, ce déséquilibre est appelé dysbiose, qui est le résultat d'excès de microorganismes délétères et/ou de l'insuffisance des microorganismes bénéfiques à l'hôte (Bertholom, 2017).

Le microbiote est capable de revenir à son état d'équilibre initial en un à deux mois après des perturbations, ce qui est appelé la capacité de résiliation (Campeotto *et al*, 2007).

III-3-1- Modulation du microbiote intestinal par les probiotiques

Les recherches démontrent de plus en plus la relation entre le déséquilibre de la flore intestinale et les pathologies associées au tube digestif, cette relation a conduit à l'intérêt de la mise en place d'une approche préventive et curative par la modulation du microbiote en utilisant des probiotiques pour induire un changement spécifique dans la composition et l'activité du microbiote, et des prébiotiques qui vont stimuler la croissance d'un nombre limité de microorganismes dans le colon, ces symbiotiques, produisent donc un large effet bénéfique pour la santé (**Francesca *et al*, 2017**).

Chapitre II

Probiotiques et santé

I. Probiotiques et effet sur l'immunité

I-1- Système immunitaire associé à l'intestin

Le système immunitaire associé à l'intestine est en contact permanent avec de nombreux corps étrangers à l'organisme, cependant, il assure deux fonctionnalités primordiales, celle de déclencher une réponse immune protectrice contre un agresseur étranger, notamment les MO pathogènes mais aussi une réponse de tolérance vis-à-vis des protéines alimentaires et les bactéries de la flore commensale dans le but d'empêcher toute perturbation de la fonction d'assimilation des nutriments (Luquet et Corrieu, 2005).

I-1-2- Immuno- modulation et mécanisme d'action

Il existe plusieurs mécanismes par les quels les probiotiques participent à la modulation du système immunitaire. Les recherches ont démontré que certaines probiotiques tel que *L. rhamnosus* possèdent une activité anti-inflammatoire et analgésique (Amdekar et Singh, 2016).

Cette action de modulation se résume souvent sur la capacité des probiotiques à stimuler les cellules immunitaires via leurs récepteurs membranaires (TLR).

Lors de son contact avec les récepteurs de type TLR4, le LPS de la membrane cellulaire des bactéries Gram (-) négatif est capable de déclencher un processus de transcription génique intra cellulaire qui engendre une synthèse en cascade des protéines impliquées dans les réponses immunitaires, inflammatoires et de stress, dont les interleukines, les cytokines et le facteur de nécrose tumorale Alpha (Halloran et Underwood, 2019).

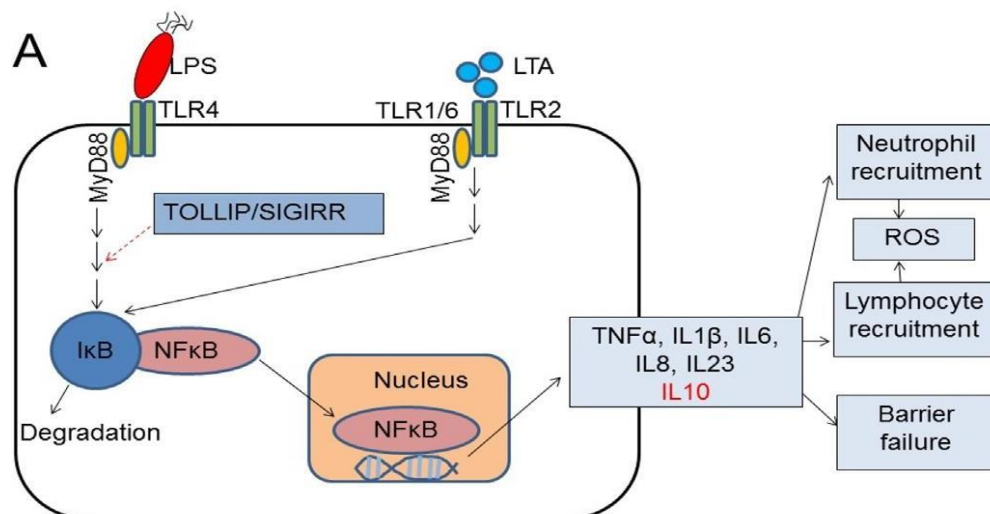


Figure 1 : stimulation de TLR 4 par les LPS des bactéries probiotiques. (Halloran et Underwood, 2019)

I-1-3- Probiotiques et infection gastro-intestinale

Une étude sur l'impact des bactéries lactiques sur les gastros entérites liées au rota virus chez une population infantile a mis en évidence un effet curatif et préventif exercé par ces probiotiques (**Luquet et Corrieu, 2005**).

Plusieurs souches ont démontré leurs capacités à réduire la sévérité et la durée des diarrhées dues à une infection aigue, les probiotiques diminuent les effets secondaires lors d'un traitement pour *Helicobacter pylori* (**Guide de pratique de l'Organisation mondiale de gastroentérologie, 2009**).

Une Méta analyse de **Floch et al, (2015)** a montré que les probiotiques peuvent diminuer le risque de développer une diarrhée à *Clostridium difficile* chez des patients sous traitement antibiotique.

I-1-4- Perméabilité intestinale et fonction barrière des probiotiques

La perméabilité intestinale survenue lors d'une infection au niveau de l'intestin peut se stabiliser par les probiotiques, l'utilisation de certaines souches *Lactobacillus* entraînent une réduction de la perméabilité engendrée par ces agents pathogènes en empêchant la déphosphorylation des protéines constituant les jonctions de cytosquelette. En effet, les probiotiques garantissent la sauvegarde de l'intégrité de la barrière intestinale (**Milliot-Stoclin, 2015**).

Les probiotiques assurent l'équilibre intestinal grâce à leurs fonctions barrières liées à leurs propriétés antagonistes. Cependant, ils s'opposent à l'implantation des pathogènes par plusieurs mécanismes, on distingue :

- Production de substances antimicrobiennes ;
- blocage de l'adhésion des pathogènes ;
- acidification du contenu colique (**Milliot-Stoclin, 2015**).

I-2- Prévention du cancer_ côlon, vessie

Les travaux de **Matsumoto et Benno, (2004)** sur certaines souches de bactéries lactique du yaourt et les bifides ont mis en évidence les propriétés antimutagènes et anti cancérogènes de ces probiotiques. Ils synthétisent des métabolites capables de réduire ou inhiber les processus conduisant à la formation du cancer colique.

D'autres études ont démontré l'effet préventif de l'ingestion de *Lactobacillus casei* envers le cancer de la vessie, en augmentant l'activité anti tumorale des cellules NK (Luquet et Corrieu, 2005).

II. Probiotiques et effets nutritionnels

a- Mal absorption du lactose

Les bactéries du yaourt améliorent la digestion du lactose chez les individus hypolactasiques par un apport enzymatique de la lactase, réduisant ainsi les troubles associés à une intolérance au lactose (Flourié et Nancey, 2007).

b- Fibres et éléments non digestibles

Les probiotiques récupèrent l'énergie à partir des éléments non digérés comme les oligosaccharides du lait grâce à leur activité glycosidase qui dégrade ces sucres complexes en substances simples facilement assimilées par l'organisme hôte.

Les probiotiques fermentent les fibres végétales pour produire des métabolites bénéfiques pour la santé, comme l'acide férulique et plusieurs autres phénols (Halloran et Underwood, 2019).

c- Activité métabolique

Les MO probiotiques exercent un effet trophique sur la muqueuse intestinale et améliorent l'accessibilité aux micronutriments, ils produisent des métabolites qui procurent un avantage nutritionnel pour l'hôte : la synthèse d'acides aminés à chaîne ramifiée, les vitamines et acides gras à courtes chaînes principalement le butyrate et le propionate (Halloran et Underwood, 2019).

III. Effets indésirables des probiotiques

La majorité des probiotiques sont classés dans la catégorie des organismes dénués de pathogénicité, mais ils peuvent exercer des effets secondaires avec un impacte négatif sur la santé dû à une administration en quantité très importante. Quatre effets indésirables sont impliqués : de rares infections chez les sujets immunodéprimés, les activités métaboliques délétères, une immuno modulation excessive et le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques vers les MO du Microbiote commensal (Butel, 2014).

Chapitre III

La microencapsulation

des probiotiques

Généralités

Lors de leur administration, les probiotiques sont confrontés à des situations critiques en raison des attaques enzymatiques, les variations du pH et des sels biliaires qui altèrent leurs propriétés fonctionnelles et affectent leur biodisponibilité.

Pour faire face à ces contraintes rencontrées durant la conception des aliments fonctionnels à base de probiotiques, on fait appel à des techniques qui permettent de résoudre ces défis. C'est l'encapsulation qui augmente la capacité de survie des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal et améliore la résistance dans ces situations environnementales défavorables (**Rashidinejad *et al*, 2020**).

I. Définition et objectif

La microencapsulation est l'ensemble des techniques permettant le piégeage d'un principe actif sous une forme solide ou liquide dans un matériau approprié dit membrane ou matrice, cela a pour but de produire des particules sphériques ayant des diamètres qui s'échelonnent entre quelques nm à quelques mm (**Frakolaki *et al*, 2020**).

La Microencapsulation des micro-organismes :

C'est un procédé par lequel les cellules microbiennes sont retenues dans une membrane protectrice ayant un but de réduire les lésions cellulaires ou la perte de cellules (**Krasaekoopt *et al*, 2003**).

II. Intérêts de la Microencapsulation

La fonction majeure de la micro encapsulation est de contrôler la libération d'un principe actif dans le tractus gastro-intestinal. Cette technologie est aussi utilisée pour divers objectifs, elle procure une protection contre les conditions sévères du suc gastrique et permet de vectoriser le principe actif et de mieux cibler son action (**Bile, 2015**).

On distingue d'autres intérêts comme :

- Masquer les arômes et les goûts des ingrédients en particulier les médicaments.
- Convertir le liquide en poudre plus légère (modifier l'état physique).
- Éviter l'incompatibilité entre les médicaments et réduire la toxicité (**Bansode *et al*, 2010**).

III. Principe de la technique

Le principe de la technologie d'encapsulation est basé sur l'enrobage des ingrédients bioactifs dans des particules de différentes formes à l'échelle Milli, micro ou nanométrique cet emballage qui enveloppe ses ingrédients doit être semi perméable mince et solide afin de

Garantir le maintien des conditions environnementales qui permettent de garder les cellules en vie. Le principe de cette technologie est illustré dans la figure 2.

Les matériaux de revêtement sont caractérisés d'une dureté et consistance assez importante mais en même temps ils peuvent être conçus pour libérer le contenu de la capsule. Le mécanisme de libération dépend de la nature des matériaux de la paroi utilisés et d'autres facteurs tels que le pH, l'action enzymatique et les agents de chélation.

La meilleure technique d'encapsulation repose sur plusieurs aspects technologiques elle doit assurer la survie des probiotiques durant le processus d'encapsulation et dans les conditions de stockage puis enfin durant la consommation.

On peut distinguer deux types de problématiques rencontrées durant le processus, la première est relative à la taille des probiotiques, la seconde est la difficulté de les maintenir en vie (Chavarri *et al*, 2012 ; Frakolaki *et al*, 2020).

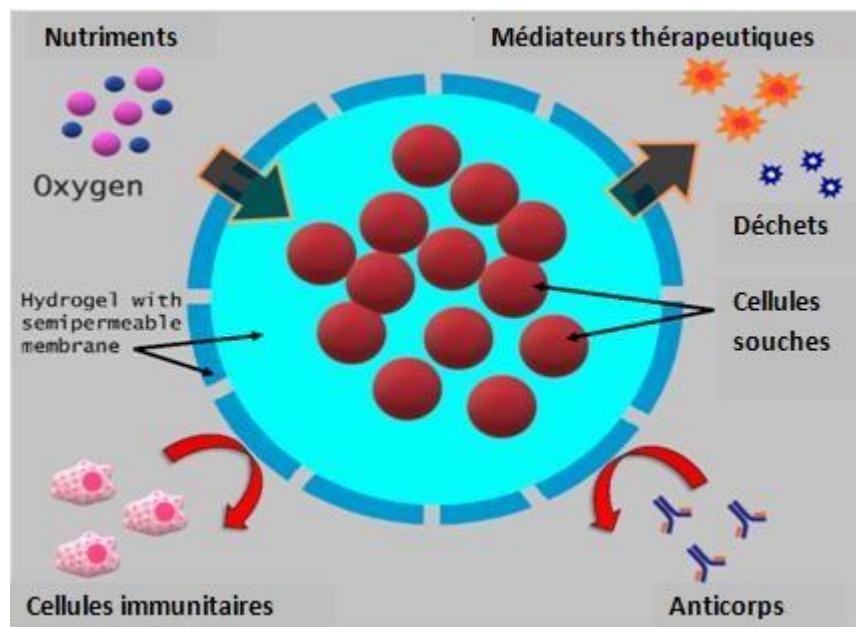


Figure 2 : Schéma de l'encapsulation de cellules souches et de ses avantages (Kandilgiannakis *et al*, 2021).

IV. Structure des microparticules

Les microparticules sont généralement sphériques, creuses (réservoir) ou solides (matrice) présentent une taille comprise entre 1 μm et 1 mm ils servent à contenir de nombreux types de matières actives solides, liquides ou gazeuses.

On peut classer ces microparticules en deux catégories en fonction de leur microstructure :

- Soit une microcapsule c'est-à-dire particule sphérique du type cœur membrane appelé aussi système réservoir, le cœur est constitué de la substance à encapsuler entourée d'une écorce solide continue qui est la membrane (agent enrobant).
- Soit une microsphère constituée d'un réseau polymère continu formant une matrice dans laquelle est dispersée la substance bioactive à l'état de molécule, de fines particules solides ou encore gouttelettes de solution, ce système est dit matriciel (**Richard et Benoît, 2000 ; Giraud, 2002**).

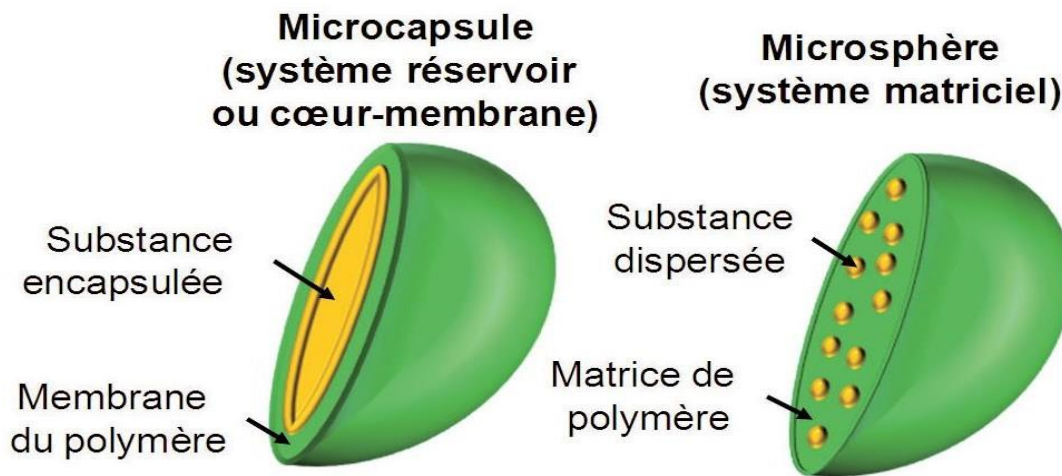


Figure 3 : Représentation schématique d'une microcapsule et d'une microsphère
(**Hamounicet Pinot, 2011**).

V. Procédés d'encapsulation

Il existe trois grandes familles de procédés technologiques qui aboutissent à la formation des microparticules d'enrobage, le choix de procédés est en fonction des propriétés physico-chimiques de l'ingrédient encapsulé et la taille de la microcapsule désirée. Le tableau suivant explique la classification des différents procédés de microencapsulation (**Giraud, 2002**).

Tableau III : Les techniques des différents procédés de la micro-encapsulation.

Procédés de la micro-encapsulation	Techniques
Physico-chimiques	Coacervation (simple ou complexe)
	Evaporation/extraction de solvant
	Gélification thermique

Tableau III : Les techniques des différents procédés de la microencapsulation (suite).

Chimiques	Polymérisation interfaciale
	Polymérisation en milieu dispersé
	Polymérisation radicalaire ou anionique
Mécaniques	Procédé basé sur la technologie fluide supercritique
	Spray drying
	Gélification ou Congélation de gouttes
	Enrobage en lit fluidisé
	Extrusion

V-1- Technique d'encapsulation des probiotiques

Plusieurs approches ont été adoptés contre les conditions défavorables pour améliorer la survie des probiotiques dans les aliments et dans le tube digestif. Pourtant, seuls quelques succès limités ont été obtenus (**Gardiner et al, 2002**).

Actuellement, la technique d'encapsulation a beaucoup d'attention car elle améliore l'endurance des bactéries probiotiques dans les aliments porteurs ainsi que dans le système gastro-intestinale (**Afzaal et al, 2019**).

Cette approche est basée sur le piégeage des bactéries dans un matériau polymère, afin de protéger l'organisme des conditions environnementales indésirables, sans effets délétères sur les propriétés physiologiques des bactéries vivantes (**Chang, 1999**).

L'encapsulation réussie ne répond à l'exigence que si elle peut protéger les bactéries en tenant compte de différents paramètres substantiels tels que le type de bactéries et les conditions de vie, la taille du support, le matériau de la paroi, la stabilité du support, le transfert de masse et le mécanisme de libération dans l'organisme.

V-2- Techniques les plus importantes utilisées pour l'encapsulation des cellules probiotiques

a- Séchage par pulvérisation

Dans cette technologie, les bactéries sont dispersées dans la solution contenant le support, puis la dispersion est injectée dans l'atomiseur dans une chambre à air chaud.

L'efficacité d'encapsulation et la taille des particules séchées fabriquées dépendent de différents facteurs tels que les conditions de séchage par atomisation (le débit, le type d'atomiseur, humidité de la chambre, températures d'entrée et de sortie de la chambre) et les propriétés de la dispersion (les propriétés des ingrédients bioactifs ainsi que celles du matériau de support/paroi, la viscosité de la solution (**Jafari *et al*, 2008**)).

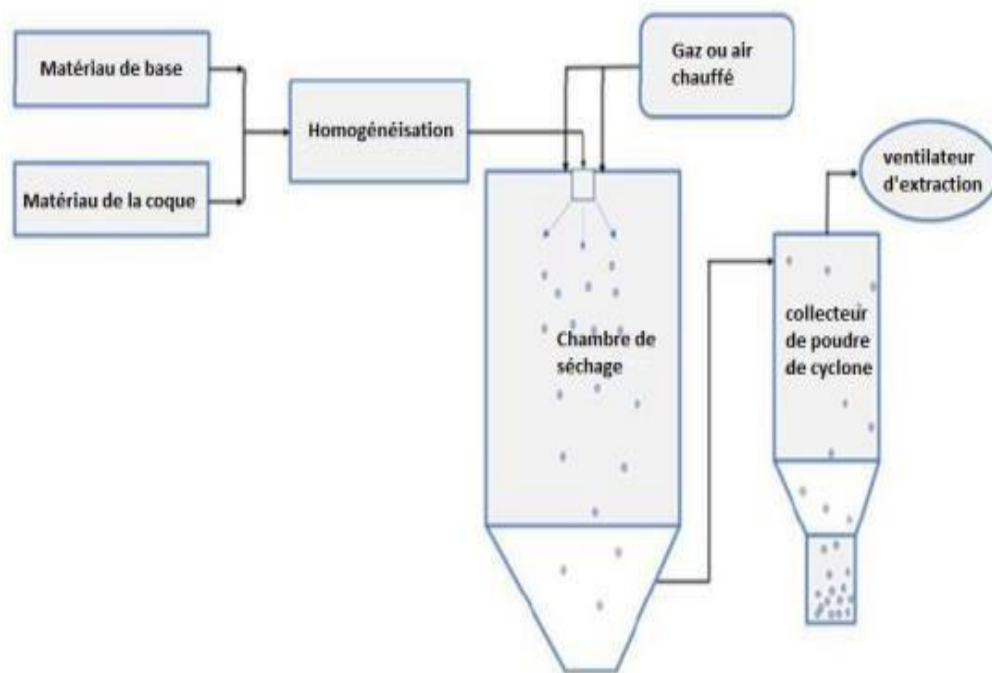


Figure4: Schéma représentant la méthode de séchage par pulvérisation (**Ozidal *et al*, 2020**).

b- Refroidissement par pulvérisation

Le refroidissement par pulvérisation, également connue sous le nom de congélation par pulvérisation est très similaire au séchage par pulvérisation, à la différence que la matrice de dispersion de l'ingrédient bioactif et du support est atomisée dans une chambre à air froid ou dans de l'azote liquide (**Ilic *et al*, 2009**). En raison de l'utilisation de basses températures, cette technologie est rentable est donc facile à mettre à l'échelle. Cependant, en comparaison avec le séchage par pulvérisation, l'efficacité de l'encapsulation est plus faible.

c- L'émulsification

C'est l'une des technologies d'encapsulation à basse température qui peut être utilisée pour la coencapsulation des probiotiques. Cette technique est facile à réaliser et améliore considérablement le taux de survie des probiotiques de manière significative. Le principal défaut de cette procédure est la grande variété de taille et de forme des supports obtenus, même si leur taille peut être modifiée par variation du rapport eau/huile et la vitesse d'agitation (**Kailasapathy, 2009**).

Il existe trois méthodes d'émulsification pour l'encapsulation des cellules probiotiques :

- a) L'émulsification et gélification ionique ;
- b) L'émulsification et la gélification enzymatique ;
- c) L'émulsification et polymérisation inter faciale (**Burgain *et al*, 2011**).

d- Extrusion

L'extrusion est une méthode simple et peu coûteuse qui se fait dans des conditions douces et qui convient donc à l'encapsulation de cellules probiotiques (voir figure 5).

L'inconvénient de cette technique est qu'elle est difficile à utiliser pour une production à grande échelle en raison de la formation lente de microbilles (**Burgain *et al*, 2011**).

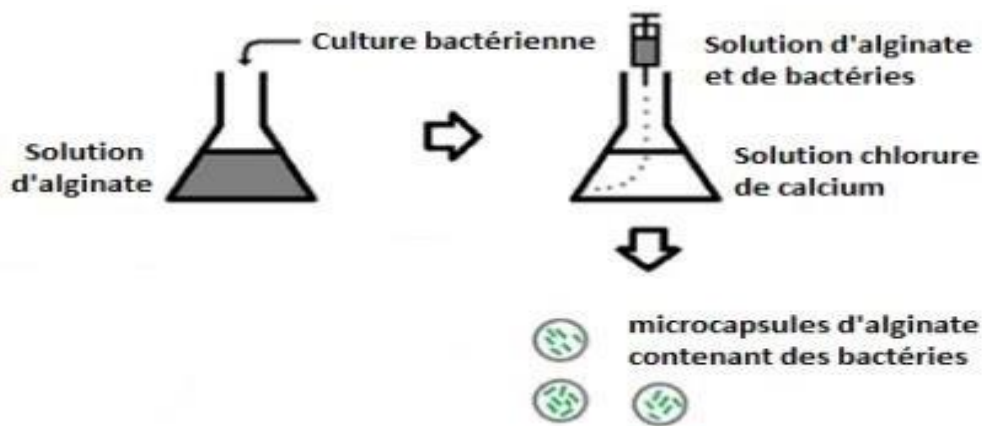


Figure5 : Schéma représentant la technique d'extrusion (**Cook *et al*, 2012**).

V-2-1- Technique de coacervation dans l'encapsulation des probiotiques

Selon **Ghasmi *et al*, (2017)** la coacervation est basée sur les interactions électrostatiques entre des biopolymères de charges opposées (figure 6) La coacervation consiste à provoquer une désolvation d'un ou plusieurs polymères dans une solution en affectant les propriétés de solvant ou la charge de ces polymères, il existe Plusieurs façons pour modifier la solubilité des substances : variation du pH, concentration, la force ionique, les températures et l'addition d'un non solvant (**Giraud, 2002**).

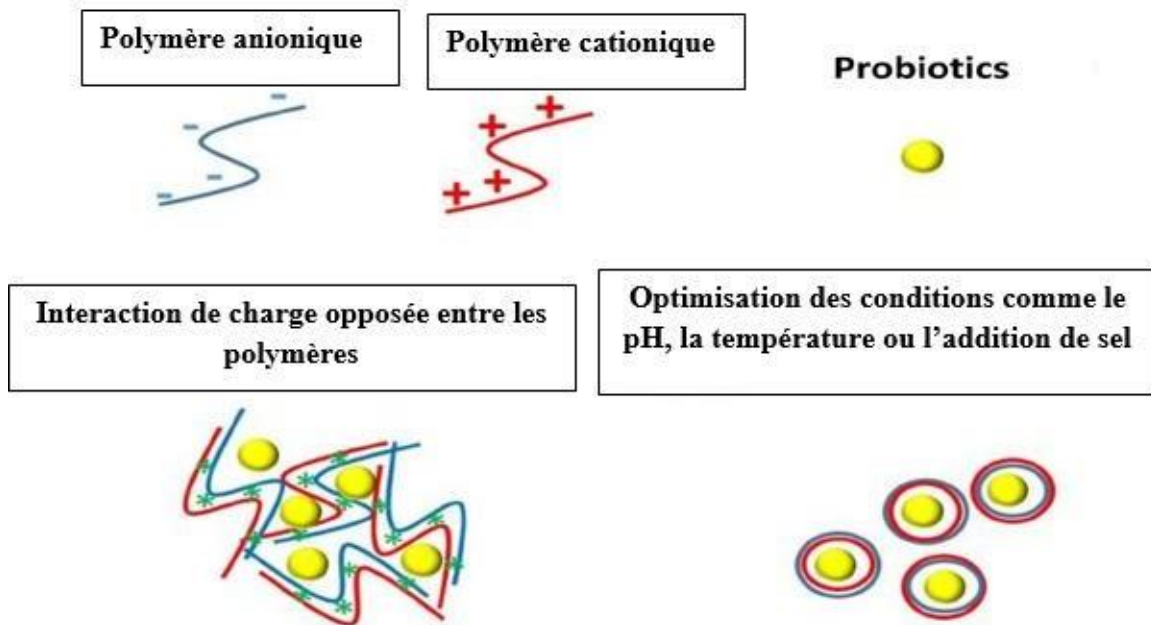


Figure 6 : Schéma représentatif de la coacervation complexe des probiotiques.

Ce phénomène conduit à la formation de deux phases séparées : une phase riche en coacervats et une autre phase surnageante riche en solvant. Les coacervats riches en polymères s'accumulent autour de l'ingrédient actif pour former un film de protection continu (**Burgain *et al*, 2016**).

Il existe deux types de coacervation :

- Coacervation simple : Interaction électrostatique entre un composé actif chargé et un biopolymère de charge opposée.
- Coacervation complexe : interaction électrostatique entre deux biopolymères de charges opposées en tant que support et les composés bioactifs (**Rashidinejad *et al*, 2020**).

VI. Matériaux enrobant

Les biomatériaux utilisés dans les techniques d'encapsulation englobent les différents polymères naturels d'origine polysaccharidique et protéique. Ces polymères sont souvent biocompatibles, biodégradables et bien sûr non toxiques (**Gbassi, 2010**).

Pour qu'un polymère puisse être employé dans l'industrie alimentaire, il doit préalablement être reconnu comme **GRAS** c'est-à-dire sécuritaire et non toxique pour l'homme. Il ne doit pas non plus nuire à l'apparence, le goût et la texture ou la durée de conservation du produit (**Khalié, 2013**).

VI-1- Les polysaccharides :

Ce sont des macromolécules organiques constituées d'un enchaînement répété d'unités monosaccharidiques liées entre elles par des liaisons glycosidiques. Ils sont caractérisés par différentes qualités physico-chimiques ce qui leur donne une perspective encouragée en tant que biomatériaux d'encapsulation.

Les polysaccharides sont capables de produire des entités amorphes qui offrent un support fondamental aux matériaux de la paroi, certains d'entre eux reconnues comme matrice bio adhésive pourraient intensifier le temps de séjour ainsi que l'absorption cellulaire des probiotiques et prébiotiques (**Rashidinejad *et al*, 2020**).

VI-2- Les protéines :

Une protéine est un enchaînement linéaire d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques, souvent utilisés comme matériaux de paroi pour l'encapsulation des probiotiques. Elles ont gagné une popularité dans la technologie d'encapsulation en raison de leurs propriétés et capacités d'interagir avec plusieurs types de molécules. Ces molécules possèdent aussi d'excellentes propriétés fonctionnelles telles que l'émulsification, la capacité de moussage, de rétention d'eau, de gélification et de formation de bio film.

Les protéines sont obtenues à partir de diverses sources renouvelables abondantes d'origine biologique généralement reconnu comme non toxique (GRAS) (**Rashidinejad *et al*, 2020**).

VII. Facteurs affectants l'efficacité et le taux de la microencapsulation des probiotiques

L'efficacité de l'encapsulation dépend de:

- Enrobage des capsules.
- Concentration de la solution polymère et le diamètre des billes.
- Conditions environnementales.
- Effet des bactéries sur les capsules.
- Concentration initiale de cellules microbiennes.
- Conditions des facteurs de traitement. (**Mortazavian *et al*, 2007 ; Solanki *et al*, 2013**)

Conclusion et perspectives

Une culture probiotique sous sa forme libre est exposée à des conditions qui diminuent sa viabilité et affectent ses propriétés fonctionnelles. Cependant, pour qu'elles puissent exercer leurs effets bénéfiques, ces cellules probiotiques doivent être vectorisées jusqu'à leur site d'action.

Dans notre travail nous avons réalisé une microencapsulation d'un mélange de souches probiotiques par la technique de coacervation complexe. Ces cellules bénéfiques ont été enfermées dans des microcapsules à base de biopolymères (caséine/amidon), (gélatine/carraghénane) qui assurent une protection contre les hostilités digestives.

Les résultats que nous avons obtenus, ont montré que les taux d'encapsulation atteignent une valeur de 50% pour les polymères (gélatine/carraghénane) avec les ratios (0.3 ; 0.1), le processus était difficile à maîtriser avec des polymères qui expriment des propriétés gélifiantes très élevées et sensibles aux variations des pH. La non stabilité des polymères est considérée comme un obstacle qui nous empêche de mieux comprendre les interactions entre ces derniers.

Dans le même contexte, et en suivant la même technique, des microcapsules ont été élaborées en utilisant la caséine et l'amidon comme matériaux de la paroi d'enrobage. Six essais ont été effectués avec un rendement d'encapsulation très élevé compris entre 62.09% et 79.85%, des résultats qui permettent de comprendre les facteurs impliqués dans la réussite de la technique avec un taux d'encapsulation important et qui confirment l'hypothèse de l'influence de la concentration des polymères et du principe actif sur l'efficacité de l'encapsulation.

Nous avons opté pour la lyophilisation pour conserver les microcapsules élaborées par coacervation complexe, chose qui permet d'éliminer (la phase solvant) des coacervats et obtenir des microcapsules déshydratées protégées des contaminations et conservées pour une longue durée.

Une simulation des conditions gastriques a été réalisée, pour examiner la capacité des microcapsules à protéger cette culture probiotique dans un environnement hostile (PH 2), l'analyse des résultats nous mènent à conclure que le système polymère présent ici semble être approprié pour la formation des parois protectrices autour de ces bactéries, La microencapsulation par coacervation complexe est une technologie adaptée pour améliorer la survie des probiotiques aux conditions de stress gastrique.

Le choix de polymères d'encapsulation est primordial, il doit être à la fois économique, abondant et non toxique et répond à plusieurs critères, tel que la résistance à l'acidité, une faible affinité pour l'oxygène et permet une libération du principe actif une fois arrivé au tube digestif.

Plusieurs perspectives peuvent être dégagées de ce travail :

Il serait intéressant d'utiliser une autre technique à savoir l'extrusion ou l'émulsification, et de produire des microcapsules par l'utilisation d'autres types de polymères afin d'établir une étude comparative entre les capsules obtenues par ces différentes techniques et améliorer le rendement d'encapsulation.

Il serait aussi utile d'effectuer une encapsulation des probiotiques avec des prébiotiques ou un autre composé bioactif pour augmenter l'efficacité de survie des cellules pendant le processus d'encapsulation et effectuer des essais d'incorporation de ces bactéries encapsulées dans des matrices alimentaires.

Les futures recherches devraient viser à augmenter la survie des probiotiques *in vivo*, et d'avantage d'exemples d'aliments fonctionnels contenant ces ingrédients doivent être développés et testés.

Liste des références bibliographiques

Références bibliographiques

(A)

Abdellah R. (2014). Effet de divers biomatériaux d'encapsulation sur la survie de certaines bactéries lactiques d'intérêt aux hostilités digestives simulées, Mémoire de Magister en Sciences Agronomiques. Université Abdelhamid Ibn Badis–Mostaganem- P64.

Adams, MR., Moss, MO. (2000). Food Microbiology. Second Edition, The Royal Society of Biochemistry éd. Cambridge. UK. pp. 318-323.

Afzaal, M., Saeed, F., Arshad, M-U., Nadeem, M. T., Saeed, M., & Tufail, T. (2019). The effect of encapsulation on the stability of probiotic bacteria in ice cream and simulated gastrointestinal conditions. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 11(4) : 1348-1354.

Ali R., Akbar B., AbdurRehman , A., Afshin B., Harjinder S., Mahdi J. (2020). Co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their application in functional/synbiotic dairy products, Critical Reviews in Food Science and Nutrition

Amdekar, S., Singh, V. (2016). Studies on anti-inflammatory and analgesic properties of Lactobacillus rhamnosus in experimental animal models, Journal of complementary & integrative medicine. 13 (2) 145–150.

Angélica L., Siqueira R., Stela N., Suely Madruga, M., Julia A., Portela, I., Christina T. (2020). Microencapsulation de Lactobacillus acidophilus La-05 et incorporation dans les laits végétaliens : Caractéristiques physico-chimiques et survie au stockage, exposition à des conditions de stress et digestion gastro-intestinale simulée. Food Research International, 135, 109295.

Anukam, KC., Reid, G. (2007). Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, p 466-474

(B)

Bansode, S-S., Banarjee, S-K., Gaikwad, D-D., Jadhav, S-L., Thorat, RM. (2010). Microencapsulation. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, V : 1, I : 2, Article 008.

Barakat, MM., Nakagawa, AM., Casagrande, R., Georgetti, SR., Verri, WA et de Freitas, O. (2012). Préparation et caractérisation de microcapsules à base de polymères

biodégradables : Complexe pectine/caséine pour les systèmes de libération contrôlée de médicaments. *AAPS PharmSciTech*, 13 (2), 364-372.

Benjamin, C. (2016). LES PROBIOTIQUES (BACTERIES ET LEVURES) : ou on est-Aujourd'hui? Thèse de doctorat. Université DE MONTPELLIER. P 58-59.

Bernier, L. Les probiotiques en 2010 : une revue de la littérature. 2010. Thèse Pharm : Université d'Angers. 2010; 166.

Bertholom, C. (2017). Le microbiote intestinal: un nouvel organe. *Option / Bio*, 28 (567-568), 15–16.

Bile, J. (2015). Microencapsulation d'agent antimicrobien pour le développement de conditionnements primaires fonctionnalisés. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard – Lyon 1, p 17-19

Bourgeois, CM., Mescle, J-F., Zucca, j. (1996). Microbiologie alimentaire. Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments _ 2eme Edition Ed. Tec & Doc, 672 p.

Bruno, E. (2012). Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne, p 35.

Burgain, J., C. Gaiani, M. Linder, and J. Scher. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104 (4):467–83.

Burgain, J., Scher, J., Gaiani, C. (2016). Microencapsulation de bactéries probiotiques. *Techniques de l'ingénieur*, F3800 v1.

Butel, M.-J. (2014). Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *Journal Des Anti-Infectieux*, 16 (2), 33–43.

(C)

Campeotto, F., Waligora-Dupriet, AJ., Doucet-Populaire, F., Kalach, N., Dupont, C., Butel, MJ. (2007). [Establishment of the intestinal microflora in neonates] *Gastroenterol Clin Bio* 1;31:533—42.

Champagne, C-P., et Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compound in to foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 184 190.

Chang, T. M. S. (1999). Artificial cells, encapsulation, and immobilization. *Annals of the New York Academy of Sciences* 875 (1):71–83.

Chavarri, M., Maranon, I., & Carmen, M. (2012). Technologie d'encapsulation pour protéger les bactéries probiotiques. *Probiotiques*. 509-53

Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivante. Cordoba, Argentine : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et Organisation mondiale de la santé, 2001, 34 p. ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_fr.pdf.

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162(1) : 56-67.

Corrieu, G., Luquet, FM. (2008). The taxonomy of lactic acid bacterian: « Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments ». TEC&DOC/ Lavoisier éd. Paris. France. p19-106.

Corthier, G., Sokol, H., et Doré, J.(2007). Diversité du microbiote et de ses fonctions. *Obésité*, 2 :215–220.

Cuibai, F. (2008). L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris (Thèse de doctorat). INRA-Agro. Paris- Tech ; p. 1-193.

(D)

De Vos P., Garrity, GM., Jones, D., Krieg, NR., Ludwig W., Rainey, FA., Schleifer, KH., Whitmanet, WB. (2009). Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In : « *Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes* » Vol 3. Springer éd., New York. pp.19-511.

(E)

Eckburg, PB., Bik, EM., Bernstein, CN., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill SR., Nelson, KE., Relman, DA (2005). Diversity of the human microbial flora. *Science*. 308:1635-1638.

Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T. R., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B.P. (2015). Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fattyacids and probiotic

(F)

Finch, C.A., Bodmeier, R. (2000). Microencapsulation, in Ullman's encyclopedia of industrial chemistry electronic release, 6th ed Wiley-VCH, Weinheim 7.

Floch, M.H., Walker, W.A., Sanders, M.E., Nieuwdorp, M., Kim, A.S., Brenner, D., Brandt, L.J. (2015). Recommandations pour l'utilisation des probiotiques - mise à jour 2015. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 49, S69 – S73.

Flourié, B et Nancey, S. (2007). Propriétés fonctionnelles des probiotiques. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42, 38–44.

Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D., & Tzia, C. (2020). Une revue des techniques de microencapsulation pour l'incorporation de bactéries probiotiques dans les aliments fonctionnels. *Examens critiques en science alimentaire et nutrition*, 1–22.

Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D., & Tzia, C. (2020). Une revue des techniques de microencapsulation pour l'incorporation de bactéries probiotiques dans les aliments fonctionnels. *Examens critiques en science alimentaire et nutrition*, 1–22.

Francisca, J., Alexandre, N., Nathalie, K., Muriel T. (2017). Lien entre les probiotiques et le microbiote : vision du clinicien. *Cahiers de nutrition et de diététique* 52S, S5-S12

François-André, A., François, P. (2010). Rôles des probiotiques, prébiotiques et produits de fermentation au niveau du microbiote intestinal, *Actualités Pharmaceutiques N°501*

Fuller, R. (1991). probiotics in human medicine. *gut*, 32 :439-442.

(G)

Gardiner, G.E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Kevin Collins, J., Fitzgerald, G., Paul Ross, R., and Stanton, C. (2002). A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal* 12 (9):749–56.

GBASSI, G.K. (2010). Aspects physicochimiques de l'encapsulation et de la dés-encapsulation des probiotiques. Thèse de doctorat. université de strasbourg, p 53.

Ghasemi, S., Jafari, S.M., Assadpour, E., & Khomeiri, M. (2017). Production de nano-complexes de protéines de lactosérum et de pectine en tant que supports d'huile d'écorce d'orange. *Polymères d'hydrates de carbone*, 177, 369-377.

Giraud, S. (2002). Microencapsulation d'un diisocyanate et d'un phosphate d'ammonium. Application : élaboration d'un système polyuréthane mono composant à propriété retardatrice de flamme pour l'induction textile. Thèse de doctorat. Université de Lille, p 28.

Goulet, O. (2009). Un probiotique pas comme les autres : d'une histoire tropicale à des

propriétés biologiques et des effets cliniques prouvés. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 22, 269–272.

Guide de pratique de l'Organisation mondiale de gastroentérologie: probiotiques et prébiotiques. (2009). *Journal arabe de gastroentérologie*, 10, 33–42.

(H)

Halima, B. (2019). Caractérisation technologique de bifidobactéries isolées de différents écosystèmes. Thèse de doctorat. Université d'Oran 1 Ahmed Ben bella. P 25-31.

Halloran, K., et Underwood, MA (2019). Mécanismes d'action probiotiques. *Early Human Development*, 135, 58–65.

Hamounic, B et Pinot, F. (2011). microencapsulation, Une technologie de choix pour la formulation d'actifs. *L'actualité chimique*, numéro 352.

Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2009). Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*, 19(2), 77–84.

(I)

Ilic, I., R. Dreu, M. Burjak, M. Homar, J. Kerc, and S. Srcic. (2009). Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology. *International Journal of Pharmaceutics* 381 (2):176–83.

(J)

Jafari, S. M., E. Assadpoor, B. Bhandari, and Y. He. (2008). Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International* 41 (2):172–83.

(K)

Kailasapathy, K. (2009). Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 4 (033):1–19.

Kandilogiannakis, L., Filidou, E., Kolios, G., Paspaliaris, V. (2021). Ad-Dressing Stem Cells: Hydrogels for Encapsulation. *Processes*, 9, 11.

Khalié, M-A. (2013). Microencapsulation de probiotiques pour la fabrication d'un fromage Cheddar fonctionnel. Mémoire pour l'obtention du grade de Maître sciences, p28.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. et Deeth, H. (2003). Evaluation des techniques d'encapsulation de probiotiques pour le yaourt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3-13.

(L)

Leahy, SC., Higgins, DG., Fitzgerald, GF et Sinderen, D. (2005). S'améliorer avec les bifidobactéries. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1303–1315.

Lilly, DM., Stillwell, RH. (1965). Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science.*;147:747-748.

Luquet F, M., Corrieu, G. (2005). Bactéries lactiques et probiotiques. ED : technique et documentations. Lavoisier. Paris. P 232-240

(M)

Marden, J-P. (2007). Contribution à l'étude de mode d'action de la levure *saccharomyces cerevisiae* SC47 chez le ruminant : approche thermodynamique chez la vache laitière. Thèse de doctorat, université de Toulouse.

Marteau, P and Shanahan, F. (2003)."Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects." *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17(5): 725-740.

Marteau, PH. (1994). Survie et effet de microorganismes alimentaires non pathogènes dans le tube digestif de l'homme. Thèse de doctorat de l'université de paris sud, paris, France.

Marteau, P et Rambaud J-C. (1998). Probiotiques en gastroentérologie: bases rationnelles, effets démontrés et perspective. *Hépto-Gastro*; 5 (4) : 267-273.

Matsumoto, M., et Benno, Y. (2004). La consommation de yogourt *Bifidobacterium lactis* LKM512 réduit la mutagénicité intestinale en augmentant la teneur en polyamine intestinale chez les sujets adultes en bonne santé. *Recherche sur les mutations / Mécanismes fondamentaux et moléculaires de la mutagenèse*, 568 (2), 147–153.

Milliot-Stoclin, R. (2015). Les probiotiques : VENI, VIDI, MICI. Thés de doctorat, université de Lille 2, France, p 41-42.

Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(1) : 1-18.

(N)

Ninane, V., Mukandayambaje, R., Berben, G. (2009). Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation règlementaire en Belgique et sur les avancés scientifiques en matière d'évaluation des effets de santé du kéfir. *Biotechnol Agron Soc Environ* ; 13:459-66.

Nowrouzian, F., Hesselmar, B., Saalman, R.(2003) Escherichia coli in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *PediatrRes* 54:25/14

(O)

Ozdal, T., Yolci-Omeroglu, P., & Tamer, E. C. (2020). Role of encapsulation in functional beverages. In *Biotechnological Progress and Beverage Consumption* (pp. 195-232). Academic Press.

(P)

Parker, RB. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal NutrHealth*. 29:4-8.

Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation - FAO Food and Nutrition Paper 85. 2006.

(R)

Richard, J., Benoît, J-P.(2000). Microencapsulation. *Techniques de l'ingénieur. Traité génie des procédés, J2210 v1.*

(S)

Saarela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminen, S., Mattila-Sandholm, T. (2002). Gut bacteria and healthfoods : the European perspective. *International Journal of Food Microbiology* 78 :99 – 117.

Sébastien, F., Claire, P., Johanna, B., Julie, T., Anne-Laure, Y .(2013). Que savons-nous des probiotiques ? *Actualités pharmaceutiques* Vol 52, Issue 528, September 2013, Pages 18-

Sohail, A., Mark, S., Turner, Allan, C., Thor, Bhash, Bh. (2011). Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impingement in aerosols method. *International Journal of Food Microbiology* 145 (2011) 162–168.

Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013). Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMedResearch International*, (2013), 1- 21.

(T)

Tailliez, P. (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitat, rôle physiologique et intérêt en Santé humaine. *Antibiotiques*. 6(1): 35-41.

(V)

Vandamme, T., Poncelet D., Subra-Paternault. (2007). Microencapsulation : des Sciences aux technologies, Tech et Doc, Paris.

(Z)

Zeng, Z.P., Jiang, J. G. (2011). Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. Food Hydrocolloids, 1–8.

Liste des Annexes

Annexe 1 : quelques exemples de composés encapsulés dans le domaine alimentaire.

Composés encapsulés	Intérêts de l'encapsulation
Acidesgras–Omégas3 (eicosapentaenoicacid Ethyl ester, huile de thon,huile de poisson, huile de microalgue)	-Masquer le goût -Améliorer la dispersion en milieu aqueux -Retarder et minimiser les dégradationsoxydatives -Permettre une libération contrôlée
Antimicrobiens (Huile d'arbre à thé, Allyl isothiocyanate, Huile d'ail)	-Permettre une libération prolongée -Diminuer l'évaporation -Réduire l'oxydation -Masquer l'odeur
Antioxydants (Huile d'ail, polyphénolsDe thym)	-Permettre une libération prolongée -Diminuer l'évaporation -Réduire l'oxydation -Masquer l'odeur
Arômes	-Transformer un liquide en solide -Protéger de l'oxydation et de l'évaporation -Permettre une libération contrôlée -Résister à la congélation
Caroténoïdes (Lutéine, Lycopène)	-Améliorer la stabilité envers l'oxygène, la lumière et la Température -Permettre une dispersion en milieu aqueux
Probiotiques	-Améliorer la viabilité au cours des procédés de fabrication Des produits alimentaires - Améliorer la survie dans le tractus gastro intestinal

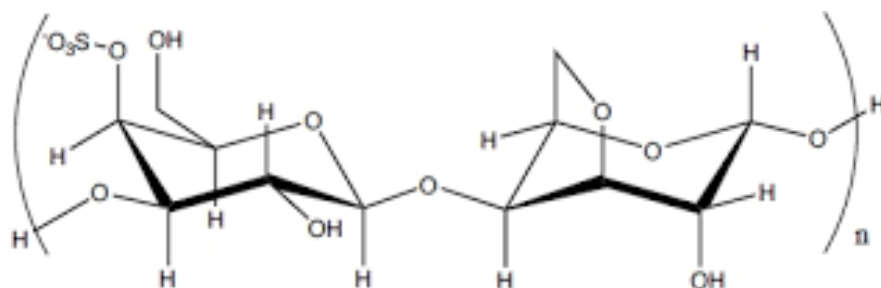
Annexe 2: application de l'encapsulation dans l'industrie

Domaine industriel	Exemples de composés encapsulés
Pharmacie et médical	Antibiotiques, contraceptifs, enzymes, vaccins
Alimentaire	Huiles essentielles, graisses, épices, arômes, vitamines, minéraux, colorants, enzymes, levures, micro organismes...
Agriculture	Herbicides, insecticides, engrais, répulsifs, hormones végétales...
Chimie	Catalyseurs, eau (plâtre et béton), inhibiteurs de corrosion, retardateurs d'incendie, colorants et pigments, agents UV protecteurs, parfums, huiles essentielles, agents lubrifiants...
Biotechnologie	Enzymes immobilisées, microorganismes, cellules vivantes, cellules artificielles, cultures tissulaires, composés nutritionnels...
Cosmétique	Retardateurs d'incendie, colorants et pigments, agents UV protecteurs, catalyseurs, enzymes
Textile	Agents décolorants, agents moussants, silicones, adoucissants, antistatiques

Annexe 3 : Principaux matériaux enrobant utilisés dans les différents procédés de la microencapsulation.

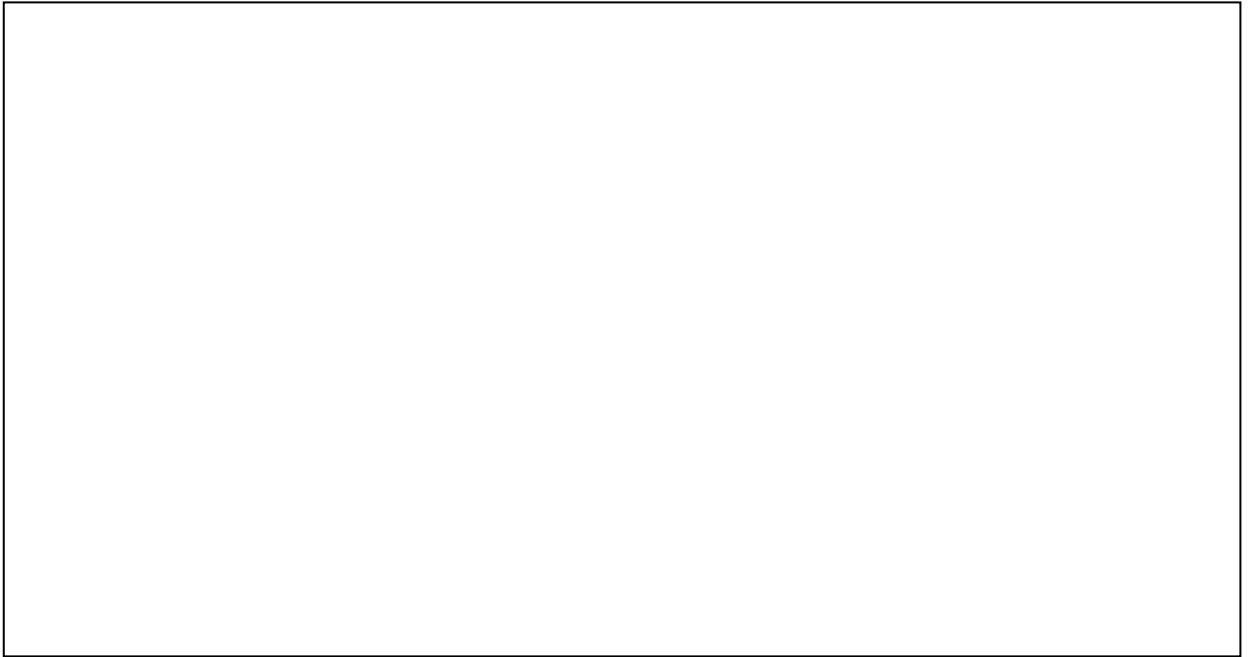
Principaux matériaux enrobant d'origine naturelle	Procédés mis-en œuvre	Exemples de domaines d'application
Alginate de sodium	Coacervation Complexe Prilling	Biomédicale : encapsulation des cellules Aromes Cosmétiques Parfums Phytoproducts
Chitosane	Coacervation complexe Prilling Spray drying Spray coating	Pharmacie Administration orale Libération gastrique Masquage de goût
Amidon	Spray-drying	Alimentaire : encapsulation d'arômes, d'huiles essentielles ou aromatiques, de vitamines et d'épices
Gélatine	Coacervation complexe Coacervation simple	Arômes Parfums Pharmacie Autocopiants

Annexe 4 : structure de k-carraghénane.

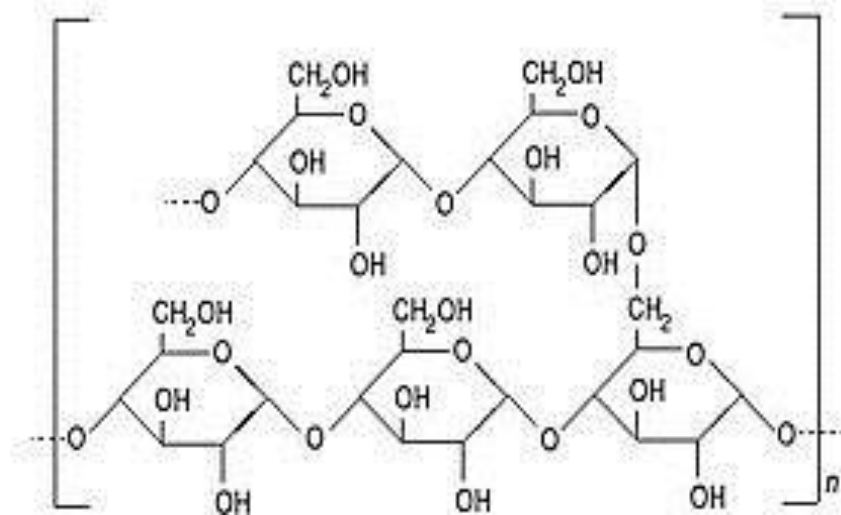


Carragénane κ

Annexe 5 : structure de la gélatine



Annexe 6 : Structure de l'amidon.



Annexe 7 : procédés de préparation des microcapsules



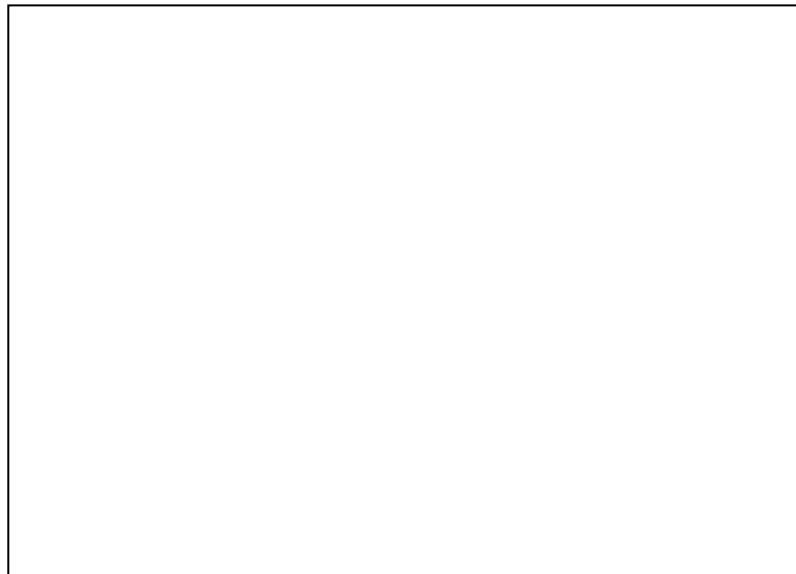
Annexe 8 : photographie des dispersions de microcapsules avec différents polymères.



Annexe 9 : culture de *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus* sur milieu MRS et M17 respectivement.



Annexe 10: photographie des microcapsules à base de caséine et amidon prise sous la loupe.



Résumé

Des microcapsules de (caséine / amidon) et (gélatine / carraghénane) ont été préparées par un complexe de coacervation, visant à protéger un mélange de souches probiotiques contre les conditions de stress gastro-intestinale. Six formulations de microcapsules contenant de la caséine, l'amidon et des probiotiques dans des rapports de concentration distincts ont été élaborées pour but d'étudier les rapports d'interaction entre les paramètres de la microencapsulation. La morphologie des microcapsules lyophilisées a été analysée par microscopie optique, L'activité de l'eau, la taille des particules, l'efficacité d'encapsulation, ont également été examinés. Une autre étude de la stabilité des probiotiques encapsulés a été réalisée en exposant des microcapsules obtenu à des conditions gastro- intestinales (température, PH et NaCl).L'enrobage de caséine et d'amidon a augmenté la survie des probiotiques dans cette environnement défavorable, l'efficacité d'encapsulation était élevée, environ 75%, par conséquent, il a été possible d'encapsuler efficacement ce mélange de souches probiotiques en utilisant ces deux types de polymères dans la technique de coacervation complexe.

Mots clés : probiotiques, microencapsulation, coacervation complexe, biopolymères.

Abstract

Microcapsules of (casein / starch) and (gelatin / carrageenan) have been prepared by a coacervation complex, in order to provide protection for a mixture of probiotic strains against gastrointestinal stress conditions. Six microcapsules formulations containing casein, starch and probiotics in separate concentration ratios were developed to study the interaction ratios between the parameters of microencapsulation. The morphology of the lyophilized microcapsules was analyzed by light microscopy. Water activity, particle size, encapsulation efficiency, were also examined. Another study of the stability of encapsulated probiotics was performed by exposing the obtained microcapsules to gastrointestinal conditions (temperature, PH and NaCl). The coating of casein and starch increased the survival of probiotics in this unfavorable environment, the encapsulation efficiency was high, about 75%, therefore, it was possible to effectively encapsulate this mixture of probiotic strains using these two types of polymer in the complex coacervation technique.

Keywords: probiotics, microencapsulation, complex coacervation, biopolymers.

