

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaia

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



Réf :.....

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

MASTER

Thème

***Encapsulation d'une souche probiotique dans
de la carraghénane et de l'alginate***

Présenté par M^{elles} :
REKKAM Kenza
ROUBACHE Amina

Soutenu le : 17 juillet 2022

Devant le jury composé de :

M^{me} TETILI Fatiha
M^{me}. BENDALI Farida
M^{me}. IDRES Nacera

MCB
Pr
MCB

Présidente
Promotrice
Examinatrice

Année universitaire : 2021 / 2022

REMERCIEMENTS :

En premier lieu nous tenons à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force, la patience, la santé, et la volonté d'achever et de réaliser ce modeste travail.

*Nous exprimons notre profonde gratitude à notre promotrice **Mme BENDALI Farida** Pour nous avoir accompagné durant ce projet, et de nous avoir prêté aide, conseils et attention. Merci de nous avoir guidées avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour notre travail.*

*Nos vifs remerciements s'adressent également à la présidente de jury **Dr. TETILI Fatiha** pour avoir accepté de présider cette honorable jury.*

*Nos gratitudes à **Dr. IDRES Nacera** en sa qualité d'examinatrice.*

Nos remerciements vont enfin à toutes les personnes qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail et on souhaite que cette recherche puisse être un support assez valorisant et profitable pour ceux qui auront à l'utiliser.

Dédicaces

Je remercie d'abord Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'accomplir ce modeste travail que je dédie avec un grand honneur,

*Aux **personnes les plus chères au monde**, ma source de bonheur, mes très chères Parents,*

***Mon Adorable Maman Fatiha**, la lumière de ma vie, qui épargné aucun effort pour me rendre heureuse, qui a toujours cru en moi et qui m'a encourager à avancer, tes prières était un grand secours pour mener ma vie à bien, ma vie ne serait pas pareil sans toi.*

***Mon Chère Papa Mourad**, je suis tellement fière d'avoir été élevée par un tel homme, tu as toujours fait tout ton possible pour qu'il ne me manque rien et pour me montrer le bon exemple, merci pour ton encouragement et ta disponibilité*

Aucune dédicace ne serrait être assez pour vous exprimer ce que vous méritez, je vous aime tellement, puisse dieu vous accorde une longue vie remplie de joie.

*A mon chère frère **Adel** et ma meilleure ma petite sœur **Wassila**, merci d'être là pour moi, je réalise vraiment ce que signifie avoir un frère et une sœur, je vous souhaite la réussite et le bonheur*

*A **ma chère Grand-mère** maternelle **Rezkia**, puisse dieu le tout puissant vous accorde la longue vie et la bonne santé*

*A la mémoire de **ma Grand-mère** paternelle **Ferroudja** et mes deux **Grands-pères Moussa et Ahmed**, qu'Allah les accueille dans son vaste paradis*

*A mes **chères tantes***

*A **ma chère binôme Mouna**, merci de partager avec moi le bon comme le mauvais tout au long de notre parcours, merci de m'encourager et de m'aider, je te souhaite un avenir lumineux plein de réussite et de bonheur*

*A toute **ma famille** petit et grands, à **mes amies**, a tous ceux qui ont partager avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail, a tout ceux qui ont contribuer à ma réussite de prêt ou de loin et à tous **ceux qui me sont chères**.*

Kenza

Dédicaces

*Je remercie tout d'abord, Dieu le tout puissant qui nous éclaire le bon chemin, merci **ALLAH** de m'avoir aidé, guidé et donner la volonté et le courage d'achever ce modeste travail que je dédie :*

*A la mémoire de mon très cher papa **Moustapha**, mon exemple éternel celui qui s'est toujours sacrifié pour notre bonheur et réussite, que ce travail soit un hommage pour son chère àme, preuve de reconnaissance et d'amour, que le paradis soit sa demeure éternelle.*

*A la plus précieuse des mamans et ma raison de vivre **Wided**, la femme la plus forte, courageuse, et formidable que je connaisse. Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point vous remercier comme il se doit, votre affection me couvre, votre bienveillance me guide, votre présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*A ma très chère grande mère **Arbia** pour son amour, et sa tendresse.*

*A ma précieuse, adorable et magnifique sœur **Saadia**, toi qui m'as tant aimé merci pour ta compréhension, ta présence et ton amour inconditionnel.*

*Aux meilleures tantes du monde **Fatiha, Nabila, Malika, Fouzia et Samira** qui m'ont soutenu et répandu présentes dans les moments difficiles avec leurs amour et encouragements.*

*A mes chers frères **Massi, Sami, Mahdi** et notre source de joie **Naceur**, qu'ils trouvent l'expression de mes grands attachements et le témoignage de mes immenses affections, en leurs souhaitant la réussite et le bonheur.*

*A ma chère amie et binôme **Kenza** pour ses encouragements et pour tous les bons moments qu'on a vécu ensemble en réalisant ce modeste travail et souvenirs durant notre cursus.*

A toutes les personnes qui m'ont encouragée et aidée tout au long de mes études. A tous ceux qui me sont chers.

M^{elle} ROUBACHE Amina M.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

CaCl₂: Chlorure de calcium

GRAS: Generally Recognized As Safe

HCL: Acide chlorhydrique

KCL : Chlorure de potassium

MRS : de Man Rogosa et Sharpe

m/v : masse/volume

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONU : Organisation des Nations Unies

PBS : Phosphate Buffered Saline

UFC : Unité formant colonie

WHO : World health organisation

Liste des figures

Figure 1. Principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.....6

Figure 2. Procédés d'encapsulation des microorganismes par les techniques d'extrusion et d'émulsification..... 14

Figure 3. Monomères composant la chaîne alginate..... 16

Figure 4. Représentation de la structure chimique du carraghénane- λ 17

Figure 5. Aspect des billes de la souche *Lactobacillus Plantarum* dans différentes matrices.....29

Liste des tableaux

Tableau I. Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques.....3

Tableau II. Corrélation entre les technologies d'encapsulation et la taille des capsules, matériaux d'encapsulation actuels, avantages et désavantages.....11

Tableau III. Essais de formation de capsules avec les différentes solutions des deux polymères et des deux solutions durcissantes.....21

Tableau IV. Aspect des capsules formées en utilisant l'alginate avec la solution de KCl ou CaCl₂ et à différentes concentrations.....25

Tableau V. Aspect des capsules formées en utilisant Le carraghénane avec la solution de KCl ou CaCl₂ et à différentes concentrations.....26

Tableau VI. Rendement d'encapsulation de la souche probiotique.....29

Tableau VII. Résultats de la souche probiotique aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal.....31

Tableau VIII. Résultats de la résistance de la souche probiotique encapsulée aux valeurs de pH simulées du tractus gastro-intestinal.....34

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Partie bibliographique

I. Probiotiques

1. Définition des probiotiques	3
2. Critères de sélection des probiotiques	3
2.1. Identité de la souche.....	4
2.2 .Origine et innocuité de la souche.....	4
2.3. Tolérance de la souche.....	4
2.4. Adhésion de la souche.....	5
2.5. Qualité technologique.....	5
3. Rôle des probiotiques.....	5

II. Encapsulation

1. Historique et définition de l'encapsulation.....	7
2. Intérêt de l'encapsulation.....	7
3. Méthodes d'encapsulation.....	8
3.1. Séchage par pulvérisation (spray drying).....	8
3.2. Séchage par réfrigération ou congélation (spray chilling/ congealing).....	8
3.3. Séchage sur lit fluidisé (fluidized-bed) et enrobage (coating).....	9
3.4. Inclusion.....	9
2.5. Coacervation.....	9
2.6. Liposomes.....	9
2.7. Co-cristallisation.....	9
4 Matériaux d'encapsulation.....	10

III-Encapsulation des probiotiques

1. Méthodes les plus employées.....	13
1.1. Extrusion.....	13
1.2. Emulsion.....	13
2. Contraintes de l'encapsulation des probiotiques.....	15
2.1. Les capsules d'alginate.....	15
2.2. Les capsule de carraghénane.....	16
2.3. Inconvénients de l'encapsulation.....	17
3. Exemples d'applications.....	17

Partie pratique

1. Matériel

1.1. Souche utilisée.....	19
1.2. Milieux de culture et polymères utilisés.....	19
1.2.1. Milieu de culture.....	19
1.2.2. Polymères.....	19

2. Méthodes

2.1. Revivification de la souche et standardisation de l'<i>inoculum</i>.....	19
2.2. Préparation des solutions d'enrobage : Alginate et carraghénane.....	20
2.2.1. Préparation des solutions d'Alginate.....	20
2.2.2. Préparation des solutions de Carraghénane.....	20
2.3. Préparation des solutions durcissantes : CaCl₂ et KCl.....	20
2.3.1. Préparation de la solution de Chlorure de calcium (CaCl ₂).....	21
2.3.2. Préparation de la solution de Chlorure de potassium (KCl).....	21
2.4. Essais de formation des capsules d'alginate et de carraghénane.....	21
2.5. Encapsulation de la souche de <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>.....	21
2.5.1. Dénombrement de la souche avant encapsulation.....	21
2.5.2. Encapsulation de la souche dans le polymère d'alginate par la technique d'extrusion..	22
2.5.3. Encapsulation de la souche dans le polymère de carraghénane par la technique d'extrusion.....	22
2.5.4. Dénombrement de la souche après encapsulation.....	22
2.6. Résistance aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal.....	23
2.6.1. Résistance des cellules aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal.....	23
2.6.2. Résistance des capsules aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal....	23

Résultats et discussion

1. Résultats de l'encapsulation.....	25
1.1. Formation des capsules.....	25
1.2. Rendement de l'encapsulation de la souche de <i>Lb. plantarum</i>	28

2. Résistance des capsules aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal.....	30
2.1. Résistance de la souche probiotique libre aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal.....	30
2.2. Résistance des capsules libre aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal.....	33
2.3. Libération contrôlée de la souche dans l'intestin.....	35

Introduction

Introduction

Des études récentes suggèrent le rôle considérable joué par le microbiote intestinal dans l'apparition de différentes maladies, qui sont souvent accompagnées d'un déséquilibre de la flore intestinale, c'est le cas pour le diabète, l'obésité et les syndromes inflammatoires intestinaux (**Tremaroli et Bäckhed, 2012 ; De Vadder et al., 2014 ; Woting et Blant, 2016**).

Pour rétablir l'équilibre du microbiote, l'apport de probiotiques par voie orale est une méthode de choix (**Fernanda, 2017**) et les deux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* sont les probiotiques les plus importants (**Anal et Singh, 2007**). Des efforts très remarquables ont été investis dans le but de comprendre et de prouver les effets bénéfiques de l'utilisation des bactéries probiotiques pour traiter divers problèmes de santé publique qui s'étendent des maladies gastriques jusqu'à la dermatite; Les formulations de probiotiques développées ont été destinées aux traitements par voie orale ou voie topique (**Lannitti et Palmieri, 2010**).

Cependant, les facteurs environnementaux, notamment un faible pH et une température élevée (**Fang et al., 2017**) ainsi que les conditions difficiles du passage gastro-intestinal, c'est-à-dire, le pH acide, les enzymes digestives et les sels biliaires (**Fernanda, 2017**) constituent des obstacles empêchant les probiotiques incorporés dans les boissons et les aliments d'atteindre l'intestin. Dans ce cas la micro-encapsulation des cellules est nécessaire pour maintenir leur viabilité (**Fernanda, 2017**).

L'engouement pour l'encapsulation des probiotiques remonte aux années 1980. En effet, les premiers travaux publiés portaient sur les ferments lactiques du yaourt, à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Ces espèces lactiques ont été trompées dans des hydrogels d'alginate de calcium (**Prevost et al., 1985**).

Les études et les recherches dans le domaine de l'encapsulation ce sont, le plus souvent, concentrées sur une variété d'ingrédients bioactifs de natures diverses par exemple les enzymes, les vitamines, principes actifs médicamenteux, les cellules dérivées du pancréas ou du foie, etc. Cependant, peu d'études ont été consacrées à la protection des probiotiques par encapsulation, à la libération des probiotiques encapsulés dans des modèles mimant le système digestif et la stabilité des systèmes de protection mis en place (**Chandramouli et al., 2004**).

L'encapsulation peut être réalisée par diverses méthodes et techniques qui fournissent le piégeage, l'isolement et la protection ou la libération contrôlée des matériaux sensibles ou bien des principes actifs (composés volatils) à travers la matière environnante. La technique d'encapsulation est choisie en fonction de l'utilisation prévue pour la formulation finale, qui peut varier en fonction de la forme, de la taille ou même de la nature de la capsule (Abdallaoui, 2018).

Cette étude a pour objectif l'évaluation de l'efficacité de deux polymères « alginate et carraghénane » dans l'encapsulation d'une souche probiotique.

Le mémoire sera divisé en deux parties, une synthèse bibliographique relative au sujet abordant la définition et le rôle des probiotiques et une partie pratique relatant les méthodes utilisées pour l'encapsulation de la souche et les résultats obtenus. Enfin, les conclusions auxquelles le travail a abouti ainsi que les perspectives dégagées seront énumérées.

*Partie
bibliographique*

1. Définition des probiotiques

Le terme probiotique vient des deux mots grecs « pro » et « bios » qui signifient littéralement « en faveur de la vie » contrairement au terme antibiotique: « contre la vie » (Gournier-Château *et al.*, 1994). Selon la définition approuvée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations Unies (ONU), les probiotiques sont « des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, procurent des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte » (FAO/WHO, 2002).

2. Critères de sélection des probiotiques

Pour satisfaire à la définition de « probiotique », la sélection de nouvelles souches doit tenir compte d'un certain nombre d'éléments relatifs à la survie, la colonisation de l'hôte et leurs avantages pour sa santé et aux aspects technologiques (Ravi *et al.*, 2014). Plusieurs critères majeurs de sélection *in vivo* et *in vitro* ont été établis et maintenus (Tableau I).

Tableau I. Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques (Alegre, 2009)

<p style="text-align: center;">Critères de sécurité</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Historique de non pathogénicité (GRAS) • Souche d'origine humaine • Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques • Souche déposée dans une collection de cultures internationale • Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques
<p style="text-align: center;">Critères Fonctionnels</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tolérance à l'acidité gastrique • Tolérance à la bile • Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes • Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et /ou au mucus • Stimulation du système immunitaire
<p style="text-align: center;">Critères Technologiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini • Conservation des propriétés probiotiques après production.

2.1. Identité de la souche

Parmi les critères liés à la sécurité, l'identification, la caractérisation et la taxonomie de la souche est une étape très importante dans l'établissement de nouvelles souches probiotiques (**Holzappel et al.,2001**). Toute souche doit être identifiée par des techniques moléculaires fiables et crédibles à une nomenclature adaptée (**FAO/WHO, 2002 ; Gueimonde et Salminen, 2006**). L'hybridation ADN-ADN est une méthode de référence pour l'identification de l'espèce d'une souche, mais cette méthode est longue et nécessite une large collection de souches comme références. Le séquençage de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 16S est considéré aussi une technique pertinente avec combinaison à des tests phénotypiques pour une meilleure confirmation (**FAO/WHO, 2002**).

2.2. Origine et innocuité de la souche

L'interaction spécifique de la souche bactérienne avec l'hôte est meilleure lorsqu'elles proviennent du même habitat, pour cette raison l'origine de la souche est importante (**Alvarez-Olmos et Oberhelman, 2001**). Les souches probiotiques doivent être inoffensives pour l'hôte. Pour cela les souches potentiellement probiotiques doivent être évaluées afin d'éviter les effets secondaires comme: les infections systémiques, l'activité métabolique nuisible, la stimulation immunitaire excessive et le transfert de gènes (exemple gènes de résistance aux antibiotiques) (**FAO/WHO, 2002**).

2.3. Tolérance de la souche

Pour assurer un aspect fonctionnel optimal, les souches probiotiques doivent survivre jusqu'à leur site d'action. Néanmoins, il existe une controverse concernant ce critère par rapport à l'effet sur le système immunitaire. Il est bien montré que même les cellules bactériennes mortes ont une aptitude à apporter des effets bénéfiques physiologiques (**Sanders, 2003**), mais la définition actuelle des probiotiques prend en considération le paramètre de viabilité (**FAO/WHO, 2002**). Les probiotiques doivent résister en premier lieu à l'environnement acide de l'estomac (un pH compris entre 2 et 3,4) et à la bile sécrétée dans le duodénum avant d'atteindre par la suite le tractus intestinal (**Dunne et al., 2001 ; Gueimonde et Salminen, 2006**). Le degré de tolérance à ces conditions et de survie des probiotiques

ingérés dans les différentes parties du tractus gastro-intestinal varie d'une souche à une autre (**Havenaar et Huis in't Veld, 1992**).

2.4. Adhésion de la souche

La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale fait également partie des propriétés de base que les souches probiotiques doivent posséder (**Saarela et al., 2000 ; Tuomola et al., 2001**). Cette adhésion met en contact direct les bactéries et les cellules épithéliales comme elle permet d'augmenter le temps de rétention des probiotiques dans l'intestin (**Gueimonde et Salminen, 2006**). Par conséquent, les probiotiques avec un pourcentage élevé d'adhérence peuvent stimuler le système immunitaire et empêcher les agents pathogènes de se greffer sur les cellules épithéliales intestinales par un mécanisme compétitif (**Saarela et al., 2000**).

2.5. Qualité technologique

Du point de vue technologique, les souches probiotiques doivent posséder certaines qualités permettant leur culture facile à des densités cellulaires élevées, tout en conservant leurs propriétés biologiques et leur stabilité lors de la production et du stockage (**Champagne et al., 2005**). Ce qui fait que de nouvelles technologies sont disponibles pour produire des souches probiotiques à haute viabilité et fonctionnalité (**Lacroix et Yildirim, 2007**).

3. Rôle des probiotiques

Le mécanisme d'action des probiotiques repose sur le renforcement de la réponse immunitaire (spécifique et non spécifique) de l'hôte, la compétition pour les sites de liaison et la production de substances antimicrobiennes à l'égard des agents pathogènes (**Singh et al., 2013**). La figure 01 résume les principaux effets bénéfiques rapportés.

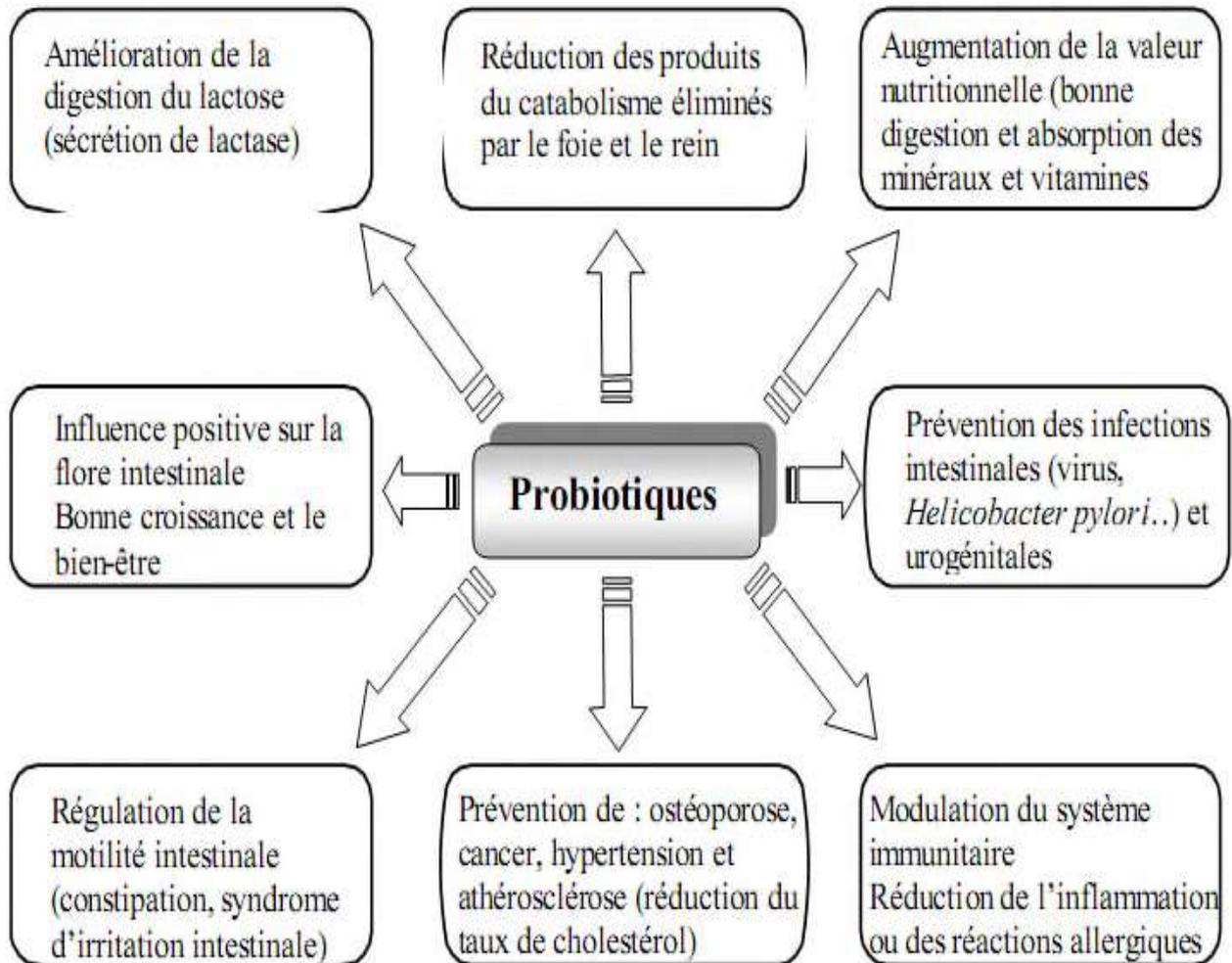


Figure 1. Principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Amrouche, 2005).

1. Historique et définition de l'encapsulation

C'est en 1931 que deux chercheurs chimistes (Bungenburg de Jong et Kaas) découvrirent la coacervation, qui est un phénomène physique qui permet de créer des systèmes colloïdaux, ce qui a conduit aux premiers tests d'encapsulation (**Boh, 2007**). L'encapsulation se définit comme le processus par lequel des substances liquides, solides ou gazeuses sont piégées dans des microcapsules qui libèrent leur contenu d'une manière contrôlée sur une période de temps prolongée (**Champagne et Fustier, 2007**).

2. Intérêt de l'encapsulation

L'intérêt de l'encapsulation est différent d'un domaine à un autre (alimentaire, pharmaceutique, cosmétique...), mais en général l'encapsulation permet de :

✓ Immobiliser ou isoler

L'immobilisation est fréquemment utilisée pour les cellules microbiennes (**Zhu, 2007**). Le confinement de ces cellules au sein d'une membrane semi-perméable est réalisé en les isolant physiquement de l'environnement extérieur, tout en maintenant un environnement interne adapté à leur croissance et à leur métabolisme pour une activité optimale (**Poe et al., 2006**).

✓ Protéger

Divers composés actifs sont fragiles et doivent être protégés du milieu extérieur. A cet effet l'encapsulation leur permet de s'affranchir des contraintes de l'application, c'est l'exemple des vitamines E et C qui sont souvent encapsulées car elles sont sensibles à la dégradation par la lumière, la chaleur ou l'oxygène (**Dubernet et al., 1991 ; Stevanović et al., 2007**). Comme il est possible d'utiliser cette activité en domaine médical, pour l'encapsulation des bactéries probiotiques par exemple (**Chávarri et al., 2010**).

✓ Libérer d'une manière contrôlée

Généralement le but de l'encapsulation est de minimiser les pertes en assurant une libération contrôlée du principe actif encapsulé. Un des exemples est l'industrie textile du coton qui utilise des insecticides encapsulés, comme la citronnelle et les huiles essentielles (**Specos et al., 2010**).

✓ **Structurer**

L'encapsulation des composés liquides dans des microparticules solides favorise l'obtention de modification de l'état physique du composé actif qui passe d'une forme liquide à une forme solide (Fuchs et al., 2006).

3. Méthodes d'encapsulation

L'encapsulation de principes actifs dans des matériaux de support peut être réalisée par plusieurs méthodes (Digambar et al., 2017) parmi lesquelles on a :

3.1. Séchage par pulvérisation (spray drying)

Le séchage par pulvérisation sert de technique de micro-encapsulation lorsqu'une matière active est dissoute ou suspendue dans une solution fondue ou polymère et se retrouve piégée dans la particule séchée. Le principal avantage de cette technique est la possibilité de manipuler des matériaux labiles en raison du court temps de contact dans le séchoir (Vidhyalakshmi et al., 2009). Des bactéries probiotiques microencapsulées par le processus de séchage par pulvérisation en utilisant la gomme arabique et la β -cyclodextrine, comme matériaux d'enrobage, ont montré une tolérance remarquable à la chaleur (environ 80°C) et aux conditions du tractus gastro-intestinal (Arslan-Tontul et Erbas, 2017).

3.2. Séchage par réfrigération ou congélation (spray chilling/ congealing)

C'est une méthode peu coûteuse, simple et polyvalente pour produire des microparticules sans utiliser de solvants organiques ou aqueux (Bertoni et al., 2018). Les particules issues de la pulvérisation réfrigérante sont de bons vecteurs pour les probiotiques, une viabilité allant jusqu'à 90 jours en un environnement salin a été observée (Bampi et al., 2016).

3.3. Séchage sur lit fluidisé (fluidized-bed) et enrobage (coating)

Le processus d'enrobage est largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique, il fait partie de l'un des procédés industriels les plus anciens pour former de petits granulés ou comprimés enrobés. Les particules sont agitées dans un dispositif, tandis que le matériau d'enrobage est appliqué lentement (**Vidhyalakshmi et al., 2009**).

3.4. Inclusion

C'est la seule technique d'encapsulation réalisée au niveau moléculaire, l'inclusion est réalisée par des cyclodextrines, généralement des β -cyclodextrines (**Risch, 1995**).

3.5. Coacervation

Cette technique est fréquemment considérée comme une méthode originale et véritable dans le processus d'encapsulation (**Risch, 1995**). La micro-encapsulation par coacervation comprend la formation de trois phases non miscibles ; une phase de fabrication liquide, une phase de matériau de noyau et une phase de matériau de revêtement. Des techniques thermiques, de réticulation ou de désolation sont appliquées pour rendre le revêtement rigide et former les microcapsules (**Suganya et al., 2017**).

3.6. Liposomes

C'est une technique appliquée en industrie pharmaceutique en premier lieu pour étudier la production de médicaments. Les liposomes sont constitués d'une phase aqueuse entourée d'une membrane basale en phospholipides, lorsque ses derniers sont dispersés au milieu aqueux, les liposomes se forment (**Risch, 1995**).

3.7. Co-cristallisation

C'est une méthode d'encapsulation simple et économique, qui peut faire intervenir par exemple l'inclusion du composé à l'intérieur de cristaux de saccharose (**Jackson et Lee, 1991**).

4. Matériaux d'encapsulation

Il existe un très vaste choix en termes de matériaux d'encapsulation, les plantes et les algues comme matériaux organiques et naturels, les polyacrylamides comme matériel synthétique et les matériaux inorganiques tels que le dioxyde de silicium (SiO₂).

Le procédé d'encapsulation pose de grands défis, cela est dû à la matrice d'encapsulation qui doit être à la fois biocompatible et assure la survie cellulaire en fournissant les conditions nécessaires : pH, force ionique et douces températures. Ce qui fait que les hydrogels naturels sont intéressants (**Fernanda, 2017**).

La sélection des différents types de matériaux d'encapsulation dépend généralement des propriétés fonctionnelles des microcapsules et du procédé d'enrobage utilisé. Les matériaux couramment utilisés pour l'encapsulation des micro-organismes probiotiques comprennent la k-carraghénane, l'alginate, l'acétate phtalate de cellulose, l'amidon modifié, le chitosan, le gellan, le xanthane, la gomme arabique et les protéines animales (lait, gélatine) (**Iravani et al., 2014**). Les tableaux IIa et IIb illustrent les matériaux d'encapsulation cellulaire les plus couramment utilisés et ils sont corrélés avec les techniques d'encapsulation décrites précédemment.

Tableau IIa. Corrélation entre les technologies d'encapsulation et la taille des capsules, matériaux d'encapsulation actuels, avantages et désavantages (Haffner, 2017)

Technique	Taille habituelle des capsules	Agents d'encapsulation les plus courants	Avantages	Contraintes et désavantages
Séchage par pulvérisation	5 à 150 µm	Inuline, gomme d'acacia, gomme de caroube, amidon, protéines de soja, protéines de lactosérum, lait écrémé, chitosane, alginate	<ol style="list-style-type: none"> 1. Production de masse 2. Processus continu 3. Monodispersité du matériau 4. Bien établi dans l'industrie alimentaire pour d'autres applications 5. Peu coûteux 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Perte de viabilité cellulaire due aux températures élevées 2. Principalement utilisé avec des suspensions aqueuses, c'est-à-dire que le matériau de la coquille doit être soluble dans l'eau.
Spray- cooling	20 à 200 µm	Beurre de cacao, Huile de palme (75% gras), Huile de palmiste (80% gras)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Production de masse 2. Processus continu 3. Technique d'encapsulation la moins coûteuse 4. Configuration à températures douces 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Charge plus faible (10-20%) par rapport au séchage par pulvérisation (5-50%) 2. L'ingrédient encapsulé peut être à la surface et en contact avec l'environnement. 3. Difficulté à retarder la libération de l'ingrédient hydrosoluble pendant plus de 30 minutes.
Lyophilisation		Amidon, protéine de soja, caséine, protéines de lactosérum, lait écrémé.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Excellent matériau séché final convenant à la plupart des applications alimentaires 2. Convient aux matières sensibles comme les probiotiques 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Des coûts élevés 2. Dommages cellulaires avec formation éventuelle de cristaux si l'opération n'est pas effectuée correctement 3. Besoin éventuel de cryoprotecteurs

Tableau IIb. Corrélation entre les technologies d'encapsulation et la taille des capsules, matériaux d'encapsulation actuels, avantages et désavantages (**Haffner, 2017**)

Spray- Coating	5µm à 1 mm	Gomme-laque, graisse	<ol style="list-style-type: none"> 1. Contrôle de la libération par l'ajout de différents revêtements 2. Augmentation de la stabilité au stockage 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Peut introduire des forces qui peuvent endommager les cellules 2. Bien que la température soit plus basse, l'exposition peut être plus longue, tout comme l'exposition à l'oxygène.
Emulsification	200nm à 1 mm	Inuline, κ-carraghénane, alginate	<ol style="list-style-type: none"> 1. Technique facile 2. Taux de survie habituel des bactéries élevé 	<ol style="list-style-type: none"> 1. coût élevé de la mise à l'échelle 2. polydispersité du matériau 3. variation de la forme du matériau 4. Les forces de cisaillement prolongées peuvent causer des dommages aux cellules
Liposomes	Quelquesnm à quelques µm	Phospholipides	<ol style="list-style-type: none"> 1. Améliorer les problèmes de goût (par ex. encapsulation de la saveur) 2. Fournir une bonne protection aux agents sensibles 3. Peut transporter des molécules hydrophobes et hydrophiles dans la même cargaison. 4. Muco-adhésion 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Technique la plus coûteuse et la plus complexe parmi celles décrites dans cette section. 2. Elle utilise des solvants organiques 3. Les formulations sont conservées en solution aqueuse de dilution 4. Problèmes de stabilité à température élevée et ambiante ainsi qu'à faible pH

1. Méthodes les plus employées

1.1. Extrusion

C'est la méthode la plus ancienne, simple et la moins coûteuse, le procédé le plus courant dans la production des capsules hydrocolloïdes avec des opérations douces qui minimisent la liaison cellulaire et la viabilité des cellules probiotiques (**Mortazavian et al., 2007**). Cette technique permet une rétention d'un nombre élevé de cellules microbiennes (**Chandramouli et al., 2004**). La micro-encapsulation par extrusion consiste à lancer une émulsion au niveau du noyau et du matériel d'enrobage (**Jackson et Lee, 1991**).

1.2. Emulsion

Cette technique a montré une réussite remarquable en micro-encapsulation des bactéries lactiques, elle peut être mise facilement à l'échelle et au diamètre des billes produites. D'un autre côté elle est plus coûteuse en la comparant à la technique d'extrusion à cause de la nécessité d'utilisation d'une huile végétale (**Mortazavian et al., 2007**).

C'est une technique chimique adaptée dans l'encapsulation des cellules vivantes qui utilise les hydrocolloïdes (carraghénane, pectine et alginate) en tant que matériaux d'enrobage, la viscosité, la concentration et la vitesse d'agitation de la solution hydrocolloïde régule le diamètre des microbilles (**Kavitake et al., 2017**).

La figure 2 illustre les deux techniques d'encapsulation les plus utilisées, à savoir l'extrusion et l'émulsion.

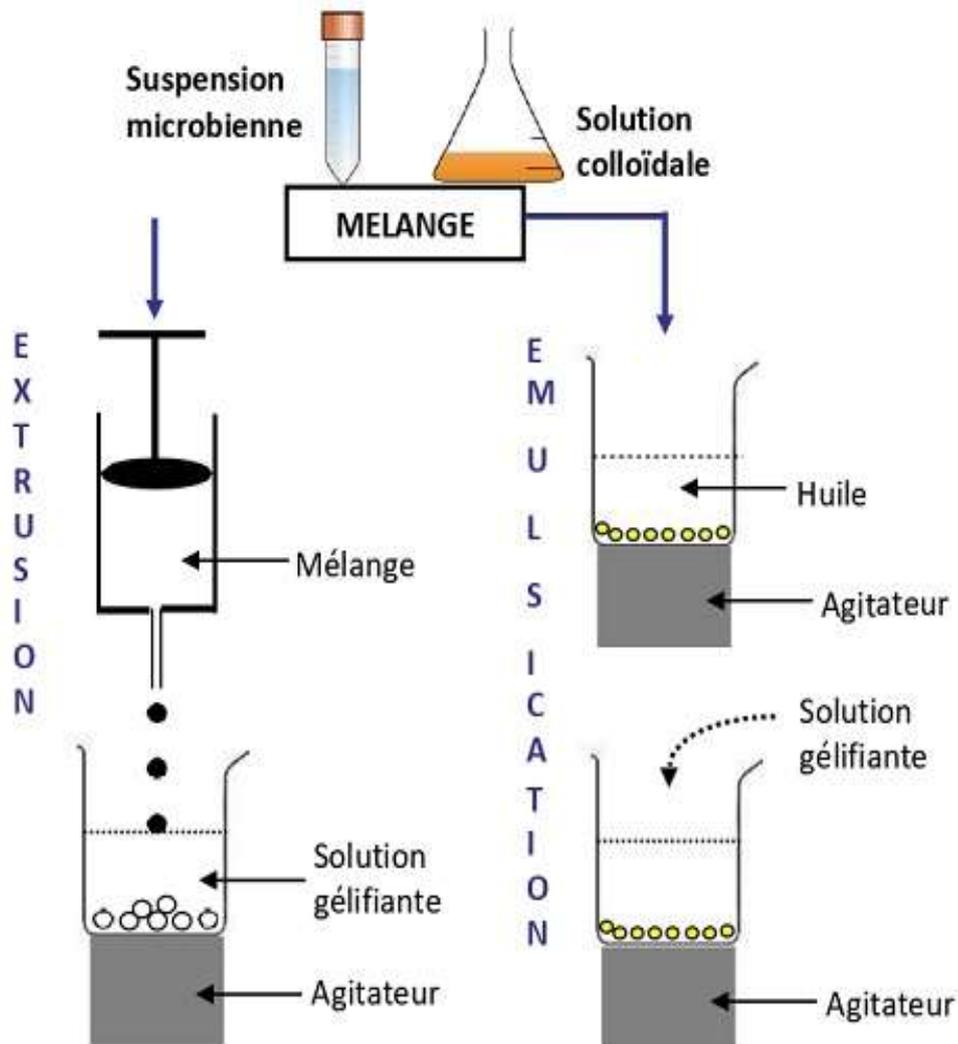


Figure 2. Procédés d'encapsulation des microorganismes par les techniques d'extrusion et d'émulsification (adapté de Krasaekoopt et al., 2003)

2. Contraintes de l'encapsulation des probiotiques

Dans le cas d'un procédé d'encapsulation des probiotiques, il faut tenir compte de la fragilité et de la nature sensible des cellules vivantes. Par conséquent, le choix de la méthode et des matériaux d'encapsulation est important comme aussi l'utilisation des solvants non aqueux est à éviter. La sélection des biopolymères doit satisfaire certaines propriétés. L'objectif majeur de l'encapsulation est la protection des probiotiques, ce qui fait que la matrice de protection doit être non toxique, inerte et compatible avec la structure de la cellule vivante. En second lieu, la matrice doit posséder la propriété d'assurer au probiotique la résistance lors du passage par la barrière de l'estomac. En dernier, il est nécessaire que la matrice soit biodégradable. L'acide acétique par exemple est utilisé comme agent d'enrobage des probiotiques comme il est souvent utilisé pour la dissolution du chitosane, puisque ce polymère se dissout en milieu acide (**Krasaekoopt et al., 2004**).

L'efficacité de l'encapsulation s'illustre dans le maintien de la survie dans les conditions du transit digestif des cellules encapsulées dans l'aliment véhicule. A cet effet, le polymère d'encapsulation doit posséder des propriétés chimiques permettant une décomposition après passage de l'intestin grêle, ce qui n'est pas toujours réalisable. En outre, les sécrétions pancréatiques qu'ils subissent dans l'intestin grêle peuvent altérer la viabilité des cellules probiotiques (**Rahali, 2014**).

2.1. Les capsules d'alginate

L'alginate est le biopolymère le plus utilisé dans l'encapsulation des probiotiques vu ses propriétés intéressantes : Sa composition simple, la non-toxicité, facilité de sa biodégradabilité, et biocompatibilité, son coût faible et surtout sa sensibilité à une large gamme du pH [1-8] (**Praepanitchai et al., 2019**). C'est un polysaccharide naturel extrait de différentes espèces d'algues, il est composé d'acide β -D- mannuronique et d'acide α -L- guluronique (figure 3) (**Vincent, 2010 ; Burgain et al., 2011**). Sa chaîne polymérique varie en distribution de séquences et en quantité en fonction de la source de l'alginate (**Burgain et al., 2011**).

L'utilisation de l'alginate est limitée à cause de la stabilité physique faible en présence d'antigels (**Mortazavian et al., 2007**).



Figure 3. Monomères composant la chaîne alginate (Vincent, 2010)

Il est recommandé d'utiliser des capsules d'alginate dans des milieux à base de lait comme les crèmes liquides et les yaourts, ceci en raison que les perles de gel peuvent maintenir leurs structures dans ces milieux, du fait de la disponibilité d'ions de sodium qui peuvent réduire la fuite des cellules à partir de la structure des perles de gel. D'autre part, les environnements avec forte acidité et les agents chélateurs sont déconseillés pour ce type de capsules (Hansen et al., 2002).

Parmi les inconvénients attribués à l'utilisation des alginates leur sensibilité aux environnements acides (Mortazavian et al., 2008). Il a également été rapporté que les billes sont poreuses et cela présente un désavantage pour la protection des cellules de leur environnement (Gouin, 2004). De même, les probiotiques à simple enrobage d'alginate ont tendance à être sensibles et perdre leur viabilité (Chávarri et al., 2010).

2.2. Les capsules de carraghénane

Le carraghénane est un polysaccharide préparé par extraction alcaline d'algues rouges (*Rhodophyceae*), principalement des genres *Chondrus*, *Eucheuma*, *Gigartina* et *Iridaea* (Campo et al., 2009).

En raison de leurs propriétés gélifiantes, épaississantes et stabilisantes, les carraghénanes sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire. Principalement, leur application concerne les produits laitiers et carnés puisque ils se caractérisent par un degré élevé de liaison aux protéines alimentaires. Il existe trois principales variétés de carraghénanes, qui diffèrent par leur degré de sulfatation. Le kappa- carraghénane a un groupe sulfate par disaccharide. L'Iota-carraghénane contient deux sulfates par disaccharide. Le λ - carraghénane contient trois sulfates par disaccharide (Benabid et al., 2016).

La structure du λ -carraghénane est donnée en exemple sur la figure 4

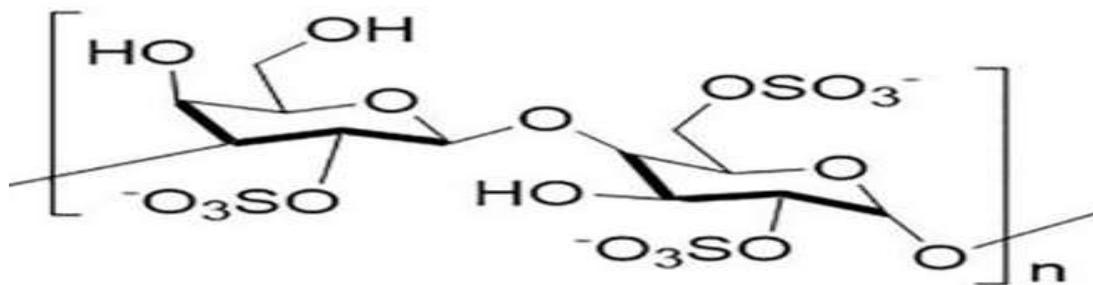


Figure 4. Représentation de la structure chimique du carraghénane- λ (Chopde *et al.*, 2014).

Pour l'encapsulation des probiotiques par l'une des méthodes (extrusion ou émulsion), le polymère de carraghénane est mélangé avec les cellules microbiennes à une température de 40°C à 50°C suivie d'un refroidissement à température ambiante pour assurer la gélification des particules formées (Digambar *et al.*, 2017).

L'encapsulation des cellules probiotiques dans les billes de κ -carraghénane maintient un état de viabilité pour ces bactéries (Dinakar et Mistry, 1994), mais les gels produits sont fragiles et ne sont pas en mesure de résister aux conditions du transit gastro-intestinal (Chen et Chen, 2007).

2.3. Inconvénients de l'encapsulation

Le stockage à long terme présente divers stress pour les bactéries lactiques micro-encapsulées comme la chaleur, la famine, l'oxydation ou l'osmose (Papadimitriou *et al.*, 2016). En cas de l'application des bactéries encapsulées dans des procédés biotechnologiques, ce stress a un effet direct sur elles d'une manière à les pousser à réduire la synthèse d'ADN ce qui entraîne la modification de leur état physiologique et par conséquent, elles peuvent perdre certaines de leurs fonctionnalités (Weimer, 2011).

3. Exemples d'applications

Il a été rapporté que *Lactobacillus casei* NCDC 298 micro-encapsulé dans des billes d'alginate a montré un certain taux de survie plus élevé que celui des cellules libres à un pH faible de (1,5), sous traitement thermique d'environ 55, 60 et 65°C et une concentration élevée de sels biliaries (Mandal *et al.*, 2006).

Les cellules de *Lactobacillus acidophilus* non encapsulée subissent facilement une mortalité dans des conditions environnementales désagréables, telles qu'un faible pH gastrique et des températures élevées pendant la pasteurisation, par rapport aux perles d'hydrogel comprenant un échantillon d'isolat de protéine et d'alginate (**Fang et al., 2017**). *Lactobacillus reuteri* DSM17938 encapsulée dans des billes de chitosane-alginate a réussi à sauvegarder ses propriétés fonctionnelles comme elle a montré une meilleure résistance aux conditions de stress rencontrées dans le traitement des aliments (**De Prisco et al., 2015**).

De même, l'encapsulation de *Lb. plantarum* dans un concentré de jus de mangue sous le processus de pasteurisation a montré une bonne tolérance aux conditions thermiques (72°C pendant 90 s). Des perles d'hydrogel à base d'alginate et de protéines de yaourt ont montré un résultat de résistance similaire (**Fang et al., 2017**).

Partie pratique

1. Matériel

1.1. Souche utilisée

Une souche de *Lactiplantibacillus plantarum* a été utilisée dans cette étude. Il s'agit d'une souche de la collection des souches microbiennes du laboratoire de Microbiologie Appliquée. Elle a été isolée de figues de barbarie (**Barache et al., 2020**) identifiée par spectrométrie MALDI-TOF et caractérisée quant à ses propriétés probiotiques.

1.2. Milieux de culture et polymères utilisés

1.2.1. Milieu de culture

- Gélose MRS (de Man, Rogosa et Sharpe ; Sigma-Aldrich, Allemagne)
- Bouillon MRS (Conda-Prondanisa, Espagne)

1.2.2. Polymères

- Polymère de carraghénane de type iota (Symbiosis, Chili).
- Polymère d'alginate de sodium (Symbiosis, Chili).

2. Méthodes

2.1. Revivification de la souche et standardisation de l'*inoculum*

La souche étant congelée à -80°C , une revivification est nécessaire pour l'activer. Pour cela, la souche a étéensemencée dans 5 mL de bouillon MRS et incubée à $37^{\circ}\text{C}/24$ h. Cette étape a été suivie d'un deuxième repiquage dans le même bouillon et une re-incubation à $37^{\circ}\text{C}/24$ h.

Au terme de la période d'incubation, un ensemencement en stries a été réalisé sur gélose MRS. Les boîtes de Pétri sont par la suite incubées à $37^{\circ}\text{C}/72$ h. A l'issue de la période d'incubation, un repiquage de deux colonies est effectué dans du bouillon MRS. Ce dernier a été incubé à $37^{\circ}\text{C}/18$ h. Au terme de la période d'incubation, un dénombrement de la souche a été effectué par ensemencement de 1 mL des dilutions 10^{-7} et 10^{-8} , en masse, dans de la gélose MRS. Les dilutions décimales ont été réalisées dans de l'eau physiologique stérile (9 g/L

NaCl) en portant 1 mL de la culture bactérienne dans un tube de 9 mL d'eau physiologique (10^{-1}), puis à partir de ce dernier 1 mL a été transféré dans le deuxième tube de 9 mL d'eau physiologique (10^{-2}) et ainsi de suite jusqu'au 8^{ème} tube (10^{-8}).

Après incubation le dénombrement a été réalisé selon la formule suivante (**Guiraud, 2003**):

$$N = \frac{\sum C}{v(n_1 + 0,1n_2)d}$$

N : Nombre d'UFC par gramme ou par mL de produit initial.

$\sum C$: somme totale des colonies comptées.

n_1 : nombre de boites comptées dans la première dilution (la plus faible).

n_2 : nombre de boites comptées dans la seconde dilution (la plus forte).

d : taux de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

v : le volume de solution déposée

2.2. Préparation des solutions d'enrobage : Alginate et carraghénane

2.2.1. Préparation des solutions l'Alginate

Plusieurs solutions d'alginate à différentes concentrations (1,3% ; 1,5% ; 2,5% ; 3,0 % et 3,5% ; m/v) ont été préparées dans de l'eau distillée stérile afin de sélectionner une concentration idéale pour l'obtention de capsule de taille et la forme bien définies.

2.2.2. Préparation des solutions de Carraghénane

En se référant au travail réalisé par nos camarades (**Ziane et Moghraoui, 2021**), le carraghénane a été préparée aux deux concentrations de 1,3% et 1,5% qui avaient montré les meilleurs résultats de formation de capsules.

2.3. Préparation des solutions durcissantes : CaCl₂ et KCl

Deux sels ont été testés CaCl₂ et KCl à différentes concentrations.

2.3.1. Préparation de la solution de Chlorure de calcium (CaCl₂)

Deux solutions de CaCl₂ ont été préparées à deux molarités différentes : 0,1M et 1M et stérilisées par autoclavage (120°C/20min).

2.3.2. Préparation de la solution de Chlorure de potassium (KCl)

Deux solutions de KCl à 0,1M et 1 M ont été préparées et stérilisées par autoclavage (120°C/20min).

2.4. Essais de formation des capsules d'alginate et de carraghénane

Des essais de formation de capsules avec les différentes solutions des deux polymères et des deux solutions de CaCl₂ (0,1 et 1 M) et de KCl (0,1 et 1 M) ont été réalisés en utilisant la technique d'extrusion, les essais sont résumés dans le tableau III ci-dessous :

Tableau III : Essais de formation de capsules avec les différentes solutions des deux polymères et des deux solutions durcissantes

Solutions durcissantes	[Alginate]	[Carraghénane]
CaCl ₂ 0,1 M	1,3 % (m/v)	1,3 % (m/v)
CaCl ₂ 1M	1,5 % (m/v)	
KCl 0,1 M	2,5 % (m/v)	1,5 % (m/v)
KCl 1 M	3,0 % (m/v)	
	3,5 % (m/v)	

2.5. Encapsulation de la souche de *Lactiplantibacillus plantarum*

2.5.1. Dénombrement de la souche avant encapsulation

Un dénombrement avant encapsulation a été effectué pour la culture bactérienne fraîche de 18 h par une série de 8 dilutions décimales dans de l'eau physiologique stérile (0,9 % NaCl, m/v) et ensemencement des deux dernières dilutions dans de la gélose MRS comme décrit plus haut.

2.5.2. Encapsulation de *Lactiplantibacillus plantarum* dans le polymère d'alginate par la technique d'extrusion

Pour réaliser l'encapsulation, un volume de 1 mL de la culture bactérienne a été introduit et mélangé avec 9 mL de la solution du polymère d'alginate de (1,5 %) à température ambiante. Par la suite, le mélange homogénéisé a été aspiré avec une seringue stérile de 1 mL (Insuliss, Algérie/30G) puis par la force exercée manuellement sur le piston de la seringue, le mélange tombe goutte à goutte dans 10 mL de la solution durcissante de CaCl_2 (1 M) stérile. Ce processus se poursuit jusqu'à épuisement du contenu du tube contenant le mélange du polymère et la souche bactérienne.

Une fois le mélange épuisé, les capsules formées ont été séparées de la solution de CaCl_2 à l'aide d'un filtre stérile puis rincées avec de l'eau physiologique stérile.

De même, 9 mL de la solution d'alginate (2,5 %) ont été mélangés avec 1 mL de la suspension bactérienne dans un tube stérile. Le mélange a été aspiré et les mêmes étapes décrites précédemment ont été suivies jusqu'à la récupération des capsules en utilisant une solution durcissante de CaCl_2 0,1M.

2.5.3. Encapsulation de *Lactiplantibacillus plantarum* dans le polymère de carraghénane par la technique d'extrusion

Dans un tube stérile, 1 mL de la culture bactérienne a été introduit dans 9 mL de la solution de carraghénane 1,3 % (m/v) maintenues à 40°C. Le mélange a par la suite été aspiré par une seringue de 1 mL (Insuliss, Algérie/30G). Grâce à la seringue, le mélange a été versé goutte à goutte dans un bécher stérile contenant 9 mL de la solution durcissante (KCl 1M). Les capsules ainsi formées ont été récupérées à l'aide d'un filtre stérile puis rincées avec de l'eau physiologique stérile.

En parallèle, la même opération a été réalisée avec une solution de carraghénane à 1,5% (m/v) en utilisant du CaCl_2 1M C comme solution durcissante.

2.5.4. Dénombrement de la souche après encapsulation

Un dénombrement a été réalisé dans le filtrat résiduel après récupération des capsules pour déduire le nombre de cellules non encapsulées, les dilutions 10^{-3} et 10^{-4} ont servi au dénombrement comme décrit plus haut.

2.6. Résistance aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal

2.6.1. Résistance des cellules aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal

➤ Résistance à l'acidité gastrique

Un volume de 1 mL de la culture bactérienne de 18 h a été introduit dans 9 mL de tampon KCl-HCl (pH =2, annexe 1) stérile et incubé à 37°C/3 h. A l'issue de la période d'incubation, un dénombrement a été effectué en utilisant les dilutions 10^{-3} jusqu'à 10^{-7} comme décrit précédemment.

➤ Résistance aux sels biliaries

Un volume de 1 mL de la culture bactérienne de 18 h a été introduit dans 9 mL d'une solution stérile de tampon phosphate (pH = 8, annexe 1), additionnée de sels biliaries (0,3 %, m/v), puis incubé à 37°C/4 h. Après incubation, une série de dilutions décimales (10^{-1} - 10^{-8}) a été réalisée et un ensemencement de 1 mL des dilutions 10^{-3} jusqu'à 10^{-7} dans la gélose MRS a été effectué suivi d'une incubation 37°C/ 48 h.

2.6.2. Résistance des capsules aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal

Les capsules des deux polymères récupérées aseptiquement par filtration ont été introduites séparément dans les deux tampons : tampon phosphate+sels biliaries (pH=8) et tampon KCl- HCl (pH=3) pour tester leur résistance à l'acidité gastrique et aux sels biliaries.

➤ Capsules d'alginate

Les capsules d'alginate 1,5 % (m/v) et 2,5 % (m/v) récupérées après l'encapsulation ont été introduites séparément dans 9 mL de tampon phosphate+sels biliaries (pH=8) et dans le tampon KCl- HCl (pH=3) puis incubées à 37°C/3 h. Durant l'incubation, la persistance et la forme des capsules ont été visuellement vérifiées. Au terme de la période d'incubation, les capsules ont été éliminées et un dénombrement des cellules bactériennes a été effectué dans la solution résiduelle comme décrit plus haut en utilisant les dilutions 10^{-1} jusqu'à 10^{-5} .

➤ **Capsules de carraghénane**

Les capsules de carraghénane 1,3 % (m/v) et 1,5 % (m/v) récupérées après l'encapsulation ont été traitées comme décrit pour les capsules d'alginate.

1. Résultats de l'encapsulation

1.1. Formation des capsules

Les essais de formation des capsules ont été réalisés en utilisant :

- Deux polymères différents à savoir l'alginate ou le carraghénane et à des concentrations différentes (Tableaux I et II),
- Deux solutions durcissantes (KCl ou CaCl₂), à deux différentes concentrations (Tableaux IV et V).

Tableau IV. Aspect des capsules formées en utilisant l'alginate avec la solution de KCl ou CaCl₂ et à différentes concentrations.

[Solution durcissante]	[Alginate] (m/v)	Résultats et observations
CaCl₂ 1 M	1,3 %	- Formation d'un gel d'alginate facile à aspirer par l'aiguille de la seringue ;
	1,5 %	- Formation de capsules de forme sphérique (petite taille avec 1,3) après quelques secondes de contact avec la solution durcissante.
	2,5 %	- Apparition de capsules de taille moyenne après quelques secondes en contact avec la solution durcissante.
	3,0 %	- Formation d'un gel d'alginate difficile à aspirer par l'aiguille de la seringue ;
	3,5 %	- Formation de capsules bien distinctives, de forme sphérique et de grande de taille.
KCl 1 M	1,3 ; 1,5 ; 2,5 ; 3,0 ; 3,5 %	- Aucune formation de capsules observée, dissolution immédiate des gouttelettes de gel.
CaCl₂ 0,1 M	1,3 %	- Formation de plus petites capsules de forme sphérique bien déterminée.
	1,5 %	- Formation de capsules bien visibles.
	2,5 %	- Formation d'un gel d'alginate facile à aspirer par l'aiguille de la seringue ; -Formation plus rapide des capsules avec une forme sphérique bien déterminée.
	3,0 %	- Apparition de capsules grandes et bien formées.
	3,5 %	- Formation de grandes capsules.
KCl 0,1 M	1,3 ; 1,5 ; 2,5 ; 3,0 ; 3,5 %	- Dissolution immédiate des gouttelettes du gel en contact avec la solution durcissante.

Tableau V. Aspect des capsules formées en utilisant le carraghénane avec la solution de KCl ou CaCl₂ et à différentes concentrations.

[Carraghénane] m/v	[Solution durcissante]	Résultats et observation
1,3 %	CaCl ₂ 0,1 M	- Formation d'un gel de carraghénane facile à aspirer par l'aiguille de la seringue ; - Formation de capsules de forme sphérique bien définie, de même taille que celles formées avec l'alginate.
	CaCl ₂ 1 M	- Formation d'un gel de carraghénane facile à aspirer par l'aiguille de la seringue ; - Formation de capsules de forme sphérique plus grandes que celles de l'alginate.
	KCl 0,1 M	- Formation d'un gel de carraghénane facile à aspirer par l'aiguille de la seringue ; - Formation de petites capsules sphériques.
	KCl 1 M	- Formation d'un gel de carraghénane facile à aspirer par l'aiguille de la seringue ; - Apparition de capsules de taille moyenne et de forme sphérique.
1,5 %	CaCl ₂ 0,1 M	- Formation d'un gel de carraghénane facile à aspirer par l'aiguille de la seringue ; - Formation de petites capsules de forme irrégulière.
	CaCl ₂ 1 M	- Formation d'un gel de carraghénane facile à aspirer par l'aiguille de la seringue ; - Une meilleure formation de capsules
	KCl 0,1 M	Formation d'un gel de carraghénane facile à aspirer par l'aiguille de la seringue ; - Apparition de capsules de forme bien définie.
	KCl 1 M	- Formation d'un gel de carraghénane facile à aspirer par l'aiguille de la seringue ; - Apparition de petites capsules.

D'après les résultats (Tableaux IV et V), l'utilisation du KCl n'a pas permis la polymérisation de l'alginate. Par contre, avec le CaCl₂, des capsules d'alginate ont pu être obtenues aussi bien à 0,1 M que 1 M. Cependant, les concentrations d'alginate 1,5% et de 2,5 % avec la solution durcissante de CaCl₂ (0,1 M) et (1M) respectivement ont donné les meilleurs résultats par rapport aux dimensions et la forme de capsules formées avec le polymère d'alginate. D'autre part, des capsules de carraghénane ont été visibles aussi bien en utilisant le KCl que le CaCl₂ et ce quel que soit leur concentration. Ceci a été déjà rapporté par **Mortazavian et al. (2007)** qui affirment que l'ajout d'ions monovalents comme le potassium sous forme de KCl conduit à l'établissement de capsules de carraghénane.

En comparaison à l'alginate, le carraghénane aussi bien à 1,3 % qu'à 1,5 % a permis l'obtention des capsules avec une forme sphérique bien définie. Ce résultat est différent de celui rapporté dans la littérature. En effet, il a été rapporté par **Afzaal et al. (2019)** que le diamètre des capsules préparées avec de l'alginate de sodium (2,0 %) était plus élevé que celui des capsules de carraghénane (2,0 %) en utilisant du CaCl_2 0,1 M. Cela montre clairement que le diamètre des capsules est affecté par le type de matériau d'enrobage et sa concentration.

Suivant la littérature, la paroi des microcapsules pourrait être composée de divers matériaux. Dans ce contexte, l'alginate est l'un des polymères les plus utilisés pour l'encapsulation des cellules du fait qu'il a un statut de grade alimentaire (non-toxique) et il est de faible coût (**Silva et al., 2016**).

La légère différence des caractéristiques physiques des capsules formées de différents gels est due à des facteurs comme la concentration, l'homogénéisation, l'élasticité et la viscosité spécifique à chaque gel ou la différence de distanciation entre l'origine de l'aiguille et le bain de gélification (**Ouled-Haddar et al., 2016**).

Les capsules d'alginate ont généralement une structure hétérogène, avec un noyau lâche et une couche de surface dense, en raison de l'hétérogénéité du mécanisme de leur gélification (**Chun et al., 2014**).

L'alginate de calcium a été largement utilisé pour l'encapsulation des probiotiques à des concentrations comprises entre 0,5 et 4,0 %. La formation de capsules de haute densité et d'une grande résistance a été étudiée par **Mortazavian et al. (2007)**, qui ont montré que les ions calcium entraînent la formation de capsules plus stables avec un effet protecteur plus important sur les cellules probiotiques, donc une viabilité plus élevée.

Dans l'étude de **Silva et al. (2016)**, des capsules de forme sphérique ont été obtenues en utilisant la technique de co-extrusion de l'alginate/gomme laque comme matériau d'enrobage. Les microcapsules avaient des tailles homogènes. Selon ces mêmes auteurs, le seul facteur qui affecte la taille des capsules est le diamètre de l'aiguille de la seringue. Malheureusement, en utilisant des souches probiotiques lyophilisées, le diamètre de l'aiguille de la seringue ne peut pas être inférieur à 450 μm (**Silva et al., 2016**).

Dans l'étude de **Mahmoud et al. (2020)**, l'observation sous microscopie électronique à balayage a montré que toutes les capsules produites par extrusion en utilisant 4 combinaisons d'agents d'encapsulation, à savoir l'alginate de sodium comme biopolymère

principal à des concentrations de 3,0 % et 4,0 %, combiné à un autre biopolymère adjuvant : lait écrémé, dextrine, chitosane ou les protéines de lactosérum dénaturées, étaient de forme irrégulière avec une surface rugueuse et apparaissaient comme des gouttes avec une petite queue. L'apparition de capsules de forme irrégulière en présence de carraghénane (1,5 %)/ CaCl₂ 0,1 M serait due à une augmentation de la fréquence du jet du gel (Silva et al., 2016).

Des capsules cylindriques ont été obtenues par Ouled- Haddar et al. (2016) avec le kappa-carraghénane à 2,0 % et à 3,0 %, alors que celles obtenues dans notre travail avec l'iota-carraghénane (1,3 % et 1,5 %) sont de forme sphérique bien définie. Ceci démontre que le type de polymère utilisé et sa concentration influenceraient la morphologie des capsules formées.

Pour remédier à ces variations morphologiques, l'utilisation de systèmes d'extrusion automatisés permettra sans aucun doute d'améliorer et de standardiser la taille ainsi que la forme des capsules (Ouled-Haddar et al., 2016).

1.2. Rendement de l'encapsulation de la souche de *Lactiplantibacillus plantarum* subsp.*plantarum*

Les essais d'encapsulation de la souche probiotique ont été effectués avec les deux polymères : Alginate (1,5 ou 2,5 %) et Carraghénane (1,3 ou 1,5 %) en utilisant une solution de CaCl₂ (0,1 et 1 M) ou une solution de KCl (1 M) comme solution durcissante. Les rendements obtenus sont consignés dans le tableau VI et des images des capsules obtenues sont présentées sur la figure 5.

Les résultats obtenus (Tableau VI) montrent que quels que soit le polymère et la solution durcissante utilisés, aux concentrations choisies, le rendement d'encapsulation est d'environ 100 % (99,97 %). De ce fait, on peut conclure que la technique d'extrusion, en utilisant l'alginate ou le carraghénane comme matériau d'enrobage est très efficace pour l'encapsulation des souches probiotiques.

Tableau VI. Rendement d'encapsulation de la souche probiotique

[Polymère]	[Solution durcissante]	Taux initial (UFC/mL)	Taux non encapsulé (UFC/mL)	Taux encapsulé (UFC/mL)	Rendement (%)
Alginate 1,5 %	CaCl ₂ 1M	10 ⁹	5,05 10 ⁴	9,9 10 ⁸	99,97 %
Alginate 2,5 %	CaCl ₂ 0,1M		2,55 10 ⁵	9,9 10 ⁸	
Carraghénane 1,3 %	KCl 1M		2,30 10 ⁶	9,9 10 ⁸	
Carraghénane 1,5 %	CaCl ₂ 1M		3,00 10 ⁵	9,9 10 ⁸	

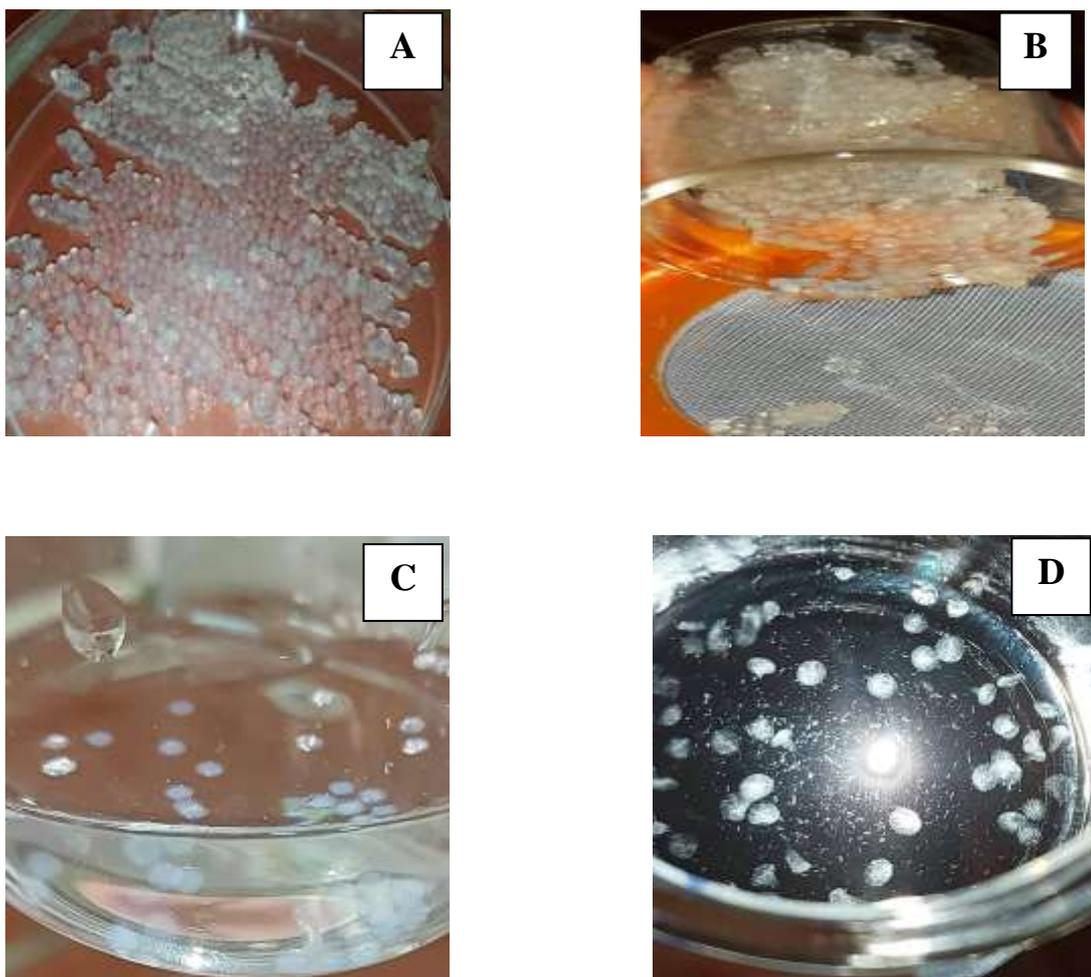


Figure 5. Aspect des capsules contenant la souche de *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* dans différentes matrices. (A) : Alginate 2,5 %, (B) : Alginate 1,5 %, (C) : Carraghénane 1,3 %, (D) : Carraghénane 1,5 %.

L'encapsulation a pour but de protéger les probiotiques des conditions défavorables, mais également permettre aux bactéries encapsulées d'atteindre le tractus intestinal avec un nombre élevé (**Damodharan et al., 2017**).

Les résultats de **Mahmoud et al. (2020)** montrent une efficacité de 94,94 % et 98,11 % d'encapsulation de cellules de *Lb. plantarum* avec la technique d'extrusion en utilisant deux concentrations d'alginate 3,0 % et 4,0 % additionné avec d'autres polymères tels que le lait écrémé et le chitosane.

Une variation du rendement d'encapsulation a été observée dans les résultats d'**Afzaal et al. (2019)** pour l'alginate de sodium (2,0 %) et le carraghénane (2,0 %) dans une solution durcissante de CaCl₂ (0.1 M). Statistiquement, le rendement des cellules de *Lactobacillus acidophilus* encapsulées dans l'alginate de sodium était plus élevé que celui obtenu avec le carraghénane (98,00 % et 96,00 % respectivement).

2. Résistance des capsules aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal

La plupart des souches lactiques probiotiques sont sensibles aux conditions régnant dans le tube digestif et subissent une réduction de leur nombre lors de leur ingestion. De ce fait, l'encapsulation avec des polymères résistants à ces conditions permet leur vectorisation jusqu'au site d'action à savoir l'intestin. Afin de vérifier la résistance des capsules formées avec les deux polymères alginate et carraghénane, une souche de *Lb. plantarum* probiotique résistante aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal (pH=03, 0,3 % bile) a été utilisée.

2.1. Résistance de la souche probiotique libre aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal

Afin de déduire la résistance des capsules, d'alginate et de carraghénane, aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal à savoir l'acidité gastrique (pH=3,0) et les sels biliaires (0,3 %, m/v), un test de viabilité de la souche probiotique a été préalablement réalisé. Les résultats obtenus ont montré une résistance à 98 et 99 % (tableau VII) de la souche utilisée aux conditions simulées testées respectivement.

Les cellules libres perdent généralement leur viabilité dans des conditions de stress gastro-intestinal. **Moumita et al. (2017)** ont observé que certaines souches de *Lactobacillus*

acidophilus et *Lb. plantarum* ont subi un état de dormance en raison du choc acide dans l'estomac et retrouvaient leur croissance lorsque le pH atteignait 6,0 dans l'intestin grêle.

Tableau VII. Résultats de la résistance de la souche probiotique aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal.

Taux initial	PBS pH8+Bile (0,3 %)/4 h	KCl-HCl (pH 3)/3 h
10 ¹⁰ UFC/ml	9,9 10 ⁹ UFC/ml	9,8 10 ⁹ UFC/ml
100%	99 %	98 %

La tolérance gastro-intestinale est inévitable pour les probiotiques pour permettre l'arrivée d'un nombre suffisant de cellules vivantes dans le colon pour leurs effets bénéfiques sur la santé (Moumita et al., 2017).

Lb. plantarum ZDY 2013 a été évaluée quant à sa capacité de survie dans des conditions de stress telles qu'une forte acidité et une concentration élevée de sels biliaries. Les résultats ont montré que la souche probiotique peut croître à pH 3,5 et survivre à pH 2 pendant 6 heures d'incubation et résister aux sels biliaries 0,45 % pendant une période de 3 heures (Huang et al., 2015).

Il est bien connu qu'il est nécessaire d'avoir une charge probiotique suffisamment élevée pour que, lorsqu'elle atteint le lieu d'action dans l'intestin, il ait un nombre optimal pour une colonisation efficace (Luca et Oroian, 2021). Les bactéries probiotiques doivent survivre au passage gastrique, où le pH peut être aussi bas que 1,5 à 2,0 et elles doivent rester en vie pendant 4 heures ou plus avant de passer dans le tractus intestinal, dans ce cas le probiotique est considéré efficace (Gupta et Sharma, 2017). Les cellules bactériennes probiotiques résident dans tout le système intestinal de l'Homme et restent plus actives dans le côlon (Afzaal et al., 2020).

Les probiotiques délivrés par les aliments doivent en premier lieu survivre pendant le transit par le tractus gastro-intestinal supérieur. *Lb. plantarum* ZLP001 a été exposée à un fluide gastrique de pH= 2 et 3 pendant 3 h. Après incubation, il a été observé que le liquide gastrique à pH=2 était inhibiteur pour la souche tandis qu'à pH=3, 81,28 % est enregistré comme taux de tolérance. D'autre part, la tolérance aux sels biliaries semble être un caractère important chez la souche envisagée comme probiotique, après 4 h d'incubation de la souche lactique dans des solutions de sels biliaries de 0,1 ; 0,3 et 0,5 %, les résultats ont montré 85,3

% et 61,4 % de tolérance à la bile pour les concentrations de 0,1 % et 0,3 % respectivement, cependant elle était inhibée à la concentration de 0,5 % (**Wang et al., 2011**).

La viabilité des cellules bactériennes dans l'estomac et l'intestin est importante pour obtenir les avantages souhaités des probiotiques. Une diminution instantanée a été observée chez les cellules libres par rapport aux cellules encapsulées avec de l'alginate de sodium et du carraghénane (**Afzaal et al., 2019**). L'encapsulation avec les deux types de polymères a un effet significatif sur la viabilité des probiotiques dans les conditions gastro-intestinales simulées et dans un aliment vecteur (yaourt) (**Afzaal et al., 2019**).

Ding et Shah (2009) ont montré que l'encapsulation d'une souche probiotique de *Lb. plantarum*, dans l'alginate, le carraghénane, la gomme de caroube ou le xanthane, a permis d'améliorer sa viabilité lors de son exposition aux conditions gastro-intestinales simulées.

Il est connu que le pH faible et le pH élevé affectent la viabilité des probiotiques à la fois dans les aliments vecteurs que dans les conditions gastro-intestinales (**Afzaal et al., 2020**). Pour cela, la viabilité et la stabilité d'une souche de *Lactobacillus casei* libre et encapsulée ont été étudiées à des pH=2 et 7,5 par **Afzaal et al. (2020)** et les résultats ont montré une diminution rapide du nombre de cellules non encapsulées par rapport aux cellules encapsulées. Les deux types de matériaux utilisés (alginate de calcium et concentré de protéines de lactosérum) ont amélioré la survie de la souche probiotique dans les conditions intestinales simulées. L'alginate de Calcium a montré un meilleur effet par rapport aux protéines de lactosérum.

Nos résultats montrent la résistance de la souche étudiée au pH gastrique (98 %). Ces résultats sont meilleurs que ceux rapportés par **Ouled –Haddar et al. (2016)**. En effet dans leur étude, le nombre de cellules libres d'une souche de *Lb. plantarum* a diminué à 81 % après 1 h et demi d'incubation et à 47 % après 3 h d'incubation. Par contre, 94 % et 54 % de viabilité ont été enregistrés aux mêmes périodes d'incubation respectivement pour les cellules micro-encapsulées.

En effet, lorsque le pH diminue et l'environnement devient acide, la viabilité des cellules libres diminue en raison du pH qui agit comme un facteur de stress sur la membrane cellulaire des bactéries. Par conséquent, l'aspect important de l'encapsulation se manifeste dans la protection des bactéries lactiques de l'environnement acide et l'amélioration de leur viabilité dans les conditions normales du tractus gastro-intestinal (**Rahmati, 2020**).

Les sels biliaires sont la deuxième barrière à traverser par les bactéries probiotiques pour atteindre leur site d'action. La survie de *Lb. plantarum* en présence de 0,3 % de sels biliaires a été évaluée pour représenter les conditions de duodénum. Les cellules ont gardé leur viabilité à un taux d'environ 99 %. Par contre dans l'étude d'**Ouled-Haddar et al. (2016)**, le nombre de cellules libres de *Lb. plantarum* a diminué de 8.10^{10} à 5.10^7 UFC/mL après 4 h d'incubation (70 % de viabilité).

Plusieurs études ont mis en évidence la meilleure survie des bactéries encapsulées par rapport aux cellules libres lors de l'exposition à différentes conditions létales et plusieurs matériaux d'encapsulation ont été testés pour leur capacité à améliorer la viabilité des souches probiotiques. Cependant, peu d'études ont porté sur la comparaison entre les différents agents d'encapsulation dans différentes conditions difficiles (**Mahmoud et al., 2020**).

Le choix des matériaux de revêtement appropriés détermine les propriétés physiques et chimiques des microcapsules résultantes (**Chun et al., 2014**). Par exemple, l'utilisation de l'alginate est limitée du fait de sa faible stabilité physique en présence de cations anti-gélifiants (ex. ions de sodium et de magnésium) ou d'agents chélateurs (ex. phosphate). De plus, sous des conditions de faible pH, des matrices d'alginate cross-liées peuvent entamer une dégradation des molécules d'alginate et par conséquent une réduction de leur masse moléculaire, induisant une libération des ingrédients actifs encapsulés (**Iravani et al., 2015**).

2.2. Résistance des capsules aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal

Les résultats de la résistance des capsules soumises aux mêmes conditions gastro-intestinales simulées sont indiqués dans le tableau VIII. Nous pouvons constater que les capsules retiennent les cellules après passage à travers l'estomac et l'intestin grêle. Cependant, des taux cellulaires remarquables ont également été relargués dans le milieu externe.

Quoique des amas de capsules d'alginate déformées dans le tampon KCl-HCl pH 3 ont été observés ce qui confirme leur sensibilité au pH acide, une meilleure rétention des cellules dans les capsules d'alginate au pH 3 de l'estomac (99,89 % de cellules retenues) a été notée par rapport au carraghénane.

Il a été rapporté que les microcapsules produites avec l'alginate pourraient présenter une paroi avec une forte porosité, aboutissant à une perte du core des microcapsules durant le

stockage (Silva et al.,2016). Ce qui pourrait expliquer le nombre appréciable de cellules qui ont échappé dans le milieu externe après exposition au pH 3 et au pH 8.

Tableau VIII. Résultats de la résistance de la souche probiotique encapsulée aux valeurs de pH simulées du tractus gastro-intestinal.

[Polymère]	pH	Taux initial (UFC/mL)	Taux libéré (UFC/mL)	Taux retenu (UFC/mL)	Taux retenu (%)
Alginate 1,5 %	3	9,9 10 ⁸	6,58.10 ⁴	9,89 10 ⁸	99,89
	8		1,78.10 ⁵	9,89 10 ⁸	
Alginate 2,5 %	3		3,8.10 ⁶	9,86 10 ⁸	99,59
	8		4,77.10 ⁵	9,89 10 ⁸	
Carraghénane 1,3 %	3		2,74 10 ⁶	9,87 10 ⁸	99,69
	8		3,1 10 ⁶	9,86 10 ⁸	
Carraghénane 1,5 %	3		4,7 10 ⁶	9,85 10 ⁸	99,49
	8		2,0 10 ⁷	9,70 10 ⁸	

La forme encapsulée de *Lactobacillus acidophilus* a montré une résistance élevée par rapport à la forme libre. Alors que *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus fermentum* n'ont montré aucune augmentation de leur viabilité après encapsulation. Ceci montre que l'encapsulation confère une protection aux bactéries contre les conditions de stress en fonction du type de bactérie (Moumita et al., 2017).

Les bactéries probiotiques encapsulées montrent une plus grande tolérance lors de l'exposition au tractus gastro-intestinal *in vitro* et au traitement thermique par rapport à leur forme libre (Moumita et al., 2017).

Des études ont rapporté que la survie des probiotiques encapsulés dans l'alginate est supérieure à celles des bactéries libres (Chun et al., 2014). Il a également été rapporté que les microcapsules d'alginate conservent leur restructure uniforme sphérique après l'incubation dans un suc gastrique artificiel (liquide organique) de pH 2.0 pendant 2 h. (Chun et al., 2014)

Il a été rapporté que le carraghénane est un agent encapsulant capable de protéger les bactéries probiotiques efficacement de l'influence des conditions environnementales (Elida et al., 2020).

2.3. Libération contrôlée de la souche dans l'intestin

En analysant les résultats obtenus, il en ressort une meilleure libération des cellules retenues dans les capsules de carraghénane (1,5 %) au pH 8 de l'intestin (2,0 %). Ce qui fait qu'à partir des $9,85 \cdot 10^8$ UFC/mL de cellules retenues après passage par l'estomac (pH 3), $1,8 \cdot 10^7$ UFC/mL seront libérées dans l'intestin.

D'après **Moumita et al. (2017)**, la charge bactérienne a été plus importante dans le bouillon de culture que dans les microcapsules après 4 heures de digestion ce qui montre qu'il y a eu une libération appréciable de cellules bactériennes des microcapsules. L'alginate de sodium présente une porosité et une sensibilité aux pH extrêmes, ce qui peut intervenir à la fois dans la libération et la protection des composés encapsulés.

Une souche probiotique de *Lb. plantarum*, entre autres encapsulée dans de l'alginate, du carraghénane et d'autres matériaux de revêtement a été étudiée quant à sa tolérance à l'acidité (pH=2/2 h) et à la bile (0,3% /8 h). Les résultats ont montré que tous les matériaux d'encapsulation testés ont libéré de petites quantités de cellules. Toutefois, l'alginate et la gomme de xanthane ont retenu 22,1 % et 18,6 % respectivement de cellules (**Ding et Shah., 2009**).

Conclusion

Conclusion

Pour que les bactéries probiotiques exercent leurs effets bénéfiques, elles doivent atteindre l'intestin grêle en quantités suffisantes. Cependant, parmi les facteurs les plus importants qui peuvent affecter la survie des probiotiques sont la forte acidité dans la région gastrique et la forte concentration de composants biliaries dans l'intestin proximal (Moumita et al., 2017 ; Luca et Oroian, 2021).

Dans notre travail on a testé l'efficacité de l'encapsulation d'une souche de *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* par la technique d'extrusion dans deux biopolymères : alginate et carraghénane, suivie d'une exposition aux facteurs gastro-intestinaux simulés. Au terme de ce travail, nous avons abouti aux conclusions suivantes :

- Les deux polymères hydrocolloïdes, alginate et carraghénane permettent la formation de capsules à différentes concentrations (1,3-3,5 % ; m/v) en utilisant du CaCl₂ aussi bien à 0,1 que 1 M. Par contre, le KCl ne permet pas la gélification de l'alginate, un fait déjà rapporté dans la littérature.
- Les deux polymères (alginate 1,5 et 2,5 % et carraghénane 1,3 et 1,5 %) testés permettent une bonne encapsulation de la souche bactérienne.
- Les capsules formées par les deux polymères ont montré une très bonne résistance aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal (pH=3 et pH=8+ 0,3% sels biliaries).
- Les capsules des deux polymères permettent une rétention appréciable des cellules lors du passage par le suc gastrique et leur libération dans l'intestin.

Cependant, ces conclusions restent préliminaires et des tests complémentaires doivent être réalisés pour leur confirmation. Pour cela, des perspectives sont dégagées, elles consistent en :

- Répétition des essais pour la confirmation des résultats obtenus et d'une étude statistique pour leur validation.
- Réalisation de tests de résistance des cellules et des capsules aux enzymes gastro-intestinales (pepsine, pancréatine).

- Réalisation de tests de résistance des capsules dans un aliment véhicule (lait fermenté, jus...).
- Essais d'encapsulation avec les deux polymères en utilisant d'autres techniques d'encapsulation.
- Essai d'encapsulation avec d'autres polymères.
- Réalisation de l'encapsulation in vivo.

*Liste
bibliographique*

A

- Abdallaoui, R. (2018). La micro-encapsulation des huiles meilleure approche pour la valorisation des produits alimentaires. Thèse de doctorat en Pharmacie. Faculté de Médecine et de Pharmacie- Rabat. Université Mohammed V de Rabat, (Maroc). p143.
- Afzaal, M., Khan, A. U., Saeed, F., Ahmed, A., Ahmad, M. H., Maan, A.A et Hussain, S. (2019). Functional exploration of free and encapsulated probiotic bacteria in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *Food science & nutrition*, 7(12), 3931-3940.
- Afzaal, M., Khan, A. U., Saeed, F., Arshad, M. S., Khan, M. A., Saeed, M. & Anjum, F. M. (2020). Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. *Food Science & Nutrition*, 8(3), 1649-1656.
- Alegre, E. (2009). Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de Doctorat en Chimie Analytique, Université de Strasbourg, (France). p 5.
- Alvarez-Olmos, M.I., et Oberhelman, R.A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clinical and Infectious Diseases* 32, 1567-1576.
- Anal, K.A., et Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18 (5), 240–251.
- Amrouche, T. (2005). Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : analyse *in vitro* et étude *ex-vivo* des mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de Doctorat en Sciences et Technologie des Aliments. Université de Laval, Faculté des Sciences de l'Agriculture et des Aliments, Québec (Canada). 155p.
- Arslan-Tontul, S.,et Erbas, M. (2017). Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie-Food Science and Technology* 81,160-169.

B

- Bampi, G.B., Backes, G.T., Cansian, R.L., Matos Jr, F.E., Ansolin I.M.A., Poletto B.C., Corezzolla L.R., et Favaro-Trindade C.S. (2016). Spray chilling microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis and its use in the preparation of savory probiotic cereal bars. *Food and Bioprocess* 9, 1422–1428.
- Barache, N., Belgasmia, Y., Ladjouzi, R., Bendali, F., et Drider, D. (2020). Des grappes de souches de *Lactobacillus* d'origine végétale sont associées à des fonctions bénéfiques: données expérimentales et interprétations statistiques. *MDPI.Academic Open Access publishing*, 9(8), 985.
- Bertoni, S., Dolci, L. S., Albertini, B., et Passerini, N. (2018). Spray congealing: A versatile technology for advanced drug-delivery systems. *Therapeutic Delivery*, 9(11), 833-845.
- Benabid, F.Z., et Zouai, F. (2016). Natural polymers: Cellulose, chitin, chitosan, gelatin, starch, carrageenan, xylan and dextran. *Algerian Journal of Natural Products*, 4(3), 348-357.

- Bianca, H. F. (2017). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG into hybrid alginate-silica microparticles. Thèse de Doctarat en Dissertation, Université de Lorraine. (France).187p
- Boh, B. (2007). Developements et applications industrielles des microcapsules. V: Van Damme, TF (ur.): Microencapsulation: des sciences aux technologies. Paris, Lavoisier, 9-22.
- Borriello, S.P., Hammes, W.P., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M., et Valtonen, V. (2003). Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clinical and Infectious Diseases* 36, 775-780.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., et Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467-483.

C

- Campo, V. L., Kawano, D. F., da Silva, Jr. D. B., et Carvalho, I. (2009). Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review, *Carbohydrates Polymers* 77, 167-180.
- Champagne, C.P., Gardner, N.J., et Roy, D. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 61-84.
- Champagne, C. P., et Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 184-190.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., et Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 27-35.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., et Del Carmen Villarán, M. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 185-189.
- Chen, M. J., et Chen, K. N. (2007). Applications of probiotic encapsulation in dairy products. *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food systems*.83-112.
- Chopde, S., Pawar, N., Kele, V. et Changade, S. (2014). Microencapsulation of probioticbacteria of available techniques, focusing on biomaterials. *Agriculture Review*, 35 (4) ,287- 294.
- Chun, H., Kim, C., et Cho, Y. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* DKL 109 using external ionic gelation method. *Korean Society for Food Science of Animal Recources*, 34(5), 692-699.

D

- Damodharan, K., Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., et Suh, J. W. (2017). Co-encapsulation of lactic acid bacteria and prebiotic with alginate-fenugreek gum locust bean gum matrix: Viability of encapsulated bacteria under simulated gastrointestinal condition and during storage time. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 22, 265-271.
- De Prisco, A., Maresca, D., Ongeng, D., et Mauriello, G. (2015). Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to

enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie-Food Science and Technology*, 61(2), 452-462.

- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., Bäckhed, F et Mithieux, G. (2014). Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 156, 84–96.
- Digambar, K., Sujatha, K., Palanisamy, B.D., et Prathapkumar H.S (2017). Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods – A review. *Food Bioscience*, 11.
- Dinakar, P., et Mistry V.V. (1994). Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 77 (10), 2854–2864.
- Ding, W. K. et Shah, N. P. (2009). Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science* 74, 100-107.
- Dubernet, C., Rouland, J. C., et Benoit, J. P. (1991). Ibuprofen-loaded ethylcellulose microspheres: analysis of the matrix structure by thermal analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(11), 1029-1033.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S et Collins, J. K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 386s-392s.

E

- Elida, M., Gusmalini et Saufani, I. A. (2020). Characteristics and viability of probiotic capsule *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* M13 encapsulated by extrusion using Carrageenan. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 583 (1).

F

- FAO/WHO. (2002). Joint Working Group Report on Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, 30 April and May 2002. (Consulter le 23 Mars 2022).
- Fang, Y., Kennedy, B., Rivera, T., Han, K. S., Anal, A. K., et Singh, H. (2017). Encapsulation system for protection of probiotics during processin Patent. *VS.20120263826*, 2012 9,788-563.
- Fernanda, B. (2017). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG into hybrid alginate-silica microparticles .Thèse de doctorat, Université de Lorraine.(France). 185p.
- Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N., et Dumoulin, E. (2006). Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 75(1), 27-35.

G

- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), 330-347.

- Gournier-Château, N., Larpent, J.P., Castillanos, M.I., et Larpent, J.L. (1994). Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Ed. Tec et doc, Lavoisier, Paris, pp. 1-192.
- Gueimonde, M., et Salminen, S. (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Diseases* 38, S242-S247.
- Guiraud, J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Edition: Dunod. Paris. 651p.
- Gupta, A., et Sharma, N. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria-*Pediococcus acidilactici* Ch-2 isolated from Chuli-A traditional apricot product of Himalayan region for the production of novel bioactive compounds with special therapeutic properties. *Journal Food Microbiol. Safety and Hygiene*, 2(1), 119.

H

- Haffner, F.B. (2017). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG into hybrid alginate-silica microparticles. Thèse de Doctorat en Science Chimique . Université de Lorraine. (France).187p.
- Hansen, L.T., Allan-Wojotas, P.M., Jin, Y.L., et Paulson, A.T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology* 19 (1), 35–45.
- Havenaar, R. et Huis in't Veld, J.H.J. (1992). Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R. (Ed.). Probiotics, the scientific basis. Chapman & Hall, pp.209-224.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., et Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 365S-373S.
- Huang, R., Tao, X., Wan, C., Li, S., Xu, H., Xu, F et Wei, H. (2015). *In vitro* probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* ZDY 2013 and its modulatory effect on gut microbiota of mice. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 5850-5861.

I

- Iravani, S., Korbekandi, H., et Mirmohammadi, S.V. (2015). Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4679–4696.

J

- Jackson, L. S., et Lee, K. (1991). Microencapsulation and the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie-Food Science and Technology*, 24(4), 289-297.

K

- Kavitate, D., Kandasamy, S., Devi, P. B., et Shetty, P. H. (2018). Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods—A review. *Food Bioscience* 21, 34-44
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., et Deeth, H. (2003). The influence of coating on some properties of alginate beads and suvivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 14, 737-743.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., et Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 14, 737-743.

L

- Lannitti, T., et Palmieri, B. (2010). Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 29(6), 701-725.
- Lacroix, C., et Yildirim, S. (2007). Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 176-183.
- Luca, L., et Oroian, M. (2021). Influence of different prebiotics on viability of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* encapsulated in alginate microcapsules. *Foods* 10(4), 710.

M

- Mahmoud, M., Abdallah, N. A., El-Shafei, K., Tawfik, N. F., et El-Sayed, H. S. (2020). Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. *Heliyon*, 6(3), e03541.
- Mandal, S., Puniya, A. K., et Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16(10), 1190-1195.
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., et Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(1), 1-18.
- Mortazavian, A. M., Azizi, A., Ehsani, M. R., Razavi, S. H., Mousavi, S. M., Sohrabvandi, S., et Reinheimer, J. A. (2008). Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft*, 63(4), 427.
- Moumita, S., Goderska, K., Johnson, E. M., Das, B., Indira, et D., Yadav, R. (2017). Evaluation of the viability of free and encapsulated lactic acid bacteria using *in-vitro* gastro intestinal model and survivability studies of synbiotic microcapsules in dry food matrix during storage. *LWT-Food Science and Technology* 77, 460–467.

O

- Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Idoui, T., Bouridane, H., et Arid, S. (2016). *Lactobacillus plantarum* G1 Microencapsulation enhanced its viability during storage and gastrointestinal transit. *Sains Malaysiana*, 45(7), 1049–1055.

P

- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., De Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M et Kok, J. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 837-890.
- Poe, S.L., Kobašlija, M., Mc et Quade, D.T. (2006). Microcapsule enabled multicatalyst system. *Journal of the American Chemical Society*, 128(49), 15586-15587.
- Praepanitchai, O. A., Noomhorm, A., et Anal, A. K. (2019). Survival and behavior of encapsulated probiotics (*Lactobacillus plantarum*) in calcium-alginate-soy protein isolate-based hydrogel beads in different processing conditions (pH and temperature) and in pasteurized mango juice. *BioMed research international*, (2019), 1-8.
- Prevost, H, Divies, C, et Rousseau, E. (1985). Continuous yoghurt production with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* entrapped in Ca²⁺ alginate. *Biotechnology Letters*, 7(4), 247-252.

R

- Rahali, A. (2014). Effet de divers biomatériaux d'encapsulation sur la survie de certaines bactéries lactiques d'intérêt aux hostilités digestives simulées. Thèse de Doctorat, Université de Mostaganem (Algérie).80p.
- Rahmati, F. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in Eudragit S100 and alginate chitosan under gastrointestinal and normal conditions. *Applied Nanoscience*, 10(2), 391-399.
- Ravi, N.S., Sawale, P.D., Pravin, D.S., Khedkar, C.D et Ajay S (2014). Selection criteria for probiotics: a review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 9, 2-7.
- Risch, S.J. (1995). Encapsulation: overview of uses and techniques. *American Chemical Society* 590, 2-7.

S

- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., et Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84, 197-215.
- Sanders., M.E. (2003). Probiotics: considerations for human health. *Nutrition Reviews* 61, 91-99.
- Silva, M.P., Tulini, F.L., Ribas, M.M., Penning, M., Fávaro-Trindade, C.S., et Poncelet, D. (2016). Microcapsules loaded with the probiotic *Lactobacillus paracasei*

BGP-1 produced by co-extrusion technology using alginate/shellac as wall material: Characterization and evaluation of drying processes. *Food Research International* 89, 582–590.

- Singh, V. P., Sharma, J., Babu, S., et Singla, A. (2013). Role of probiotics in health and disease: a review. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 63(2), 253-257.
- Specos, M.M., García, J. J., Tornesello, J., Marino, P., Vecchia, M.D., Tesoriero, M. D., et Hermida, L.G. (2010). Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(10), 653-658.
- Stevanović, M., Savić, J., Jordović, B., et Uskoković, D. (2007). Fabrication, *in vitro* degradation and the release behaviours of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid. *Biointerfaces* 59, 215– 223.
- Suganya, V., et Anuradha, V. (2017). Microencapsulation and nanoencapsulation: a review. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 9(3), 233-239.

T

- Tremaroli, V et Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242–249.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., et Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73, 393S-398S.

V

- Vidhyalakshmi, R., Bhakyaraj, R., et Subhasree, R.S. (2009). Encapsulation “The Future of Probiotics”-A Review. *Advances in Biological Research*, 3 (3-4), 96-103.
- Vincent, E. (2010). Les Alginates et leurs applications en Pharmacie et en Ingénierie. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Henri Poincaré–Nancy 1 (France).180p.

W

- Wang, J., Ji, H., Zhang, D., Liu, H., Wang, S., Shan, D., et Wang, Y. (2011). Assessment of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* ZLP001 isolated from gastrointestinal tract of weaning pigs. *African Journal of Biotechnology*, 10(54), 11303-11308.
- Weimer, B. C. (2011). Responses of lactic acid bacteria to starvation. In *Stress responses of lactic acid bacteria Springer, Boston, MA*. 129-144.
- Woting, A., et Blaut, M. (2016). The intestinal microbiota in metabolic disease. *Nutrients* 8, 202.

Z

- Zhu, Y. (2007). Immobilized cell fermentation for production of chemicals and fuels. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*, 373-396.
- Ziane, D., et Moughraoui, R. (2021). Etude des critères probiotiques de deux souches lactiques, a usage avicole, et essai de leur encapsulation. Université de Béjaia. (Algérie).53p.

Annexes

Annexe

Préparation du tampon phosphate+ sels biliaires

- 1-Préparer 100 mL d'eau distillée et verser la moitié de l'eau dans un bécher,
- 2- Ajouter 0,8 g de NaCl,
- 3-Ajouter 0,02 g de K_2HPO_4 (VWR Chemicals- Belgique) et 0,14 g de Na_2HP_4 (Biochem-France) et assurer l'homogénéisation de la solution,
- 4-Ajouter 0,015 g de sels biliaires (sialchim-Algérie) à la solution,
- 5- Ajuster le pH final à 8 avec NaOH 3 N et compléter le reste d'eau.

Préparation du tampon KCl- HCl

- 1-Préparer 99,8 mL d'eau distillé et verser la moitié dans un bécher,
- 2-Ajouter 0,74 g de KCl
- 3-Ajouter 0,2 mL de HCl et mélanger délicatement jusqu'à homogénéisation
- 4- Ajuster le pH final à 3 avec du HCl et compléter avec l'eau restant.

Préparation de la gélose MRS

- 1-Préparer 1000 mL de l'eau distillée et verser la moitié du volume dans un erlenmeyer et laisser le chauffer
- 2-Ajouter 68,2 g de la gélose (Granucult / Sigma-Aldrich, Allemagne) doucement sous agitation (à l'aide d'un barreau magnétique)
- 3-Agiter jusqu'à dissolution, ajouter le volume d'eau restant et couvrir l'erlenmeyer avec du papier aluminium pour empêcher l'évaporation et laisser sous ébullition.
- 4- Stériliser la gélose préparée à l'autoclave (120°C/20min)

Préparation du bouillon MRS

- 1- Préparer 200 mL d'eau distillée, verser environ la moitié de l'eau dans un erlenmeyer et laisser chauffer
- 2- Ajouter 10,45 g du bouillon MRS (Conda-Prondanisa, Espagne) doucement sous agitation (à l'aide d'un barreau magnétique)
- 3- Agiter jusqu'à dissolution, ajouter le volume d'eau restant et couvrir l'erlenmeyer avec du papier aluminium pour empêcher l'évaporation et laisser sous ébullition.
- 4- Stériliser du bouillon préparée à l'autoclave (120°C/20min).

Résumé :

Les probiotiques sont des microorganismes qui exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte, la résistance de ces derniers aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal pour atteindre leurs sites d'action en quantité adéquate représente un défi. La microencapsulation s'avère une alternative potentielle afin d'améliorer le taux de survie des probiotiques. Ce travail s'intéresse à l'évaluation de l'efficacité d'encapsulation de *Lb.plantarum* dans l'alginate et le carraghénane comme matériaux d'enrobages dans deux solutions durcissantes (KCl et CaCl₂ ; 1M ou 0,1M) en utilisant la technique d'extrusion. Les résultats obtenus ont montré que les deux polymères utilisés permettent la formation des capsules à différentes concentrations testées (de 1,3% à 3,5%) et une bonne encapsulation de souche bactérienne avec l'alginate (1,5% / CaCl₂ 1M et 2,5% / CaCl₂ 0,1M) avec un taux d'encapsulation de 99,97% , les capsules d'alginate (1,5%) ont montré une meilleure résistance avec un taux de rétention de 99,89% au pH=3, ceci d'une part et d'autre part une meilleure libération de cellules retenues dans les capsules de carraghénane (1,5%) au pH=8 de l'intestin (2%) a été observée.

Mots clés : probiotique, encapsulation, extrusion, alginate, carraghénane, *Lb. Plantarum*.

Abstract :

Probiotics are microorganisms that exert a beneficial action on the health of the host. The resistance of these microorganisms to the simulated condition of the gastrointestinal tract to reach their sites of action in adequate quantities is a challenge. Microencapsulation is a potential alternative to improve the survival rate of probiotics. This work focuses on the evaluation of the encapsulation efficiency of *Lb.plantarum* in alginate and carrageenan as coating materials in hardening solutions of different concentrations (KCl and CaCl₂ 1M or 0,1M) using the extrusion technique. The results obtained showed that the two polymers used allow the formation of capsules at different concentrations ranging (from 1, 3% to 3,5%) and a good encapsulation of bacterial strain with alginate (1,5% / CaCl₂ 1M and 2,5% / CaCl₂ 0,1M) with an encapsulation rate of 99,97%, alginate capsules (1,5%) showed a better resistance with a retention rate 99,89% at pH=3, on the other hand a better release of cells retained in the carrageenan capsules (1,5%) at pH=8 of the intestine (2%) was observed.

Key words: probiotic, encapsulation, extrusion, alginate, carrageenan, *Lb. Plantarum*.