

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة د. مولاي الطاهر
Université de Saida Dr MOULAY Tahar
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
قسم البيولوجيا
Département de Biologie



Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master
En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Contribution à l'étude de la micro-encapsulation des probiotiques / prébiotiques

Présenté par :

- Mme : HAOUDI Chaimaa Besma
- Mme : ZAOUI Dalal

Soutenu le : 24/06/2025

Devant le jury composé de :

Président

Mr. KEBIR Nasr-eddine

MCA à l'Université de
Saida

Examineur

Mme .CHAHROUR Wassila

MCA à l'Université de
Saida

Rapporteur

Mr. BELLIL Yahia

MCA à l'Université de
Saida

Dédicaces

L'envie d'apprendre est une force silencieuse qui pousse à avancer, même quand les chemins sont semés d'embûches. Face aux épreuves et aux difficultés, nous avons choisi de persévérer, convaincus que le savoir est la lumière qui éclaire notre avenir. Les études ne sont pas un simple passage, mais une richesse durable, un guide vers l'émancipation. Que nos veilles tardives, notre travail acharné et notre détermination soient le socle d'un avenir rempli de paix, de réussite et de satisfaction profonde.

Je dédie ce modeste travail :

À mon époux,

Mon soutien, mon repère dans les moments de doute.

Merci pour ta patience, ta présence réconfortante et tes encouragements constants.

À ma chère famille et belle famille,

À mes parents, source inépuisable d'amour et de valeurs,

À mes sœurs, pour leur affection et leur inspiration,

Merci d'avoir toujours cru en moi.

Cette réussite est la vôtre autant que la mienne.

À ma binôme,

ZAOUI D,

Merci pour ton engagement, et ton esprit de collaboration. Cette aventure a été faite de partages, de défis et de belles réussites à deux.

CHAIMAA BESMA

Dédicaces

*Tout d'abord je tiens a remercier dieu de m'avoir donné la force
l'opportunité et le courage de mener ce modeste travail*

Et au profond de mon cœur je le dédie aussi a :

*La mémoire de Mon cher père qui m'as quitté trop tôt ton départ a été un
détournement d'une vie mais aussi une force pour toute réussite ta petite fille
parvient a l'atteindre t'est a jamais gravé en esprit et en cœur repose en paix*

*A la prunelle de mes yeux maman la femme la plus courageuse et qui me
pousse a grandir parvenir a réussir et me soutenir dans toute étape de ma vie*

*Mon cher frère aymen et Mes chères sœurs mes piliers merci de me
supporter me pousser vers l'avant et tous simplement d'être vous je vous aime*

A tout membre de ma famille mes chères tantes cousins et cousines...

*A ma chère binôme et mon amie Besma avec qui on a déjà réussi et espère
que ce travail règne parmi ces réussites*

*A ma chère amie d'enfance Chourouk et tout mes amies et collègues de ma
promo universitaire*

Dalal

Remerciements

Nous remercions Dieu Tout-Puissant pour nous avoir accordé la force, la patience et la santé nécessaires à l'aboutissement de ce travail.

Nous exprimons nos sincères remerciements à notre directeur de mémoire, Mr. BELLIL Yahia, pour sa disponibilité, ses conseils éclairés et son accompagnement bienveillant tout au long de notre recherche. Son expertise a été précieuse pour structurer et enrichir notre réflexion.

Nos remerciements vont également à l'ensemble des enseignants et membres du corps administratif de la faculté des sciences de la nature et de la vie, qui nous ont transmis leur savoir et soutenus durant notre parcours d'études.

Nous tenons à remercier toutes les personnes et institutions qui nous ont aidés, orientés ou soutenus dans la collecte d'informations et l'avancement de ce mémoire.

Enfin, nous adressons une pensée pleine de reconnaissance à nos familles, nos proches et nos ami(e)s, pour leur soutien moral, leurs encouragements constants et leur compréhension tout au long de cette étape importante.

À toutes et à tous, merci du fond du cœur.

Liste des abréviations

AC : anti-corps

ATB : antibiotique

BEI: barrière épithéliale intestinale

DAA: diarrhée associé aux antibiotiques

FAO: Food and Agriculture Organisation

FOS : fructooligosaccharides

GOS:Les galacto-oligosaccharides

NGP : probiotiques de nouvelles générations

NK : natural killer

OMS : Organisation mondial de santé

Liste des tableaux

Tableau 1: Les critères de sélection des souches (Binda et al, 2020).....	6
Tableau 2: Les principaux effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine	9
Tableau 3: Principales espèces microbiennes utilisées comme probiotique	15
Tableau 4: Mesure de l'acide lactique	68
Tableau 5: Mesure de l'activité antioxydante des souches lactiques	69
Tableau 6: Mesure de l'activité antioxydante du témoin (acide ascorbique)	70
Tableau 7: Mesures des zones d'inhibition des souches probiotiques vis-à-vis les souches pathogènes	71
Tableau 8: Résultats de viabilité de différentes souches avec différents dilutions par UFC/ml	73
Tableau 9: résultats de viabilités des souches dans un MM additionné par différents prébiotiques	74
Tableau 10: Résultats de viabilité de différentes formulations de la souche S19 vis-à-vis les conditions gastriques	80

Liste des figures

Figure 1: Schéma résumant l'action des postbiotiques (Nectoux, 2022).	3
Figure 2 : Le microbiote Humain (Microbiote tractus digestif.svg)	4
Figure 3: schéma de la surface de l'épithélium intestinal (Xiao et Zhao, 2023)	5
Figure 4: mécanisme d'action des probiotiques (Rachelshoemaker, 2016)	9
Figure 5: Effets bénéfiques des probiotiques (Rachel, 2023)	11
Figure 6: Bifidobacterium longum BB 536 B (Guarner et Sanders, 2017).	12
Figure 7: Lactobacillus acidophilus (Sharifi et al , 2020)	12
Figure 8: Enterococcus faecium (Freshteh, 2022)	13
Figure 9: Bacillus coagulans (Gupta et Maity, 2021)	14
Figure 10: Saccharomyces boulardii (Bohbot et Zhioua, 2021)	14
Figure 11: Exemple de chaine de fabrication d'un probiotique (Zheng et al, 2020)	17
Figure 12: Facteurs environnementaux accélérant la dégradation des probiotiques	20
Figure 13: Principaux critères d'acquisition du statut « prébiotique » par les glucides végétaux (Wang, 2009)	26
Figure 14: Modèle schématique de l'hydrolyse du lactose et de la synthèse du GOS (Chem, 2021)	28
Figure 15: Effets direct et indirect des prébiotiques sur l'épithélium intestinal et le système immunitaire (Selle, 2019)	31
Figure 16: importance des prébiotiques (Greg, 2021)	32
Figure 17: Schéma représentatif de la microcapsule et de la microsphère	34
Figure 18: Représentation systématique de la technique d'encapsulation (Hoyos et al, 2018)	36
Figure 19: Les objectives de la micro-encapsulation (Hoyos et al, 2018)	37
Figure 20 : les méthodes utilisées en micro-encapsulation (Hoyos et al, 2018)	38
Figure 21: illustration des quatres systèmes d'émulsion (Hoyos et al, 2018)	39

Figure 22: schéma démontrant l'émulsification d'un probiotique (Hoyos et al, 2018).....	40
Figure 23 : illustration de la micro-encapsulation par coacervation (Zahao et al, 2020).....	41
Figure 24: Schema représentatif de la technique Spray Drying (Farahmandi et al, 2021).....	43
Figure 25: Des pelures d'orange broyé	51
Figure 26: Le mélange des pelures d'orange et d'eau distillée chauffé	51
Figure 27: Le filtrat à pectine	52
Figure 28: le filtrat à pectine avec l'éthanol après repos.....	52
Figure 29: Le précipité du filtrat (la pectine) après centrifugation.....	53
Figure 30: Mélange d'oignons et d'eau distillée sous agitation et chauffage	54
Figure 31: L'inuline après séchage.....	54
Figure 32: Dosage le l'acide lactique par titration (Phénolphthaline/NaOH).	57
Figure 33: Cultures de souches dans bouillon MRS après centrifugation.....	57
Figure 34: le mélange de surnageant avec DPPH après 30min d'incubation.....	58
Figure 35: Les dilutions d'acide ascorbique mélangé par DPPH après 30min d'incubation.....	58
Figure 36: Préparation de pectine et d'inuline en solution.....	61
Figure 37 : La disposition de la souche 04 en trois états : seul, avec inuline et avec pectine.....	62
Figure 38: flacons et tubes contenant les co-cultures avant incubation	63
Figure 39: La pectine extraite des pelures d'oranges fraîches.....	64
Figure 40: L'inuline obtenue de l'extraction	65
Figure 41: Lactobacillus sur gélose MRS incliné après incubation	66
Figure 42: Test d'activité antimicrobienne.....	71
Figure 43: Test de viabilité de différentes dilutions de la souche S19	73

Figure 44: viabilités des souches dans un milieu MM additionner par la pectine.....	76
Figure 45: Viabilité de la 1ere dilution de la souche S19 dans un MM+cellobiose.....	76
Figure 46: Viabilité de la 1ere dilution de la souche 09 dans le glucose (témoin).....	77
Figure 47: La souche 04 encapsulé dans les trois conditions	78
Figure 48: La souche 14 encapsulé dans les trois conditions	79
Figure 49: La souche 19 encapsulé dans les trois conditions	79
Figure 50: Filtration sous vide des capsules	80
Figure 51: Les formulations de S19 après incubation dans un suc gastrique simulé	81
Figure 52: La co-culture des probiotiques encapsulés avec <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Salmonella enterica</i> à t=0 après 24h d'incubation.....	82
Figure 53: La co-culture des probiotiques encapsulés avec <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Salmonella enterica</i> à t=24h après incubation	83
Figure 54: La co-culture des probiotiques encapsulés avec <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Salmonella enterica</i> à t=48h après incubation	84

Résumé

Face aux enjeux croissants de santé digestive et à l'intérêt mondial pour les aliments à valeur fonctionnelle, la synergie entre probiotiques et prébiotiques constitue une stratégie innovante dans le domaine de la nutrition santé. Ce mémoire s'inscrit dans une dynamique de valorisation biotechnologique des ressources microbiennes locales à travers l'encapsulation de bactéries probiotiques associées à des prébiotiques naturels issus de co-produits végétaux. L'étude a porté sur une souche probiotique locale isolée à partir de fromage de chèvre traditionnel. Après une caractérisation morphologique et fonctionnelle, la souche a démontré une excellente tolérance aux conditions gastro-intestinales simulées, une forte capacité de fermentation, ainsi qu'une production significative d'acide lactique. Par ailleurs, elle a révélé une activité antioxydante intéressante et un effet antimicrobien ciblé contre plusieurs pathogènes d'intérêt alimentaire. L'innovation du travail réside dans l'utilisation de prébiotiques naturels — l'inuline extraite d'oignons et la pectine obtenue à partir de pelures d'orange — ainsi que dans l'application d'une technique de microencapsulation douce et écoresponsable par gélification ionotropique. Cette encapsulation a permis d'assurer une haute viabilité de la souche en milieu gastrique simulé, tout en conservant son activité antimicrobienne en co-culture avec des souches pathogènes. Les résultats obtenus soulignent le potentiel technologique et fonctionnel de cette approche pour le développement de formulations nutraceutiques innovantes, contribuant à la valorisation durable de biomasses locales et à la conception de probiotiques de nouvelle génération.

Mots clés : probiotique ,prébiotique,microencapsulation,viabilité,activité antimicrobienne,fromage de chèvre

Abstract

In light of the growing challenges related to digestive health and the global interest in functional foods, the synergy between probiotics and prebiotics represents an innovative strategy in the field of nutritional health. This thesis is part of a biotechnological approach aimed at valorizing local microbial resources through the encapsulation of probiotic bacteria combined with natural prebiotics derived from plant-based by-products. The study focused on a local probiotic strain isolated from traditional goat cheese. Following morphological and functional characterization, the strain demonstrated excellent tolerance to simulated gastrointestinal conditions, strong fermentative capacity, and significant lactic acid production. Additionally, it exhibited noteworthy antioxidant activity and targeted antimicrobial effects against several foodborne pathogens. The innovative aspect of this work lies in the use of natural prebiotics—namely inulin extracted from onions and pectin obtained from orange peels—combined with the application of a gentle and eco-friendly microencapsulation technique based on ionotropic gelation. This encapsulation method ensured high viability of the strain under simulated gastric conditions while preserving its antimicrobial activity in co-culture with pathogenic strains. The results highlight the technological and functional potential of this approach for the development of innovative nutraceutical formulations, promoting the sustainable valorization of local biomass and contributing to the design of next-generation probiotics.

Keywords: probiotic, prebiotic, microencapsulation, viability, antimicrobial activity, goat cheese

ملخص

في ظل التحديات المتزايدة المرتبطة بصحة الجهاز الهضمي والاهتمام العالمي المتنامي بالأغذية ذات القيمة الوظيفية، تمثل العلاقة التكاملية بين البروبيوتيك والبريبايوتيك استراتيجية مبتكرة في مجال التغذية الصحية. يندرج هذا البحث ضمن نهج بيوتكنولوجي يهدف إلى تجميع الموارد الميكروبية المحلية من محاور. خلال تغليف البكتيريا البروبيوتيك مع بربايوتيكات طبيعية مستخلصة من منتجات نباتية ثانوية الدراسة حول عزلة بروبيوتيك محلية تم الحصول عليها من جبن الماعز التقليدي. وبعد توصيفها شكلياً ووظيفياً، أظهرت هذه العزلة قدرة عالية على تحمل ظروف الجهاز الهضمي المحاكية، وكفاءة تخميرية قوية، بالإضافة إلى إنتاج ملحوظ لحمض اللاكتيك. كما أظهرت نشاطاً مضاداً للأكسدة وتأثيراً مضاداً

تكمّن القيمة الابتكارية لهذا العمل في للميكروبات موجهًا ضد عدة سلالات ممرضة ذات أهمية غذائية استخدام بروبوتيكات طبيعية — الإنولين المستخلص من البصل والبكتين المستخلص من قشور البرتقال — إلى جانب تطبيق تقنية تغليف دقيقة وصديقة للبيئة تعتمد على الجلّ الأيوني. وقد مكّن هذا التغليف من الحفاظ على حيوية عالية للعزلة داخل وسط معدي محاكي، مع الحفاظ على نشاطها المضاد للميكروبات تؤكد النتائج المحصلة الإمكانيات التكنولوجية والوظيفية. أثناء التشارك في الزراعة مع سلالات ممرضة لهذا النهج في تطوير تركيبات غذائية علاجية (نيوتراسوتيكال) مبتكرة، تساهم في تثمين الكتلة الحيوية المحلية بطريقة مستدامة، وتسهم في تصميم بروبوتيكات من الجيل الجديد

الكلمات المفتاحية: البروبيوتيك , البريبايوتيك ,التغليف المجهري ,القابلية للحياة ,النشاط المضاد للميكروباتة ,جين الماعز.

Table des matières

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

Chapitre I : les probiotiques

I.1. Histoire des probiotiques :.....	2
I.2. Définitions des probiotiques :.....	2
I.3. Notions complémentaires :	2
I.3.1. Prébiotiques :.....	2
I.3.2. Synbiotique :	3
I.3.3. Microbiote :.....	4
I.4. Critères de choix d'un probiotique :	5
I.5. Mécanismes d'action des probiotiques :	7
I.6. Effets bénéfiques sur la santé humaine :.....	8
I.7. Les microorganismes probiotiques :	11
I.7.1. Genre <i>Bifidobacterium</i> :.....	11
I.7.2. Genre <i>Lactobacillus</i> :	12
I.7.3. Genre <i>Entéroccocus</i> :	13
I.7.4. Genre <i>Bacillus</i> :.....	13
I.7.5. Levures :.....	14
I.8. La fabrication des probiotiques :.....	16
I.9. Critères de sécurités :.....	17
I.10. Facteurs qui influent sur les probiotiques :	19
I.10.1. Humidité :.....	19
I.10.2. Chaleur :	19
I.10.3. L'oxygène :	19
I.10.4. La lumière :	20
I.11. Les probiotiques de nouvelles générations :	20

Chapitre II : les prebiotiques

II.1. Histoire et Définitions des prébiotiques :	22
II.2. Critères de sélection des prébiotiques:	25

II.3. Types de prébiotiques :	26
II.3.1. Fructanes :	27
II.3.2. Les galacto-oligosaccharides (GOS) :	27
II.3.3. Oligosaccharides dérivés de l'amidon et du glucose :	28
II.3.4. Oligosaccharides non glucidiques :	29
II.4. Mécanismes d'action :	29
II.5. Les effets directs des prébiotiques sur l'organisme :	30
II.5.1. La modulation du microbiote :	30
II.5.2. Interaction avec les cellules épithéliales :	30
II.5.3. Interaction avec les cellules du système immunitaire :	30
II.6. Autres effet prébiotique :	32
II.7. Sources des prébiotiques :	32
II.8. Les prébiotiques dans les compléments alimentaires : on retrouvera les prébiotiques dans des (Greg, 2021) :	33

Chapitre III : la micro-encapsulation

III.1. Définition de la micro-encapsulation :	34
III.2. La microencapsulation des probiotiques et prébiotiques :	35
III.3. Les objectifs de la micro-encapsulation des probiotiques/ prébiotiques :	36
III.4. Les technologies utilisés dans la micro-encapsulation des probiotiques et prébiotiques:	37
III.4.1. Emulsification :	38
III.4.2. La coacervation :	40
III.4.3. Spray drying :	42
III.4.4. Lyophilisation et séchage sous vide :	43
III.4.5. Extrusion :	44
III.5. Les matériaux d'encapsulation des probiotiques et prébiotiques :	44
III.5.1. Choix de la matrice d'encapsulation :	45
III.5.1.1. Polysaccharides :	45

III.5.1.2. Protéines :	48
III.5.1.3. Fibres prébiotiques naturelles :	49

Chapitre IV : matériel et méthodes

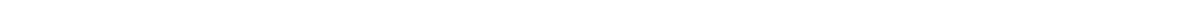
IV.1. Présentation du lieu de travail :	50
IV.2. Extraction des prébiotiques :	50
IV.2.1. Extraction de la pectine :	50
IV.2.2. Extraction d'inuline :	53
IV.3. Les souches probiotiques :	55
IV.3.1. Test de l'activité anti-oxydante des souches :	57
IV.3.2. Les test de viabilité :	59
IV.3.2.1. Dans un milieu minimum :	59
IV.3.2.2. Dans un suc gastrique simulé :	59
IV.3.3. Activité antimicrobienne :	60
IV.4. La micro-encapsulation des probiotiques et prébiotiques :	61
IV.4.1. Efficacité de l'encapsulation :	62
IV.4.2. Test de viabilité des capsules dans un suc gastrique simulé :	62
IV.5. Co-culture d'un probiotique potentiel, de <i>Salmonella</i> et de <i>Staphylococcus</i> :	63

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Les prébiotiques extraites :	64
V.1.1. Extraction de la pectine :	64
V.1.2. Extraction de L'inuline :	64
V.2. Caractères morphologiques et microscopiques :	65
V.3. Résultats du Dosage de PH et de l'acide lactique des souches probiotiques :	66
V.4. Résultats de l'activité antimicrobienne :	71
- Vis-à-vis de <i>Salmonella enterica</i> :	72
- Vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i> :	72
V.5. Résultats des tests de viabilité :	73

V.6. Résultats de la micro-encapsulation :	78
V.7. Résultats des co-cultures :	81
Conclusion générale.....	85
Références bibliographiques.....	89
Annexes	98

INTRODUCTION



Introduction

Ces dernières années, les liens entre l'alimentation, le microbiote intestinal et la santé humaine ont fait l'objet d'un intérêt croissant de la part de la communauté scientifique et des industries agroalimentaires. Dans ce contexte, les probiotiques — définis comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte (FAO/OMS, 2002 ; Hill et al., 2014) — jouent un rôle clé dans la modulation de l'écosystème intestinal, la prévention des infections et le renforcement de l'immunité. Parallèlement, les prébiotiques — des substrats non digestibles utilisés sélectivement par les micro-organismes bénéfiques — favorisent leur croissance et leur activité (Gibson et al., 2017). L'association synergique des deux, connue sous le nom de synbiotiques, ouvre de nouvelles perspectives pour la nutrition santé et les aliments fonctionnels de nouvelle génération.

Toutefois, la viabilité des probiotiques dans les produits alimentaires et surtout dans le tractus gastro-intestinal reste un défi majeur. En effet, ces bactéries sont souvent exposées à des conditions extrêmes (acidité gastrique, sels biliaires, enzymes digestives) qui compromettent leur survie et donc leur efficacité. Pour pallier cette problématique, la micro-encapsulation s'impose comme une solution technologique innovante, permettant de protéger les cellules vivantes contre les stress environnementaux tout en contrôlant leur libération ciblée dans l'intestin (Kailasapathy, 2009 ; Anal & Singh, 2007). Les techniques douces, telles que la gélification ionotropique, offrent une alternative prometteuse, en particulier lorsqu'elles sont combinées à des matériaux naturels comme l'alginate, la pectine ou le chitosane.

Dans une logique de durabilité et de valorisation des ressources locales, l'intérêt se porte également sur l'utilisation de prébiotiques naturels issus de co-produits végétaux, tels que l'inuline extraite du bulbe d'oignon ou la pectine provenant des pelures d'agrumes. Ces composés présentent non seulement une activité prébiotique documentée, mais participent aussi à la réduction des déchets agroalimentaires et à l'économie circulaire (Roberfroid, 2020 ; Slavin, 2013).

C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail, qui vise à étudier la micro-encapsulation d'une souche probiotique locale isolée à partir de fromage de chèvre traditionnel, enrichie avec des prébiotiques naturels extraits de matières végétales. L'objectif est double : améliorer la viabilité et la fonctionnalité de la souche probiotique, et évaluer son potentiel technologique et biologique à travers des tests de tolérance aux conditions gastriques simulées, d'activité antimicrobienne et d'interaction avec des prébiotiques spécifiques. L'approche adoptée intègre des technologies respectueuses de l'environnement et des principes de bioéconomie, avec la perspective de développer des formulations nutraceutiques innovantes et durables.

Problématique :

Malgré les avancées dans le développement de formulations probiotiques, la survie des souches bactériennes vivantes jusqu'au site d'action dans l'intestin reste un obstacle majeur à leur efficacité. Les conditions extrêmes du tractus gastro-intestinal, couplées aux contraintes technologiques liées à la transformation alimentaire (température, pression, pH), compromettent souvent la viabilité des probiotiques. De plus, la sélection de supports encapsulants efficaces et sûrs, ainsi que l'identification de prébiotiques d'origine naturelle et locale présentant une synergie réelle avec les souches probiotiques, constituent encore un champ de recherche ouvert. Dans ce contexte, comment assurer à la fois la protection, la fonctionnalité et l'efficacité des probiotiques dans un environnement hostile, tout en valorisant des ressources végétales disponibles localement ?

Hypothèse scientifique :

Nous posons l'hypothèse que la microencapsulation d'une souche probiotique locale par gélification ionotrope, associée à des prébiotiques naturels extraits de sous-produits végétaux, permettrait d'améliorer sa résistance aux conditions gastro-intestinales simulées, tout en conservant ou en renforçant ses propriétés fonctionnelles telles que l'activité antimicrobienne et la production d'acide lactique. Ce système symbiotique pourrait ainsi constituer une base prometteuse pour le développement de produits nutraceutiques innovants.

Objectifs de l'étude :Objectif général :

Contribuer à l'étude de la micro-encapsulation d'une souche probiotique locale associée à des prébiotiques naturels, en vue d'optimiser sa viabilité, sa fonctionnalité et son potentiel d'application nutraceutique.

Objectifs spécifiques :

1. Revivification des souches probiotiques locales à partir de fromage de chèvre artisanal.
2. Extraire et purifier des prébiotiques naturels (inuline et pectine) à partir de matières végétales locales (oignon et pelures d'orange).
3. Évaluer la viabilité et les capacités fonctionnelles de la souche probiotique (acidité, tolérance gastrique, activité antioxydante, pouvoir antimicrobien).
4. Mettre en œuvre une micro-encapsulation de la souche par gélification ionotrope avec enrobage au chitosane.
5. Analyser l'effet de l'encapsulation sur la survie de la souche en milieu gastrique simulé et sa capacité à inhiber des bactéries pathogènes en co-culture.

6. Proposer une valorisation nutraceutique de la formulation encapsulée pour une application potentielle dans les aliments fonctionnels.

PARTIE I : SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES PROBIOTIQUES

I.1. Histoire des probiotiques :

En 1906, le pédiatre français Henry Tissier a observé que les selles des enfants souffrant de diarrhées contenaient un faible nombre de bifidobactéries par rapport aux selles d'enfants en bonne santé. Il suggéra alors d'administrer ces bactéries aux patients diarrhéiques pour les aider à restaurer un microbiote intestinal sain. La notion de probiotiques a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff en 1907 (Metchnikoff, 1907). Ce prix Nobel suggérait que la bonne santé et la longévité des paysans bulgares étaient dues à leur consommation de produits laitiers fermentés. Pour lui la consommation de *Lactobacillus* influençait positivement la microflore intestinale, diminuait la purification et les activités toxiques microbiennes. Il a ainsi proposé l'ingestion de bactéries lactiques pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive et donc augmenter l'espérance de la vie. (Bornes, 2020)

En 1965, Lilly et Stillwell consacrent le terme des probiotiques comme des substances produites par des microorganismes qui favorisent la croissance d'autres microorganismes. (Martin, 2022)

La Consultation mixte (FAO/OMS) de 2002 a redéfini les probiotiques comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, confère à l'hôte un bénéfice pour la santé. C'est cette définition qui est généralement retenue aujourd'hui au niveau international. (Bornes, 2020)

I.2. Définitions des probiotiques :

Selon la définition consensuelle de l'OMS, un probiotique est un microorganisme vivant qui, lorsqu'il est administré en quantité adéquate, produit un bénéfice pour la santé de l'hôte. Ces micro-organismes sont constitués par des bactéries ou des levures (Jradi, 2018)

I.3. Notions complémentaires :

I.3.1. Prébiotiques :

Les prébiotiques sont des glucides à chaîne courte non digestibles qui agissent comme substrats pour les bactéries probiotiques dans l'intestin telles que *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Les prébiotiques les plus connus comprennent

les galacto-oligosaccharides, les fructo-oligosaccharides et l'inuline et se trouvent naturellement dans divers aliments, peuvent également être utilisés en combinaison avec des probiotiques (synbiotiques) pour améliorer les effets d'un probiotique. Cela s'est avéré plus efficace pour modifier la composition de la microbiote intestinale que l'utilisation d'un probiotique seul (Hyland et Stanton, 2023).

I.3.2. Synbiotique :

Un synbiotique est une combinaison de substances – essentiellement un probiotique et un prébiotique. Mais parfois, un synbiotique est une association de substances qui ne peuvent pas être considérées comme des probiotiques et des prébiotiques à elles seules. Ainsi, tout micro-organisme vivant et toute nourriture pour micro-organismes vivants qui, combinés, vous apportent un bénéfice pour la santé, peuvent être considérés comme des synbiotiques (Swanson et al, 2020)

Une autre définition est celle de « synbiotique » : il s'agit de produit qui combine à la fois un prébiotique et un probiotique, Plus récemment, ont été défini ce que sont les « postbiotiques » (Figure 01) (Nectoux, 2022).

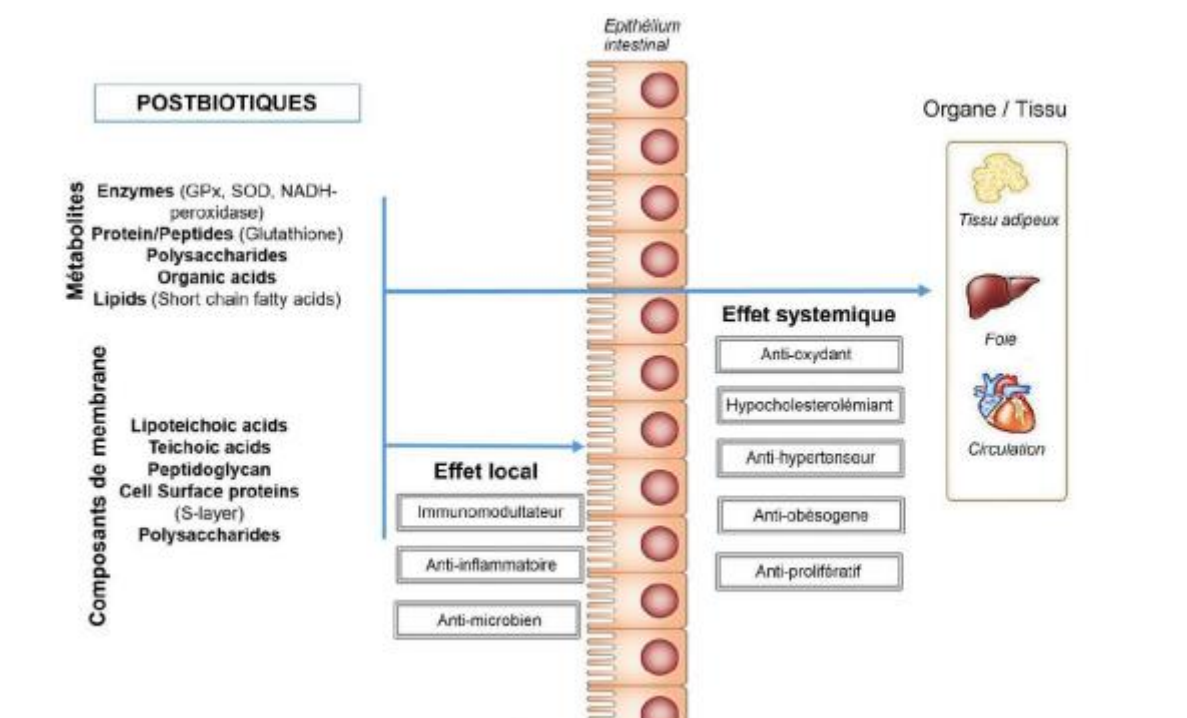


Figure 1: Schéma résumant l'action des postbiotiques (Nectoux, 2022).

I.3.3. Microbiote :

Le microbiote est l'ensemble des micro-organismes retrouvés dans une flore. Il n'y a donc pas un, mais des microbiote : intestinal, oral (ou buccal), vaginal, cutané, de l'estomac... Si le microbiote intestinal est très riche, seule une répartition équilibrée des espèces bactériennes lui permet d'assurer l'ensemble de ses fonctions. Cet équilibre, où cohabitent un microbiote favorable et un hôte en bonne santé, définit l'eubiose. Mais il est fragile et de nombreux facteurs intrinsèques (stress, infections...) et/ou extrinsèques (antibiotiques, chimiothérapies, modification du régime alimentaire...) peuvent le perturber, aboutissant à un état de dysbiose. Les microbiotes des différentes parties du corps humain vont se mettre en place progressivement à partir de la naissance avec une forte dynamique durant la période des 1000 premiers jours après la naissance (Xiao et Zhao, 2023).

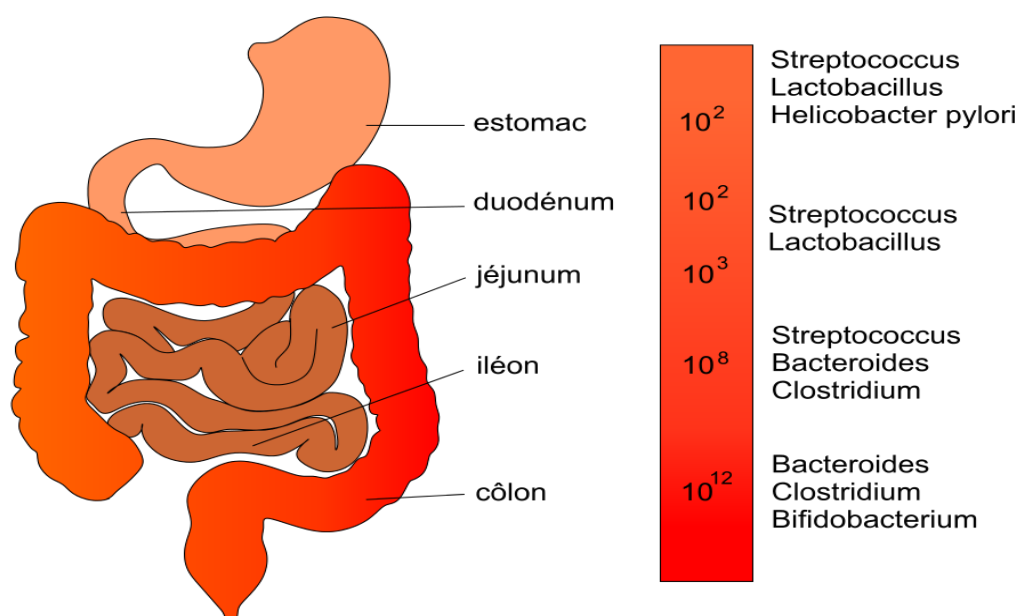


Figure 2 : Le microbiote Humain (Microbiote tractus digestif.svg)

La simple couche de cellules épithéliales recouvrant l'organisme n'est séparé de l'environnement extérieur que par son microbiote et quelques sécrétions telles que le mucus. Ces 2 éléments participent à la protection de l'hôte contre

les traumatismes, les acides, les enzymes, les substances irritantes ou nocives et les agents pathogènes. Le microbiote participe à la fonction de barrière de l'épithélium de plusieurs manières (Xiao et Zhao, 2023).

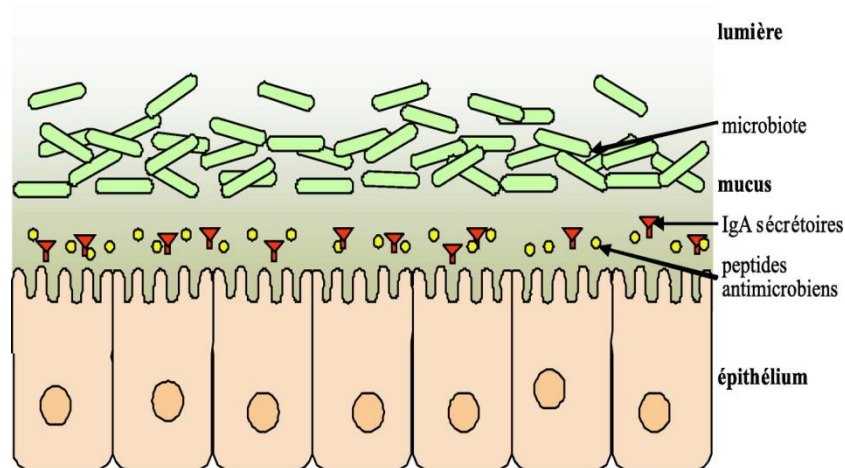


Figure 3: schéma de la surface de l'épithélium intestinal (Xiao et Zhao, 2023) .

I.4. Critères de choix d'un probiotique :

Le choix des probiotiques dépend à la fois de leurs propriétés spécifiques et du type d'utilisation envisagé. Ces propriétés sont intrinsèques à chaque souche et ne peuvent pas être généralisées d'une souche à une autre, même au sein d'une seule espèce. » (Kagambèga et al, 2019)

Pour que les micro-organismes soient considérés comme des probiotiques, les critères suivants doivent être remplis : selon (Binda et al, 2020)

Tableau 1: Les critères de sélection des souches (Binda et al, 2020)

Critères de sécurité	- Nom correct selon les règles de nomenclature bactérienne. - Identifié génétiquement au niveau du genre, de l'espèce et de la souche. - Non nocif ni infectieux. - Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques.
Critères fonctionnels	- Résistance à l'acidité gastrique, à la bile et aux enzymes digestives. - Production de substances antimicrobiennes telles que des bactériocines, des acides organiques, ou d'autres composés inhibiteurs, avec un antagonisme envers les pathogènes. - Survie dans les sites pertinents de l'organisme. - Adhésion au mucus ou aux cellules épithéliales intestinales. - Stimulation de système immunitaire. - Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé
Critères technologiques	- stables et viables pendant une longue période au cours du processus de stockage et de fermentation des aliments. - Préservation des bienfaits probiotiques postproduction. - Conservation des qualités sensorielles du produit final.

I.5. Mécanismes d'action des probiotiques :

Les microorganismes probiotiques sont reconnus pour leur capacité à promouvoir la santé de l'hôte, bien que les mécanismes exacts de cette action restent à expliquer. Des recherches ont été menées pour comprendre le fonctionnement des probiotiques (Mazziotta et al, 2023).

- A. **La digestion :** Les probiotiques favorisent la synthèse et, par conséquent, l'augmentation de nombreuses enzymes digestives, ce qui entraîne une amélioration de la digestion et de l'absorption au niveau intestinal. Ceci peut être particulièrement bénéfique pour les individus présentant naturellement un déficit de production enzymatique (Khushboo et al, 2023).
- B. **Transit intestinal :** Le temps que la nourriture passe à travers le système digestif dépend de la façon dont les intestins bougent, surtout le côlon. Les mouvements des intestins sont importants pour éviter que les mauvaises bactéries ne se développent trop. Par exemple, lorsque les intestins bougent rapidement, cela limite la croissance des bactéries nocives (Dasriya et al, 2024).

Modification du PH intestinal : Les bactéries lactiques agissent en fermentant, ce qui produit des composés comme le lactate, l'acétate. Ces substances sont acides et abaissent le pH intestinal. Cette acidification limite la croissance de certaines bactéries, telles que *Escherichia coli*, qui sont Gram-négatives, et réduit ainsi leur pathogénicité (Cela et al, 2023).

Renforcement de la barrière épithéliale : Les dysfonctionnements de la barrière épithéliale intestinale (BEI) jouent un rôle central dans de nombreuses pathologies pédiatriques, notamment dans le développement des allergies alimentaires chez l'enfant. La maturation post-natale de la BEI est influencée par divers facteurs, notamment le microbiote. Dans ce contexte, certaines souches probiotiques pourraient se révéler utiles pour atténuer les dysfonctionnements de la BEI chez les nourrissons associés aux allergies (Vanhaecke et al, 2017).

- C. **Production de substances inhibitrices :** Les probiotiques, en produisant divers composés antibactériens tels que les bactériocines, les acides

organiques, les acides gras libres, l'ammoniac et le peroxyde d'hydrogène, ont la capacité de restreindre la croissance des agents pathogènes dans le tractus intestinal (Nectoux, 2022)

D. Compétition pour l'adhésion : Les souches probiotiques rivalisent avec les bactéries pathogènes pour s'attacher aux sites de la surface épithéliale de l'intestin. En faisant cela, ces probiotiques empêchent certaines espèces pathogènes de coloniser et de s'attacher (Halloran et Underwood, 2019).

Certaines souches de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* ont la capacité de se fixer à la surface de la muqueuse intestinale, renforçant ainsi la fonction barrière et limitant l'invasion des pathogènes. Il est démontré que, dans des conditions in vitro, des souches probiotiques ont le pouvoir d'empêcher l'adhésion de pathogènes voire même de les déplacer de leurs sites de fixation au niveau de l'intestin (Malbos, 2021).

E. Compétition pour les nutriments : L'ajout de microorganismes supplémentaires au niveau du microbiote du fait de l'ingestion de probiotiques va induire une augmentation de la demande en substrats. Cela va donc provoquer un phénomène de compétition entre pathogènes et probiotique pouvant aboutir à une diminution de la croissance des pathogènes (Nectoux, 2022).

I.6. Effets bénéfiques sur la santé humaine :

Les probiotiques ont fait l'objet d'une exploration étendue à la fois dans la recherche et sur le marché commercial, avec une grande variété de produits disponibles mondialement. Cependant, il est admis que l'efficacité des probiotiques peut varier considérablement et que les résultats peuvent différer selon les souches utilisées (Mazzantini et al, 2021).

How Probiotics Work

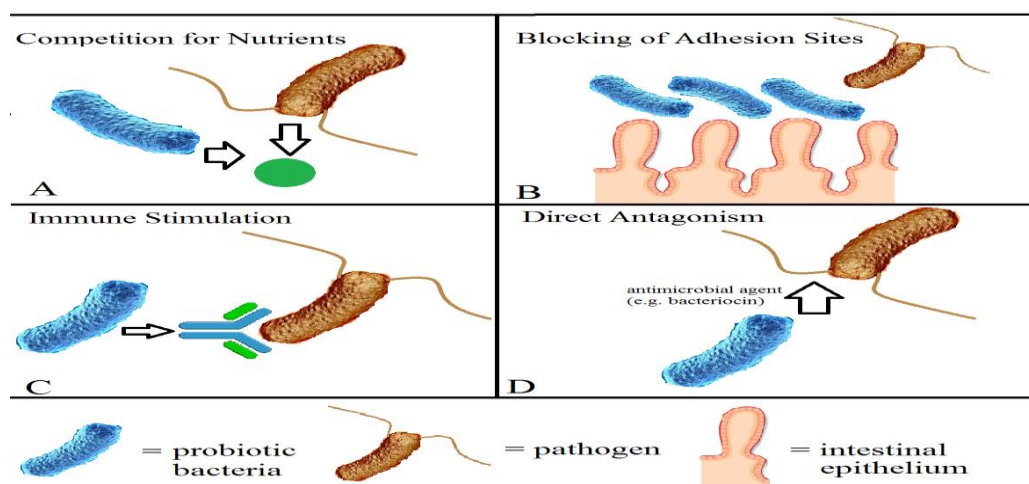


Figure 4: mécanisme d'action des probiotiques (Rachelshoemaker, 2016)

Tableau 2: Les principaux effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine

Effet sur l'intestin	Effet sur le système immunitaire	Autres effets
Contrôle des troubles : - A <i>Helicobacter pylori</i> : Bactérie Gram négatif responsable de la gastrite de type B, d'ulcères et du carcinoïde gastrique. Contrôle par Inhibition compétitive pour les sites de colonisation - A <i>Clostridium difficile</i> : Bactérie gram positive, anaérobie stricte, le principal entéropathogène responsable de diarrhée chez l'adulte, Le probiotique <i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745 empêche	Modulation du système immunitaire : - Stimulation des cellules immunitaires (ex : macrophage) - Production des cytokines - Inhibition de la production des pro-inflammatoires - Renforcement de la barrière intestinale	Réduit les risques des maladies par exemple : - Cancer (Certaines souches de <i>L. acidophilus</i> et de <i>Bifidobacterium spp</i>, sont rapportés pour diminuer les niveaux d'enzymes telles que azoréductase β-glucuronidase, et nitroréductase responsables de l'activation des procarcinogènes et par conséquent diminuent le risque de développement

les infections à C. difficile - De l'Intestin irritable Constipation.		tumoral).
Lutte contre les diarrhées : - Infectieuse - Liées aux ATB - Du voyageur	Réduit les risques d'infection par : - Compétition sur les sites d'adhésion - Production d'ATB naturels - Amélioration de la barrière intestinale	Réduit le taux d'obésité : - Par modulation des hormones qui régulent l'appétit et la satiété ce qui contribue à la réduction de l'obésité.
Confort digestif par : - Amélioration de la digestion en produisant des enzymes digestives. - Production de mucines et amélioration de la cohésion entre les cellules épithéliales.	Régule les allergies : - Production d'AC - Production d'anti-inflammatoires.	Optimise l'effet du vaccin en : - Améliorant la réponse immune par stimulation des cellules B et amélioration de la fonction des cellules T.
Améliore l'intolérance au lactose : - Plusieurs études ont montré que la β -galactosidase participait à la digestion du lactose dans l'intestin.	Lutte contre les inflammations : - Ils ont la capacité de réguler le profil des médiateurs impliqués dans l'inflammation : ils stimulent la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires.	Agit sur plusieurs maladies telle que : - Diabète/ Alzheimer/ santé génito-urinaires maladies des voies respiratoires. - Réduit le taux de cholestérol: assimilation par les enzymes bactériennes.

LES BIENFAITS DES PROBIOTIQUES

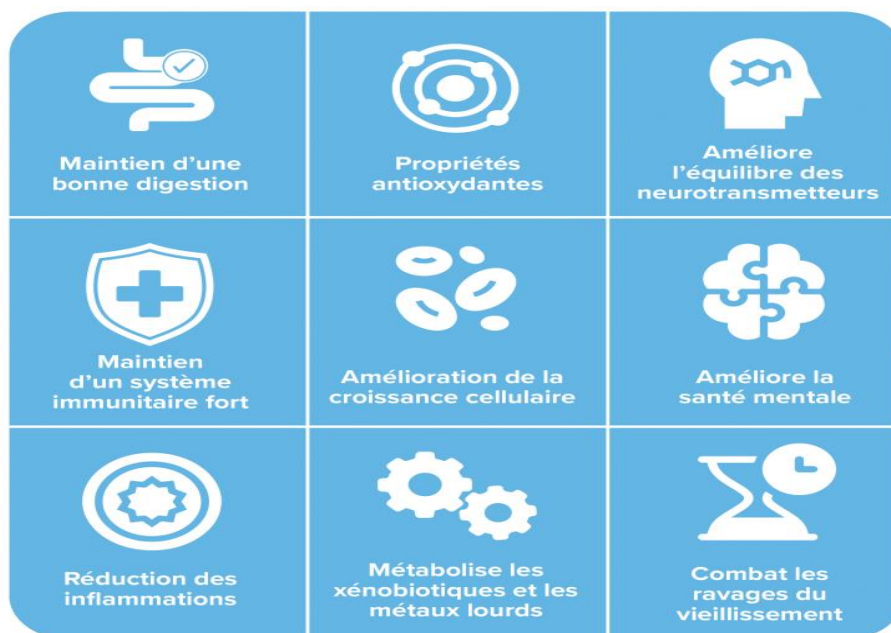


Figure 5: Effets bénéfiques des probiotiques (Rachel, 2023)

I.7. Les microorganismes probiotiques :

Pour qu'un micro-organisme soit considéré comme un probiotique, la validation des bénéfices pour la santé, l'identification de la souche et d'autres caractéristiques sont nécessaires). D'un point de vue scientifique, la classification de tout organisme biologique consiste à regrouper les organismes en groupes taxonomiques (taxons) basés sur les similitudes ou les relations, Les organismes probiotiques sont classés selon leur genre, espèce, sous-espèce et une désignation alphanumérique, selon l'Organisation mondiale de gastroentérologie (Guarner et Sanders, 2017).

I.7.1. Genre *Bifidobacterium* :

Les Bifidobactéries sont des bactéries anaérobies à Gram positif (qui se développent en l'absence d'oxygène), de forme bâtonnée, non productrices de gaz, non sporulantes et non mobiles. Les Bifidobactéries sont des micro-organismes d'une importance capitale dans le tractus gastro-intestinal et génito-urinaire, dont

le ratio exact dépend principalement de l'âge et du régime alimentaire. Parmi ces actions positives : prévention des DAA, prévention de la diarrhée nosocomiale (Guarner et Sanders, 2017).

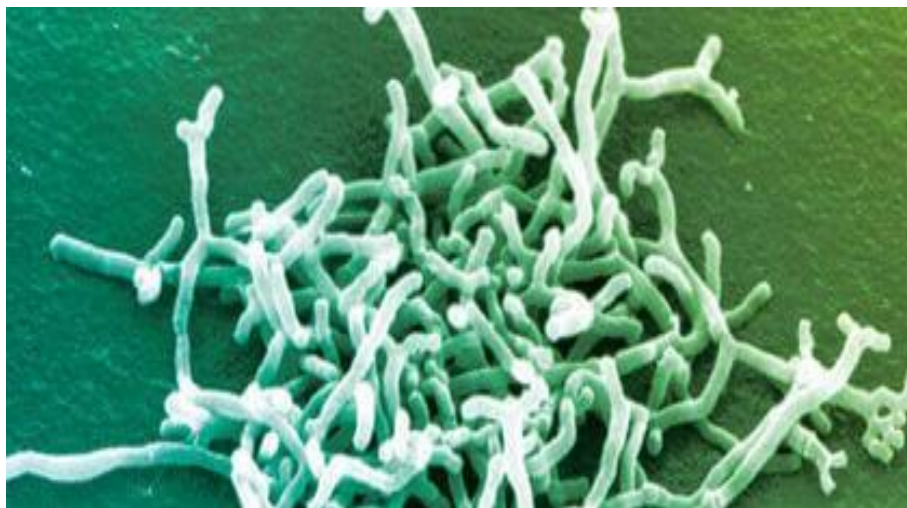


Figure 6: *Bifidobacterium longum* BB 536 B (Guarner et Sanders, 2017).

I.7.2. Genre *Lactobacillus* :

Les Lactobacilles se caractérisent par leur forme de bacille ou de cocos à Gram positif, non sporulant et non flagellés, capables de croître dans des milieux avec ou sans oxygène et strictement fermentaires. Les lactobacilles sont répartis le long du tractus gastro-intestinal et génital. Leur distribution est affectée par plusieurs facteurs environnementaux tels que le pH, la disponibilité en oxygène, le niveau de substrats spécifiques, la présence de sécrétions et les interactions bactériennes. Parmi ces effets : La stimulation des globules blancs (CD8⁺ et NK), prévention de la diarrhée lié à *Clostridium difficile* (Sharifi et al , 2020)



Figure 7: *Lactobacillus acidophilus* (Sharifi et al, 2020)

I.7.3. Genre *Entéroccocus* :

Gram positives, sphériques ou ovales sont commensaux de l'intestin humain, certaines souches d'entérocoques, notamment *Enterococcus faecium* de type non-pathogène, ont montré des effets positifs en tant que probiotiques, comme la prévention de la diarrhée, l'amélioration de la santé intestinale et la stimulation du système immunitaire. (Freshteh, 2022)

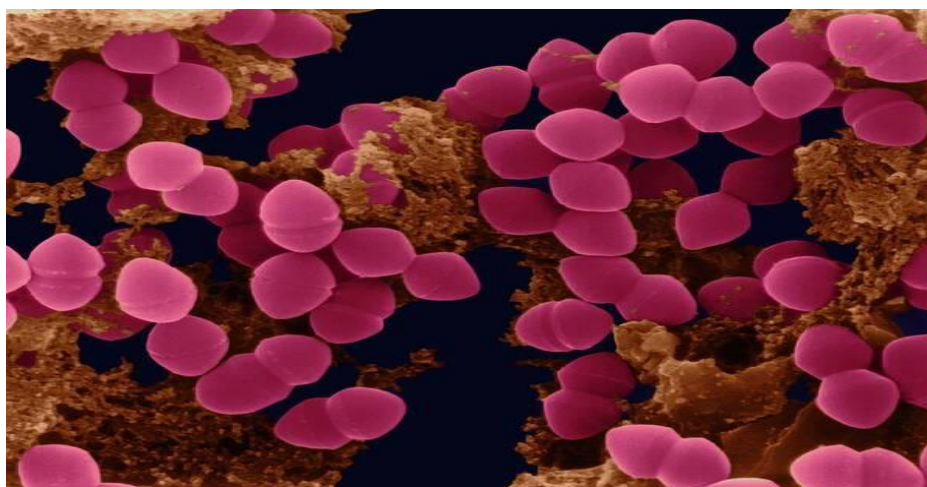


Figure 8: *Enterococcus faecium* (Freshteh, 2022)

I.7.4. Genre *Bacillus* :

Bacillus est un genre de bactéries à Gram positif, appartenant à la famille des *bacillacées*. Ces bactéries probiotiques sont également d'excellents moyens de garantir l'équilibre de la flore intestinale des adultes et d'assurer leur santé intestinale en inhibant les bactéries pathogènes responsables d'inflammations. *B. coagulans* permettent de lutter contre les symptômes du syndrome du côlon irritable. Sous forme de spores, il résiste au liquide gastrique et à la bile et ne peut pas être lysé pendant les processus de fabrication et de stockage. Dans le duodénum, les spores de *B. coagulans* peuvent germer en bactéries végétatives présentant une activité probiotique et ensuite excrétées par le corps sans altération de la composition de la microflore humaine individuelle. (Gupta et Maity, 2021)



Figure 9: *Bacillus coagulans* (Gupta et Maity, 2021)

I.7.5. Levures :

Saccharomyces boulardii : *S. boulardii* est l'une des souches probiotiques les plus étudiées au monde, avec près d'une centaine d'études cliniques publiées, ayant évalué les effets de cette levure chez plus de 10 000 sujets. *S. boulardii* est particulièrement adaptée dans la mesure où elle se développe de manière optimale à la température de notre corps (37°C) et dans un milieu présentant une faible acidité (comme l'intestin grêle). Par ailleurs, *S. boulardii* résiste bien à l'acidité de l'estomac. Les bienfaits de *S. boulardii* ont été étudiés principalement chez l'adulte et l'enfant confrontés à des diarrhées induites par les antibiotiques, ou lors d'une infection par la bactérie *Clostridium difficile*. (Bohbot et Zhioua, 2021)

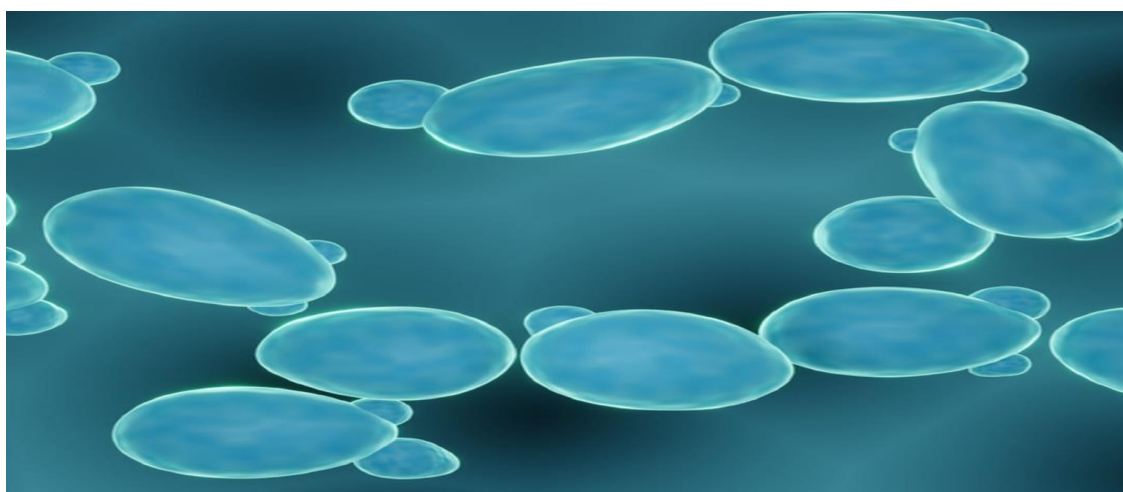


Figure 10: *Saccharomyces boulardii* (Bohbot et Zhioua, 2021)

Tableau 3: Principales espèces microbiennes utilisées comme probiotique

Genre	Espèce
<i>Bifidobacterium</i>	- <i>B. longum</i> BB536 B. - <i>B. breve</i> - <i>B. Lactis</i> Bb12 - <i>B. Lactis</i> HNO19 - <i>B. Animalis</i> DNI 73010 - <i>B. Infantis</i> 35264
<i>Lactobacillus</i>	- <i>L. acidophilus</i> La5 - <i>L. casei</i> DN114001 - <i>L.renteri</i> ATCC55730 - <i>L.delbreckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038 - <i>L.gasseri</i> K7 - <i>L. johnsonni</i> <i>L.paracasei</i> F19 - <i>L.paracasei</i> 299V - <i>L. rhamnosus</i> GG
Autres bactéries lactiques	- <i>Streptococcus thermophilus</i> 1131 - <i>Enterococcus faecalis</i> symbioflor - <i>E.faecium</i> SF68 - <i>Pediococcus acidolactici</i>
Microorganisms non lactiques	- <i>Bacillus subtilis</i> - <i>B. cereus</i> - <i>Saccaromyces boulardii</i> - <i>S. cerevisiae</i>

I.8. La fabrication des probiotiques :

La fabrication des probiotiques exige la maîtrise d'un procédé technique délicat et des contrôles stricts répétés à chaque étape de la chaîne de production. Elle doit en effet garantir au consommateur un produit fini répondant à toutes les normes de qualité et de sécurité. Les micro-organismes probiotiques doivent rester vivants, en nombre suffisant et stable jusqu'à la fin de la durée de conservation du produit, être correctement dosés pour le bénéfice annoncé et être exempts de contaminants, leurs fabrications peut se résumer en ces étapes (Fenster et al, 2019) :

- 1) **La mise en culture :** Le micro-organisme sélectionné est mis en culture avec des substances nutritives stérilisées afin qu'il se multiplie.
- 2) **Fermentation industrielle :** Cette première culture est transférée dans des fermenteurs successifs (de taille moyenne, puis plus grands) pour une production industrielle. Les conditions de croissance et l'absence de contaminants doivent être étroitement contrôlées.
- 3) **Centrifugation :** Après leur multiplication, les micro-organismes sont séparés de leur milieu de culture par centrifugation ou filtration.
- 4) **Lyophilisation :** La pâte obtenue contenant les microorganismes va ensuite subir une congélation rapide puis une déshydratation pour en extraire l'eau, c'est la lyophilisation qui va permettre d'évaporer au moins 96%⁵³ de l'humidité restante. Ainsi les micro-organismes se conservent mieux tout en restant vivants.
- 5) **Transformation en poudre et mélange :** près lyophilisation est broyé en fine poudre pour être mélangé (suivant le processus de production du fabricant) à des excipients
- 6) **Conditionnement :** La poudre est ensuite conditionnée dans son format définitif (gélules, sachets, ampoules...). Le choix et la qualité du format utilisé doit permettre d'augmenter la stabilité du produit. Ils sont enfin emballés dans leur contenant final ou boîte.
- 7) **Stockage :** Les probiotiques emballés sont stockés dans des environnements contrôlés (température, humidité...).
- 8) **Distribution des lots :** Ils sont enfin livrés sur leur point de vente, par exemple en pharmacie.

A chaque étape de la production - voire même plusieurs fois au cours d'une même étape - des contrôles doivent être réalisés sur les échantillons pour vérifier que le produit est conforme, c'est-à-dire que la qualité et la pureté sont optimales. Il est nécessaire que les micro-organismes soient toujours vivants et sans danger pour leur consommation. Pour que les consommateurs puissent avoir le maximum de confiance dans la qualité de leurs produits, certains laboratoires ont recours, en plus de leurs propres contrôles, à des organismes extérieurs et indépendants qui vérifient que l'ensemble des processus de fabrication et de contrôle qualité sont conformes à la réglementation et aux bonnes pratiques (Zheng et al, 2020)



Figure 11: Exemple de chaîne de fabrication d'un probiotique (Zheng et al, 2020)

I.9. Critères de sécurités :

- a) **Identification de la souche** : L'identification des souches, qui se fait par des méthodes phénotypiques et génotypiques, est importante pour relier une souche à un effet spécifique sur la santé ainsi que pour permettre une surveillance précise et des études épidémiologiques (Wedajo, 2015).
- b) **L'origine** : Les souches probiotiques peuvent être isolées de différentes sources telles que les aliments fermentés, animaux et humains. Mais pour être utilisé à des fins humaines, il devrait être isolé de microflore humaine comme le gros intestin humain, l'intestin grêle ou le lait maternel (Gupta, 2018).

-
- c) **L'innocuité** : Les souches probiotiques doivent être sans danger pour la consommation humaine (Wedajo, 2015).
 - d) **La résistance aux ATB** : C'est-à-dire les gènes de résistance aux antibiotiques doivent être stables et ne doivent pas être transférés aux agents pathogènes de l'intestin grêle, car cela aurait un effet catastrophique sur la santé humaine (Gupta, 2018).
 - e) **L'activité antimicrobienne** : L'activité antimicrobienne vis-à-vis les germes pathogènes est l'un des critères fréquemment utilisés pour la sélection des souches probiotiques, ces organismes peuvent fonctionner comme des barrières microbiennes contre les pathogènes gastro-intestinaux grâce à l'exclusion compétitive de la liaison des pathogènes, la modulation du système immunitaire de l'hôte et la production des substances antimicrobiennes (Marianelli et al, 2010).
 - f) **L'adhésion aux cellules épithéliales** : L'adhésion joue un rôle non seulement dans la persistance dans le tube digestif, mais aussi participe à l'exclusion des agents pathogènes par la compétition et le blocage de leurs sites de fixation au niveau des muqueuses (Novik, 2014).
 - g) **La tolérance à l'acidité gastrique** : La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les pH faibles, et le temps de passage serait variable et dépendrait de la souche et peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et le régime alimentaire. Par conséquent, certains auteurs suggèrent que les souches probiotiques appropriées devraient survivre à un pH de 2,5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (Samedi, 2019).
 - h) **La tolérance aux sels biliaires** : La bile agit comme un détergent biologique jouant un rôle essentiel dans la digestion des graisses. En raison de la propriété détergente, les sels biliaires confèrent une activité antimicrobienne puissante (Samedi, 2019).

I.10. Facteurs qui influent sur les probiotiques :

I.10.1. Humidité :

On ne le sait pas toujours, mais l'humidité est le premier facteur influençant négativement la stabilité des microorganismes pendant la durée de conservation d'un probiotique. Le fait qu'ils soient sous une forme lyophilisée, « dessiquée », les rend particulièrement sensibles à cette humidité. Comme nous l'avons dit, l'absence d'eau dans les microorganismes est indispensable pour les maintenir en dormance. Cet état doit être maintenu jusqu'au moment où le consommateur prendra ses gélules. Si de l'humidité entre en contact avec le probiotique alors qu'il est encore dans son emballage (une atmosphère un peu trop humide peut suffire), celui-ci va être réactivé prématurément. Malheureusement, sans nutriments à disposition, sans environnement adéquat (proche de celui de l'intestin), les microorganismes vont tout simplement mourir. Ils seront alors dans l'incapacité d'exercer leurs effets lors de la prise. (Fenster et al, 2019)

I.10.2. Chaleur :

La chaleur est un activateur d'activité métabolique. Plus elle est élevée, plus les réactions biochimiques au sein des microorganismes ont de chance de se produire ; plus elle est basse, plus elles sont ralenties. Pour maintenir le plus longtemps possible l'état de dormance des probiotiques, mieux vaut donc maintenir les tubes au frais. Par ailleurs, les hautes températures peuvent tout simplement détériorer la machinerie cellulaire des probiotiques (dénaturation des protéines) ; une atmosphère trop chaude peut ainsi provoquer un stress et mener à la mort des bactéries (Amund, 2016).

I.10.3. L'oxygène :

Cette molécule de l'air peut en effet affecter non seulement leur survie, mais également leur prolifération. Elle exerce sur eux un effet toxique direct et peut être à l'origine de la production de molécules redoutables pour l'intégrité de leurs microstructures (notamment de l'ADN). À partir du moment où l'on ouvre le flacon, les bactéries ou les levures vont être en contact avec l'oxygène de l'air.

Il faut en revanche bien fermer le flacon après chaque utilisation afin de limiter cette exposition. (Amund, 2016).

I.10.4. La lumière :

La lumière (ou l'exposition directe aux rayons du soleil) est susceptible de dégrader les probiotiques et d'entraîner leur mort. Celle-ci peut aussi entraîner une augmentation de la température dans l'emballage qui est néfaste pour les probiotiques. Pour les protéger contre la lumière, mieux vaut éviter les contenants transparents, comme le verre, le plastique translucide ou les blisters transparents. (Fenster et al, 2019)



Figure 12: Facteurs environnementaux accélérant la dégradation des probiotiques

I.11. Les probiotiques de nouvelles générations :

Ces nouvelles approches scientifiques et technologiques ont permis l'émergence de probiotiques dits « de nouvelle génération » (NGP). Parmi les plus récemment identifiés figurent *Roseburia intestinalis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila*... Issues de ces espèces importantes pour le microbiote humain, ces souches agiraient sur des processus physiologiques (métabolisme, immunité) qui ne seraient pas forcément atteints par les probiotiques classiques, mais aussi sur certains mécanismes pathologiques précis intervenant par exemple dans les cancers, l'obésité, le diabète, les maladies cardiovasculaires, inflammatoires, auto-immunes, la douleur... Elles pourraient ainsi entrer dans le cadre des produits biothérapeutiques vivants ou « LBP », c'est-à-dire des médicaments contenant des organismes vivants. Les probiotiques de nouvelle génération sont en premier lieu des souches jamais utilisées auparavant. Mais il peut également s'agir de probiotiques connus mais qui seront

génétiquement modifiés pour produire des molécules spécifiques d'intérêt comme des acides gras à chaîne courte (AGCC), pour augmenter leur survie dans le tube digestif ou encore pour améliorer leur métabolisme, leur propriétés immunomodulatrices, leur capacité à combattre certains pathogènes, etc... (Markus, 2021)

CHAPITRE II : LES PREBIOTIQUES

II.1. Histoire et Définitions des prébiotiques :

L'évolution des définitions des prébiotiques a suivi un chemin marqué par des découvertes scientifiques et des éclaircissements méthodologiques :

La compréhension du concept de prébiotique a évolué en parallèle avec notre connaissance des interactions entre l'alimentation, le microbiome et l'hôte. Au fil des avancées de la recherche scientifique, de l'intérêt grandissant des consommateurs et des innovations technologiques, de nouveaux aspects ont été graduellement intégrés. En 1995, le concept de prébiotique a émergé, ce qui a conduit l'ISAPP, un groupe d'experts universitaires et industriels, à se réunir pour définir précisément les prébiotiques et leur champ d'application. Gibson et Roberfroid ont défini le terme prébiotique comme un "ingrédient alimentaire non digestible qui a un effet bénéfique sur l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries dans le côlon, et qui améliore ainsi la santé de l'hôte"(Gibson et Roberfroid, 1995). A ce moment-là, l'attention portait principalement sur des fructooligosaccharides (FOS) et leur capacité à stimuler la croissance des bactéries du genre *Bifidobacteria* (activité bifidogène).

En 2004, dans le but de faciliter la caractérisation de composés à potentiel prébiotique le concept a été révisé. Les ingrédients pour prétendre au statut doivent démontrer les trois attributs suivants : résistance à l'acidité gastrique, à l'hydrolyse par les enzymes des mammifères et à l'absorption gastro-intestinale ; fermentation par la microflore intestinale ; stimulation sélective de la croissance et/ou de l'activité des bactéries intestinales associées à la santé et au bien-être. Cette caractéristique implique de décrire la composition du microbiome intestinal, qui confère des propriétés bénéfiques pour la santé, ainsi qu'une meilleure caractérisation de sa fonctionnalité. L'inclusion de ces critères a élargi le concept en soulignant le fait que les prébiotiques ne sont pas digérés mais plutôt fermentés par les microbes intestinaux dans le tube digestif. Parmi les glucides alimentaires, l'inuline, les galactooligosaccharides (GOS) et le lactulose ont été désignés comme ingrédients prébiotiques (Gibson et al, 2004).

En 2007, différents aspects ont été réévalués afin de valider et d'étendre le concept de prébiotique proposé précédemment. En ce qui concerne l'ingrédient

fermenté, il est essentiel de préciser la nature des prébiotiques car différents types de molécules peuvent avoir des effets variables sur les populations bactériennes. Ces produits alimentaires aux propriétés prébiotiques engendrent des modifications microbiennes "spécifiques" liées à des micro-organismes sélectifs. La quantification de l'augmentation bactérienne, en particulier du genre *Bifidobacterium*, ainsi que la description des activités associées à la prise régulière de prébiotiques ont été considérées comme caractérisant une relation dose-réponse. Après avoir envisagé à l'origine les changements microbiens chez l'Homme uniquement, le concept a été étendu aux écosystèmes coliques des animaux. En conséquence, des démonstrations expérimentales et des études d'intervention sur l'homme et/ou l'animal sont nécessaires pour évaluer les effets des prébiotiques (Rober, 2007).

En 2010, plusieurs aspects clés du concept de prébiotique ont été discutés pour clarifier ce concept. En ce qui concerne l'activité dans le microbiote gastro intestinal, il est nécessaire de fournir des preuves scientifiques à l'aide des technologies les plus récentes pour évaluer l'impact des prébiotiques sur le microbiome intestinal, y compris les profils métaboliques, la signalisation moléculaire et les interactions entre les cellules procaryotes et eucaryotes. Les effets physiologiques doivent être établis dans le cadre d'essais contrôlés et corrélés à des changements sélectifs dans la composition ou l'activité du microbiote intestinal. La spécificité a été considérée comme une condition clé qui doit être démontrée in vivo dans le microbiote intestinal complexe de l'homme (ou de l'animal) en utilisant les méthodologies les plus pertinentes et validées pour quantifier la grande variété de genres/espèces composant le microbiote intestinal. En ce qui concerne les changements spécifiques, l'augmentation du nombre de *Bifidobacterium* est considérée comme un marqueur de la santé intestinale pouvant être étendu à d'autres genres ou espèces. Toutefois, il reste à prouver définitivement que ces changements sont bénéfiques pour la santé de l'hôte. En réalité, les effets physiologiques et physiopathologiques bénéfiques des prébiotiques ne se limitent pas au côlon, mais peuvent également affecter l'ensemble de l'organisme et contribuer à réduire le risque de pathologies intestinales et systémiques (Rober et al, 2010).

En 2015, (Bindels et al, 2015) ont proposé une nouvelle définition plus complète des prébiotiques, en mettant en avant leur caractère "spécifique" ou "sélectif" pour les groupes taxonomiques bénéfiques pour la santé ou pour les activités métaboliques bénéfiques (. Cependant, cette exigence d'effet spécifique sur les taxons bénéfiques à la santé va à l'encontre de notre compréhension actuelle de l'écologie du microbiome intestinal et de sa relation avec la santé. En effet, les changements induits par les prébiotiques ne peuvent être aussi sélectifs qu'on le pensait, notamment en raison de la redondance fonctionnelle entre les différents habitants de l'intestin et de l'alimentation croisée. Il n'y a pas de glucide qui soit fermenté par un ou deux groupes bactériens seulement dans l'intestin, et aucun n'est fermenté par tous. La définition a donc été adaptée à la compréhension actuelle du microbiome intestinal : "un composé non digestible qui, par sa métabolisation par les micro-organismes de l'intestin, modifie la composition et/ou l'activité du microbiote intestinal, conférant ainsi un effet physiologique bénéfique à l'hôte". En supprimant l'exigence de sélectivité ou de spécificité du concept de prébiotique, l'accent est désormais mis sur la caractérisation de la composition et des caractéristiques fonctionnelles du microbiote intestinal, qui sont plus susceptibles d'être pertinentes pour la physiologie de l'hôte, ainsi que sur la recherche des mécanismes sous-jacents. Cette définition met l'accent sur le lien de causalité entre la métabolisation microbienne du composé, la modulation du microbiote intestinal qui en résulte et les effets physiologiques bénéfiques pour l'hôte (Bindels et al, 2015)

En 2017, la communauté scientifique a révisé la définition des prébiotiques. Le groupe d'experts a présenté une définition consensuelle qui stipule que les prébiotiques sont des "substrats sélectivement utilisés par les micro-organismes de l'hôte, conférant un avantage pour la santé" (Gibson et al, 2017). Bien que les glucides alimentaires soient les prébiotiques les plus courants, cette définition élargit le concept pour inclure des substances non glucidiques tels que les polyphénols et les acides gras polyinsaturés, ainsi que des applications à d'autres sites corporels que le tractus gastro-intestinal et diverses catégories autres que l'alimentation. Toutefois, le lien de causalité entre l'influence sur le microbiote intestinal et l'effet physiologique doit être démontré par des biomarqueurs de santé reproductibles dans des études humaines ou animales randomisées et

contrôlées. La sécurité et l'utilisation à une dose appropriée sont implicitement incluses dans cette définition. Une dose appropriée doit être suffisante pour produire un effet prébiotique sans causer d'effets indésirables ou néfastes tels qu'une formation excessive de gaz ou une utilisation non sélective. Pour qu'une substance soit considérée comme un prébiotique, ses effets sur la santé doivent être documentés. La condition supplémentaire d'une "utilisation sélective" par un nombre limité d'espèces ou de genres a été remise en question, mais les preuves scientifiques montrant les mécanismes sélectifs médiés par le microbiote ont été retenues. Ainsi, un prébiotique doit susciter un métabolisme sélectif en faveur des micro-organismes bénéfiques pour la santé sans être largement métabolisé. Les objectifs des prébiotiques vont au-delà de la stimulation des bifidobactéries et des lactobacilles et reconnaissent que les avantages pour la santé peuvent découler des effets sur d'autres taxons bénéfiques. (Paul, 2023)

Les prébiotiques constituent en effet la nourriture des bactéries intestinales, ou plutôt leurs « friandises » : elles n'en ont pas besoin pour vivre, mais ils favorisent la croissance des bactéries et leur permettent d'exercer plus efficacement leurs fonctions bénéfiques sur la santé de l'hôte (Lescuyer, 2023)

II.2. Critères de sélection des prébiotiques:

D'après Gibson et Roberfroid, il existe certaines exigences pour qu'un ingrédient alimentaire soit considéré comme prébiotique :

1. Il doit être résistant à la digestion et à l'absorption dans la partie supérieure du tube digestif (intestin grêle ,bile)
2. Il doit favoriser sélectivement les bifidobactéries et / ou lactobacilles dans le côlon, pouvant ainsi modifier le microbiote intestinal vers une composition plus saine.
3. Les substances produites lors de sa fermentation doivent induire des effets bénéfiques chez l'hôte,
4. Il doit résister aux conditions de traitement auxquelles est soumis l'aliment qui le porte.

Afin de déterminer et de démontrer qu'une substance est un prébiotique potentiel, il faut indiquer sa source, son origine, sa pureté, sa composition chimique et sa structure (Wang, 2009)

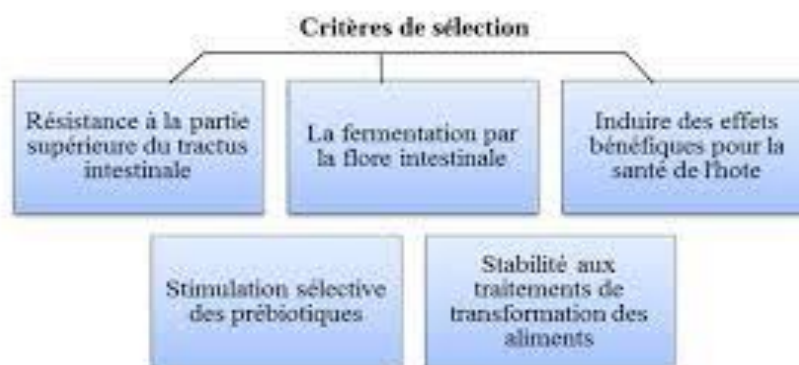


Figure 13: Principaux critères d'acquisition du statut « prébiotique » par les glucides végétaux (Wang, 2009)

II.3. Types de prébiotiques :

Les FOS (dont l'inuline) et les GOS sont les prébiotiques dont les effets sur les microorganismes bénéfiques du microbiote intestinal et sur la santé sont les plus scientifiquement reconnus mais d'autres substances sont en phase de test de leur potentiel prébiotique, comme (Biocodex, 2020) :

- D'autres glucides complexes de type fibre: xylo-oligosaccharides (XOS), isomalto-oligosaccharides (IMO), polydextrose, oligosaccharides de soja (SBOS), bêta-glucanes, pectine... ;
- Des dérivés de l'amidon comme des polyols : sorbitol, maltitol... ;
- Des acides gras polyinsaturés ;
- Des polyphénols : par exemple, du cacao ou du thé

Les prébiotiques bien connus impliquent des glucides non digestibles, tels que les fructooligosaccharides (FOS), les galactooligosaccharides (GOS), l'inuline et le lactulose. De plus, d'autres glucides non digestibles tels que l'arabinoxylane, les bêta-glucanes, les isomaltoligosaccharides (IMO), le polydextrose, les oligosaccharides de soja, le XOS et le xylopolysaccharide (XPS), ont également été revendiqués comme présentant un potentiel prébiotique basé sur des études cliniques (Kaur et al, 2021).

II.3.1. Fructanes :

Cette catégorie comprend l'inuline et le fructo-oligosaccharide (FOS) ou oligofructose. Auparavant, certaines études impliquaient que les fructanes pouvaient stimuler sélectivement les bactéries lactiques. Cependant, au cours des dernières années, certaines études ont montré que la longueur de la chaîne des fructanes est un critère important pour déterminer quelles bactéries peuvent les fermenter (Davani et al, 2019). L'oligofructoseprébiotique se trouve naturellement dans de nombreux aliments tels le blé, les oignons, les bananes, le miel, l'ail et les poireaux. Il peut aussi être isolé à partir de la racine de la chicorée ou être synthétisé par des enzymes à partir du sucrose (Guarner et al, 2017).

La fermentation de l'oligofructose dans le côlon génère un grand nombre d'effets physiologiques qui incluent:

- Une augmentation du nombre des bifidobactéries dans le côlon
- Un accroissement de l'absorption de calcium
- Une augmentation du poids des selles
- Un raccourcissement du temps de transit gastro-intestinal
- Une diminution du taux de lipides sanguins

II.3.2. Les galacto-oligosaccharides (GOS) :

Les galacto-oligosaccharides produits de l'extension du lactose, ils stimulent fortement les bifidobactéries et les lactobacilles. Les bifidobactéries chez les nourrissons ont montré des taux élevés avec l'incorporation de GOS. Les entérobactéries, les Bacteroidetes et les Firmicutes sont également stimulés par le GOS, mais dans une moindre mesure que les bifidobactéries. Il existe des GOS dérivés du lactulose, l'isomère du lactose, ils sont également considérés comme des prébiotiques (Davani et al, 2019).

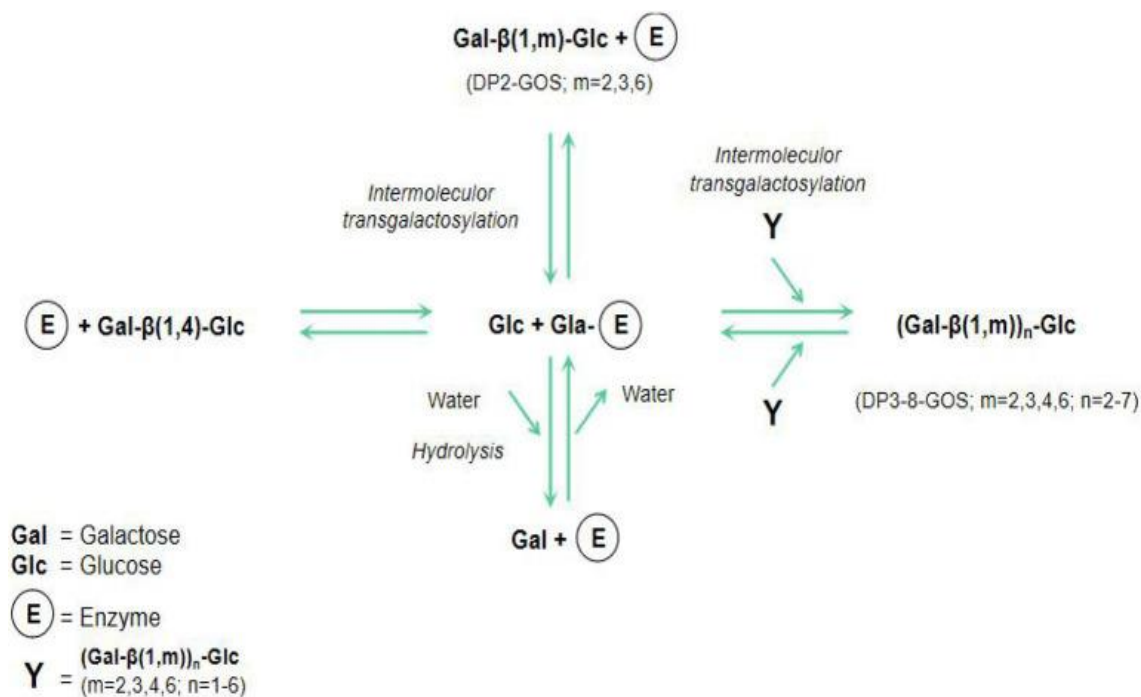


Figure 14: Modèle schématisé de l'hydrolyse du lactose et de la synthèse du GOS (Chem, 2021)

II.3.3. Oligosaccharides dérivés de l'amidon et du glucose :

Il existe une sorte d'amidon résistant à la digestion de l'intestin supérieur appelé amidon résistant (RS). Ce dernier peut favoriser la santé en produisant un niveau élevé de butyrate ; il a donc été suggéré d'être classé comme prébiotique. Divers groupes de Firmicutes montrent la plus forte incorporation avec une haute quantité de RS. Une étude *in vitro* a démontré que RS pouvait aussi être dégradé par *Ruminococcus bromii* et *Bifidobacterium adolescentis*, et aussi dans une moindre mesure par *Eubacterium rectale* et *Bacteroides thetaiotaomicron*. Cependant, dans les incubations mixtes bactériennes et fécales, la dégradation du RS est impossible en l'absence de *Ruminococcus bromii*. Le polydextrose est un oligosaccharide dérivé du glucose. Il se compose de glucane avec beaucoup de branches et des liaisons glycosidiques. Il existe des preuves qu'il peut stimuler les bifidobactéries, mais il n'a pas été encore confirmé (Davani et al, 2019).

3.4. Autre oligosaccharides : Certains oligosaccharides proviennent d'un polysaccharide appelé pectine. Ce type d'oligosaccharide est appelé oligosaccharide pectique (POS). Ils sont basés sur l'extension de l'acide galacturonique (homogalacturonan) ou le rhamnose (rhamnogalacturonan I). Leurs structures varient fortement selon les sources de POS (Davani et al, 2019).

II.3.4. Oligosaccharides non glucidiques :

Il existe certains composés qui ne sont pas classés comme glucides mais qu'il est recommandé de les classés comme prébiotiques tels que les flavanols dérivés du cacao. Des expériences in vivo et in vitro démontrent que les flavanols peuvent stimuler les bactéries lactiques (Davani et al, 2019).

II.4. Mécanismes d'action :

Les principaux mécanismes d'action des prébiotiques comprennent :

Les prébiotiques peuvent influencer l'organisme de deux façons : Ils peuvent être utilisés de manière indirecte comme substrat pour certaines bactéries commensales et les produits de cette fermentation, les AGCC, peuvent ensuite influencer les différents processus moléculaires et cellulaires des tissus de l'hôte (Amandine et al, 2019).

De nouvelles recherches suggèrent que les prébiotiques peuvent agir de manière directe en se fixant sur les récepteurs des cellules cibles. Les effets indirects médiés par les acides gras à chaînes courtes : La majorité des effets indirects des prébiotiques sont médiés par les AGCC comme le butyrate, le pyruvate, l'acétate et le propionate. En effet, à l'issue de la fermentation microbienne des prébiotiques, des AGCC sont produits dans la lumière intestinale. Ils entrent alors en contact avec les cellules environnantes telles que les cellules épithéliales et les cellules de l'immunité innée et adaptative pour stimuler certaines voies de signalisation. Ces métabolites vont se fixer aux récepteurs couplés aux protéines G (G protein-coupled receptor GPR) comme FFAR2, FFAR3, GPR109a et induire une voie de signalisation qui à l'heure actuelle n'est pas clairement définie . Cela a pour conséquence de moduler l'action d'enzymes et de facteurs de transcription comme les histones déacétylases et l'hypoxia-inducible facteur qui vont jouer un rôle sur la régulation de l'expression des gènes (Amandine et al, 2019).

. Les prébiotiques remodelent l'homéostasie microbienne de l'intestin en augmentant la sécrétion d'AGCC par le microbiote .En particulier l'acétate et le butyrate améliorent la tolérance orale et protègent de l'allergie alimentaire en augmentant l'activité rétinale déshydrogénase des DC CD103+ . Cette protection dépend de la vitamine A présente dans l'alimentation. Ce régime alimentaire

stimule également la production d'IgA impliquées dans la tolérance (Amandine et al, 2019).

II.5. Les effets directs des prébiotiques sur l'organisme :

II.5.1. La modulation du microbiote :

Les prébiotiques sont principalement connus pour leur impact sur la modulation du microbiote intestinal. Plus que la composition, c'est surtout le nombre de bactéries qui est modifié. Il est admis que les bactéries des taxons *Lactobacille* et *Bifidobacterium* sont significativement plus représentées à des doses moyennes de 5- 8 grammes/jour de prébiotiques. L'expansion des bactéries bénéfiques empêche l'implantation des bactéries pathogènes et réduit le nombre de certaines bactéries commensales par effet de compétition. Hopkins et son équipe ont montré que la croissance des Bifidobactéries suite à la consommation de prébiotiques est corrélée avec une diminution de la population de *Clostridium difficile*. Dans un deuxième temps, les bactéries vont également augmenter leur production de peptides antimicrobiens empêchant la colonisation de l'épithélium intestinale par les pathogènes (Guarner et al, 2017).

II.5.2. Interaction avec les cellules épithéliales :

Lors de l'ingestion de prébiotiques, les oligosaccharides pénètrent dans l'intestin. Ils entrent alors en contact direct avec les cellules épithéliales. Lors de l'étude in vitro de l'effet anti-inflammatoire des prébiotiques sur des lignées d'entérocytes (Guarner et al, 2017).

II.5.3. Interaction avec les cellules du système immunitaire :

Certains prébiotiques semblent être absorbés au niveau de la barrière intestinale et peuvent se retrouver ainsi en contact avec les cellules du système immunitaire circulantes. L'inuline et les FOS induisent la sécrétion d'IL-10, (Selle, 2019)

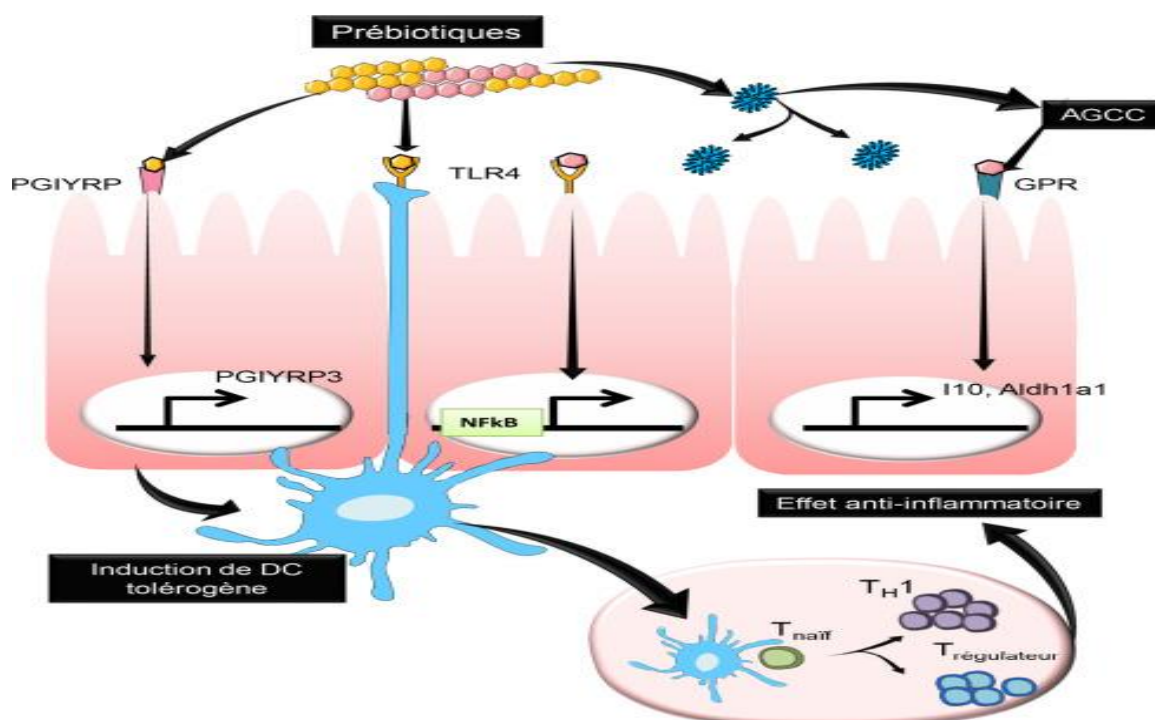


Figure 15: Effets direct et indirect des prébiotiques sur l'épithélium intestinal et le système immunitaire (Selle, 2019)

Certaines bactéries dites « bénéfiques » comme *Bifidobactérium* vont utiliser les prébiotiques comme substrat alimentaire. Leur consommation va induire la croissance de leur taxon ainsi que la production d'AGCC. Les AGCC sont une véritable source d'énergie pour les cellules épithéliales intestinales. Les AGCC interviennent dans la régulation de l'expression de gènes en se liant à des Les prébiotiques sont également capables d'avoir un impact direct sur les cellules épithéliale et cellules dendritiques en créant des liaisons. Ces liaisons permettront la transcription de gènes orientant les cellules dendritiques vers un profil tolérigène, induiront une différenciation des cellules T naïves vers des L régulateurs,

ayant un effet anti-inflammatoire sur l'épithélium et donc protecteur (Greg, 2021)

L'importance des prébiotiques

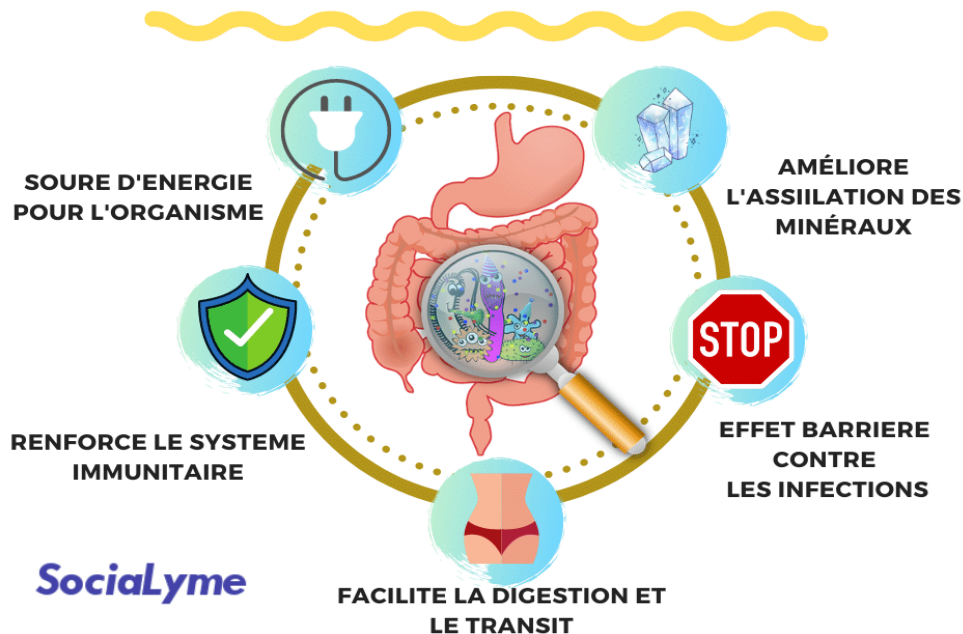


Figure 16: importance des prébiotiques (Greg, 2021)

II.6. Autres effet prébiotique :

- Facilite la digestion et le fonctionnement intestinal
- Effets barrières contre les infections
- Renforce le Système immunitaire
- Lutte contre la constipation
- Source d'énergie pour l'organisme
- Favorise et stimule la croissance de bonnes bactéries
- Réduit la colonisation des bactéries potentiellement pathogènes
- Améliore l'assimilation du magnésium et du calcium
- Stimule la fermentation colique
- Diminue la cholestérolémie à jeun
- Diminue la glycémie après les repas (Greg, 2021)

II.7. Sources des prébiotiques :

Même si plusieurs prébiotiques sont un type de fibres, ces dernières ne sont pas toutes des prébiotiques. Pour être classées comme des prébiotiques, les fibres

doivent passer par les voies gastro-intestinales sous forme non digérée et stimuler la croissance et (ou) l'activité de certaines bonnes bactéries dans le gros intestin. Les fibres prébiotiques qui se retrouvent dans l'alimentation incluent l'inuline, les fructosanes et les galacto-oligosaccharides. Voici quelques aliments à teneur naturellement élevée en prébiotiques (GDHF, 2023) :

- **Légumes** : Topinambours, ail, oignons, asperges, chou, pois mange-tout, pois verts, poireaux, échalotes
- **Fruits** : Pommes, pamplemousses, grenades, nectarines
- **Grains entiers** : Avoine, blé, orge, craquelins de seigle
- **Noix et graines** : Pistaches, noix de cajou
- **Légumineuses** : Haricots rouges, fèves de soja, pois chiches, lentilles

II.8. Les prébiotiques dans les compléments alimentaires : on retrouvera les prébiotiques dans des (Greg, 2021) :

- Suppléments alimentaires riches en prébiotiques
- Symbiotiques (des probiotiques couplées à des prébiotiques)
- Compléments alimentaires comme par exemple de multivitamines

Du côté, des compléments alimentaires riches en fibres il est préférables de s'orienter vers un produit dont les fibres sont solubles. En effet, les fibres insolubles du type son de blé vont avoir un effet facilitateur du transit et peuvent s'avérer irritantes. Tandis que les fibres solubles vont être plus intéressantes pour leurs effets prébiotiques sur la flore intestinale. Évidemment toutes les fibres ne se valent pas et il vaut mieux s'orienter vers des compléments bio et dont les fibres seront bien tolérés par les intestins (Greg, 2021).

CHAPITRE III : LA MICRO- ENCAPSULATION

III.1. Définition de la micro-encapsulation :

La micro-encapsulation est la protection de petites particules solides, liquides ou gazeuses par un système d'enrobage (1 à 1 000 nm). Le matériau encapsulé est appelé le noyau et le matériau qui forme l'enrobage de la particule est la paroi ou l'agent d'encapsulation. Le matériau de la paroi peut être un revêtement polymère naturel, synthétique ou semi-synthétique. Dans cette technologie, des microparticules sont formées, qui peuvent être classées en fonction de leur taille et de leur morphologie, selon l'agent d'encapsulation et la méthode de micro-encapsulation utilisés. Les microparticules peuvent être distinguées selon leur forme : elles sont classées comme un système de type réservoir, « microcapsules », lorsque le noyau (matériau encapsulé) est concentré dans la région centrale, enrobé par un matériau de paroi continu (agent d'encapsulation) ; ou un système monolithique, « microsphères », lorsque l'agent actif (noyau) est dispersé dans un système matriciel. En général, la principale différence est que dans les microsphères, une partie du matériau encapsulé est exposée à la surface de la microparticule (Paulo et Santos, 2017)

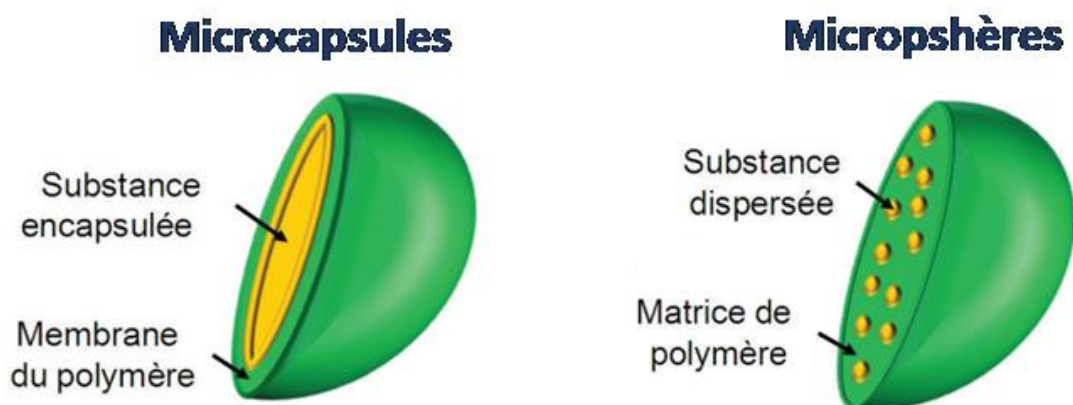


Figure 17: Schéma représentatif de la microcapsule et de la microsphère

Les ingrédients à revêtir sont dénommés noyau, phase interne ou encapsulât tandis que la couche qui forme la microcapsule se nomme aussi la paroi, la capsule, la phase externe ou la membrane. L'enveloppe de la capsule peut être constituée d'une seule ou de plusieurs membranes dans laquelle peuvent être

insérés plusieurs noyaux. Les capsules sont généralement de formes sphériques mais des formes irrégulières peuvent aussi être retrouvées dépendamment du type de revêtement, de la méthode d'encapsulation et du produit à encapsuler. La surface des capsules peut être lisse ou rugueuse. La taille des capsules varie généralement d'un micron à quelques millimètres (Mehta et al, 2022). Ainsi, le préfixe « nano » est employé pour des tailles variant de quelques nanomètres à un micromètre, tandis que le préfixe « micro » est utilisé pour représenter des tailles pouvant aller jusqu'à mille micromètres (Paulo et Santos, 2017). La libération des substances encapsulées peut se produire en raison de l'effet d'un solvant, suite à la dissolution ou la rupture de la capsule, ou par diffusion contrôlée.

III.2. La microencapsulation des probiotiques et prébiotiques :

La micro-encapsulation est une technique prometteuse pour la protection des cellules bactériennes et plusieurs études ont été menées sur le rôle protecteur de cette technique contre des conditions défavorables pour lesquelles les probiotiques peuvent être. Parmi ces facteurs néfastes, on retrouve les conditions gastriques ainsi que le stress encourus lors du procédé de la transformation des aliments (changement de température, pH, oxygène, exposition de longue durée à des températures ambiantes, entreposage) (Sipailiene et Petraityte, 2018).

Diverses techniques de micro-encapsulation des cellules viables ont été employées utilisant des polymères naturels et synthétiques. Cependant, les matériaux et les conditions de formulation utilisés devraient être doux et non toxiques. Ceci permettra d'assurer la viabilité des probiotiques lorsque ces derniers sont destinés pour l'administration orale au niveau de l'intestin. Aussi, le choix de la technique de micro-encapsulation est primordial puisqu'il détermine la taille des capsules qui seront produites. Ainsi, l'emploi de microcapsules n'aura pas d'effet sur les propriétés organoleptiques, contrairement à des capsules plus grosses (Hoyos et al, 2018).

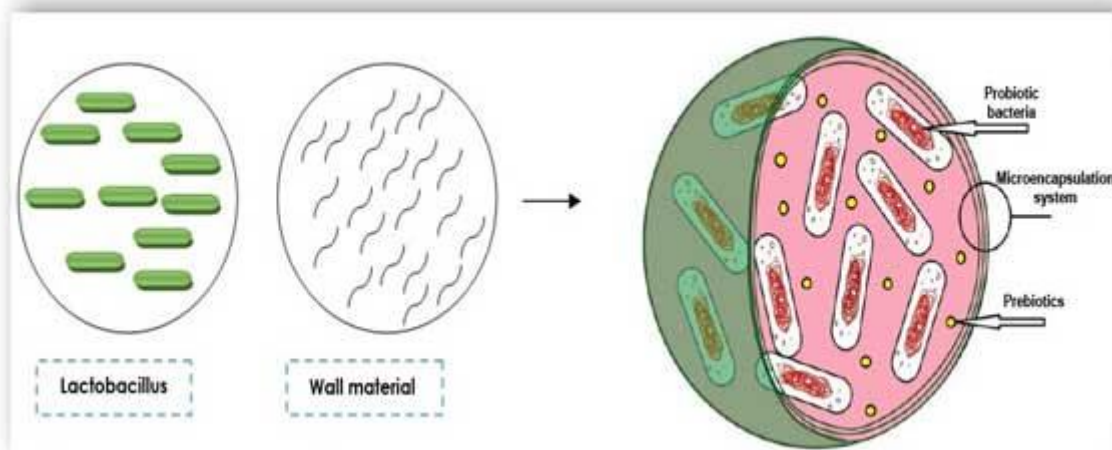


Figure 18: Représentation systématique de la technique d'encapsulation (Hoyos et al, 2018).

III.3. Les objectifs de la micro-encapsulation des probiotiques/ prébiotiques :

Les technologies de micro-encapsulation atteignent plusieurs objectifs et sont notamment utilisées pour protéger la sensibilité de l'agent actif du noyau. Cependant, la raison la plus importante pour encapsuler un agent actif est d'obtenir une libération contrôlée (Mehta et al, 2022).

L'un des grands avantages de la micro-encapsulation est le mécanisme de libération contrôlée, prolongée ou ciblée de l'agent actif. Cette libération peut se produire à un moment précis ou non, par un mécanisme de diffusion ou de rupture de la paroi. La libération peut être activée par des variations de température, de solubilité, de changement de pH ou même de biodégradabilité du matériau de la paroi (Hoyos et al, 2018).

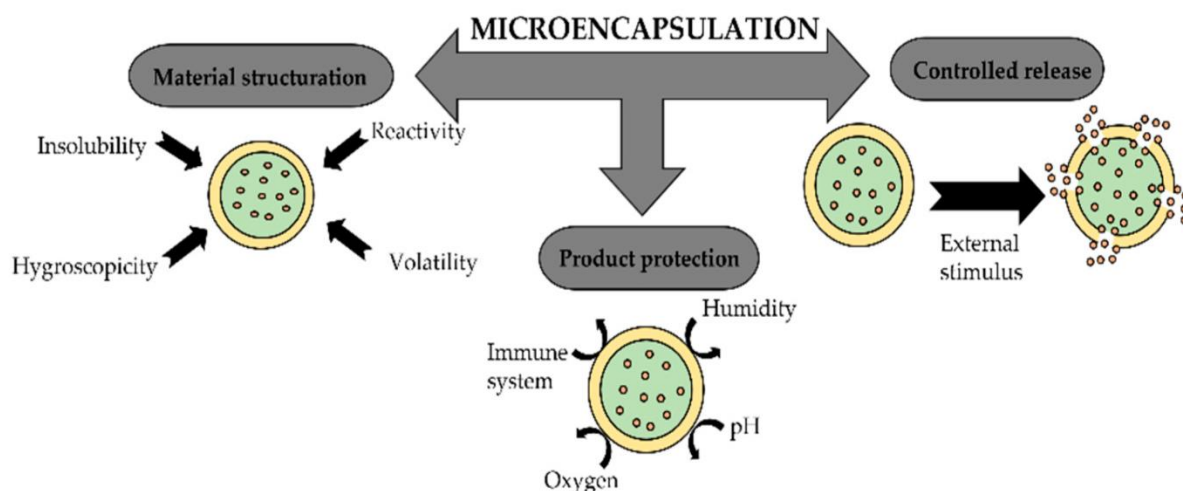


Figure 19: Les objectifs de la micro-encapsulation (Hoyos et al, 2018)

III.4. Les technologies utilisés dans la micro-encapsulation des probiotiques et prébiotiques:

La plupart des souches de probiotiques sont vulnérables à divers facteurs de stress environnementaux, ce qui entraîne leur faible viabilité et leur perte d'activité pendant leur fabrication et leur stockage. En particulier, la stabilité des probiotiques est considérablement affectée par le stress de traitement tel que le chauffage et le refroidissement, l'oxygène et Par conséquent, la stabilisation des probiotiques est essentielle dans le développement de la formulation des probiotiques, quelle que soit la voie d'administration. Dans la micro-encapsulation les probiotiques et des prébiotiques sont piégés dans de minuscules particules ou des coques centrales entourées de matériaux d'enrobage. La micro-encapsulation fournit aux micro-organismes probiotiques une barrière physique contre l'environnement nocif, améliorant ainsi leur viabilité pendant la production, le stockage ou l'application clinique. De plus, la micro-encapsulation peut être utilisée pour contrôler la vitesse et les sites de libération des probiotiques, optimisant ainsi les avantages thérapeutiques des probiotiques. En général, la qualité et le succès de la micro-encapsulation dépendent principalement des souches de probiotiques, des matériaux d'enrobage et de la méthode de micro-encapsulation (Sipailiene et Petraityte,2018) .

Selon la nature de l'interaction entre le matériau encapsulant et le matériau encapsulé, les méthodes de micro-encapsulation peuvent être distinguées comme

chimiques, physicochimiques et mécaniques. En général, une méthode de micro-encapsulation doit être rapide, simple, reproductible et facilement évolutive pour l'industrie. Les méthodes de microencapsulation les plus utilisées sont le séchage par atomisation et la coacervation, et ces approches seront mentionnées plus en détail ci-dessous (Mehta et al, 2022).

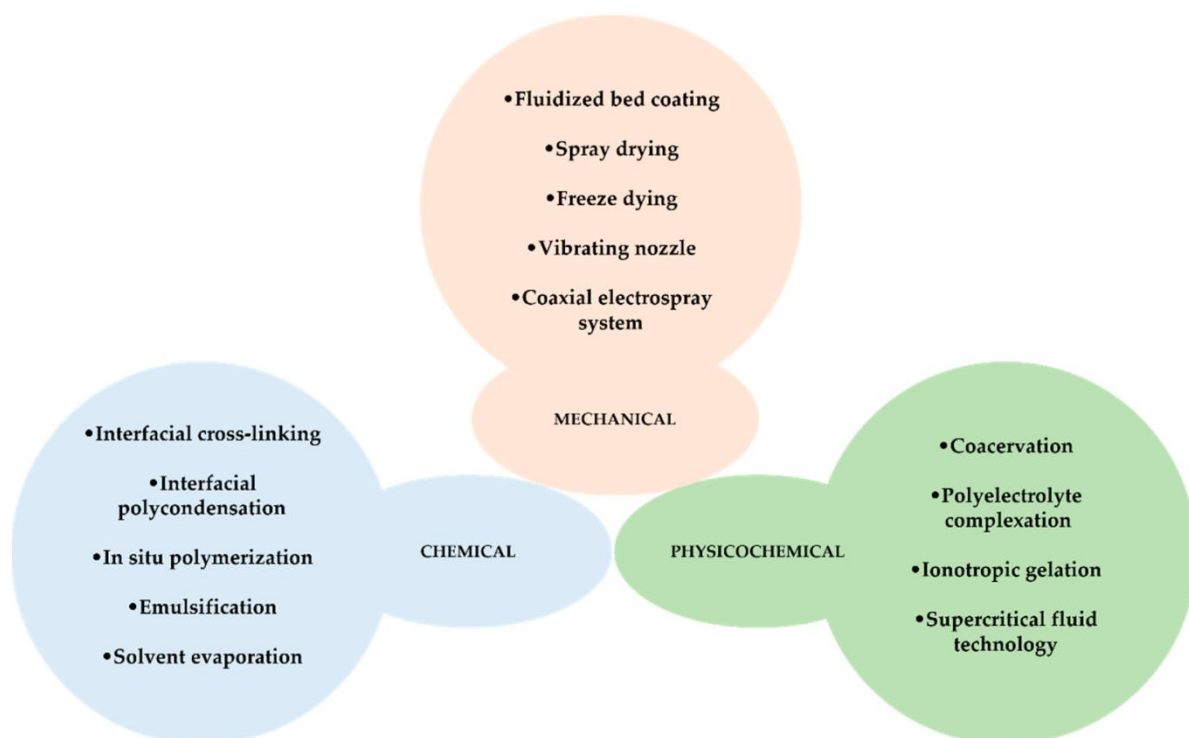


Figure 20 : les méthodes utilisées en micro-encapsulation (Hoyos et al, 2018)

III.4.1. Emulsification :

Une émulsion est un mélange bien dispersé de deux liquides non miscibles en présence d'agents émulsifiants ou tensioactifs. Pour piéger les cellules probiotiques et le prébiotique dans l'émulsion, un petit volume d'une solution aqueuse contenant des cellules probiotiques est ajouté à un grand volume de diverses huiles végétales, notamment de l'huile de sésame et de l'huile de maïs. Ensuite, le mélange obtenu est homogénéisé en présence d'émulsifiants, produisant une émulsion eau dans huile (W/O). Cette méthode d'émulsification s'est avérée efficace pour améliorer la stabilité des probiotiques face à l'environnement nuisible. (Hou et al, 2022) ont encapsulé des bactéries lactiques (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) dans une émulsion à base d'huile de

sésame, améliorant la viabilité des probiotiques dans des fluides gastriques et intestinaux simulés d'environ 10 000 fois (Mehta et al, 2022)..

L'émulsion obtenue peut subir une gélification interne ou externe pour assurer la viabilité élevée des probiotiques. Dans ce procédé, la suspension aqueuse est préparée en utilisant des cellules probiotiques et prébiotiques et des polymères comme matériaux de matrice de piégeage. Une fois l'émulsion formée, les polymères dans la phase aqueuse sont insolubilisés pour former de minuscules billes gélifiées dans la phase huileuse, et les billes résultantes sont extraites par filtration. Le choix de la méthode de gélification dépend des propriétés des polymères utilisés comme matériaux de matrice, et la taille des billes est contrôlée par la vitesse d'agitation. Par exemple, dans la méthode d'émulsification/gélification externe, la solution d'alginate est dispersée dans la phase huileuse pour former une émulsion eau/huile, puis une solution de chlorure de calcium est ajoutée pour la gélification. Dans le cas du processus d'émulsification/gélification interne, une solution d'alginate avec un sel de calcium insoluble est ajoutée à l'huile pour former une émulsion eau/huile, puis l'émulsion est acidifiée pour libérer le Ca^{2+} du sel insoluble pour la réticulation avec l'alginate. Song et al ont préparé des microcapsules d'alginate-chitosane contenant des cellules de levure (Y235) par émulsification/gélification externe et émulsification/gélification interne et ont découvert que les probiotiques micro-encapsulés par émulsification/gélification interne avaient une viabilité plus élevée que ceux obtenus par émulsification/gélification externe. (Liang et al, 2019).

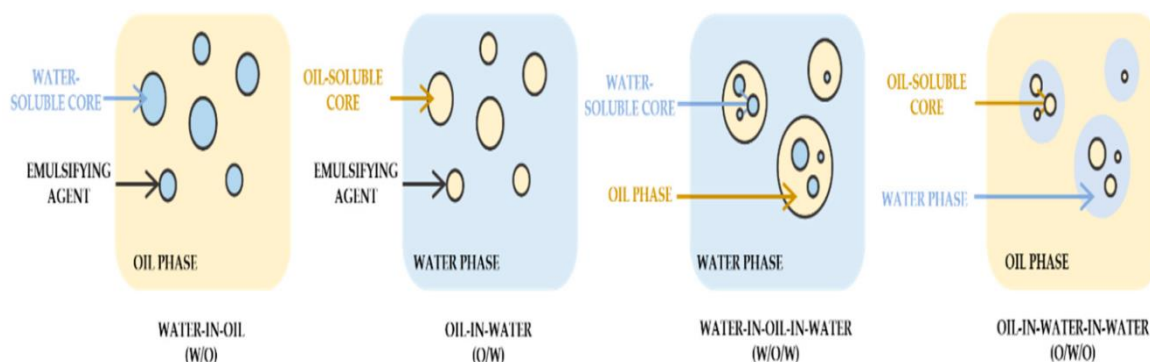


Figure 21: illustration des quatres systèmes d'émulsion (Hoyos et al, 2018)

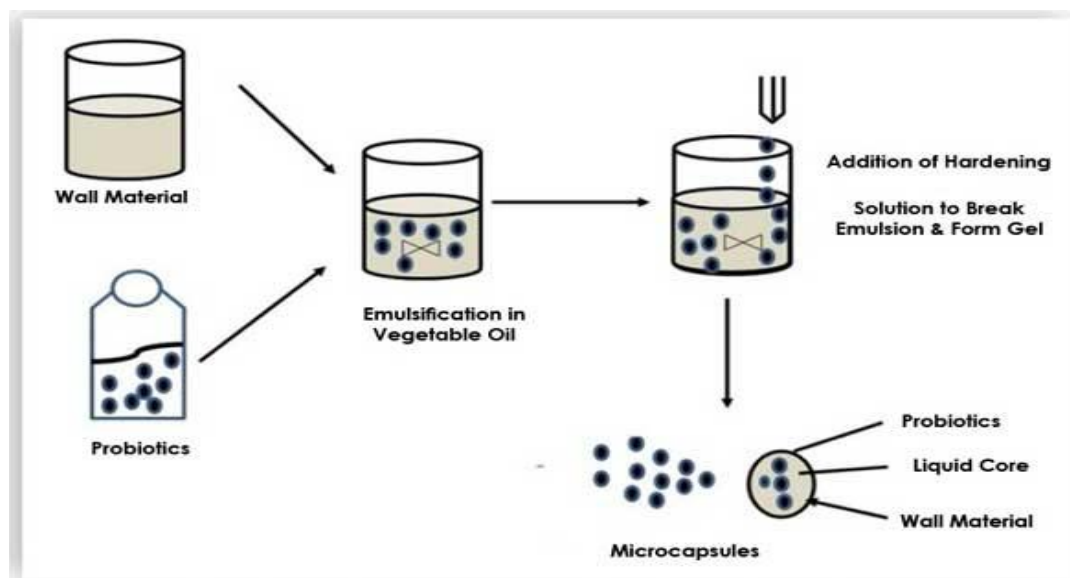


Figure 22: schéma démontrant l'émulsification d'un probiotique (Hoyos et al, 2018)

III.4.2. La coacervation :

La coacervation est l'une des techniques de micro-encapsulation les plus utilisées. Cette technique repose sur des polymères polyélectrolytes de charges opposées qui interagissent et forment une paroi recouvrant l'agent actif. Le processus de coacervation peut être classé comme simple et complexe. La coacervation simple est basée sur le relargage des polymères par l'ajout de sels ou de solvants polaires qui ont une affinité à l'eau plus élevée que les polymères. Dans la coacervation complexe, les interactions électrostatiques entre deux polymères de charges opposées conduisent à la séparation d'une phase riche en biopolymères (coacervats complexes) et à la formation de particules solides ou de gouttelettes liquide. La coacervation complexe convient à la microencapsulation de probiotiques. (Behera et Panda, 2020).

La coacervation représente une approche physicochimique elle implique la séparation de phase d'un ou de plusieurs hydrocolloïdes, par déshydratation d'une phase liquide. Dans ce processus, les probiotiques sont piégés dans les particules solides ou les gouttelettes d'huile qui peuvent être enrobées et éventuellement durcies en microcapsules. Il existe deux méthodes : la coacervation simple ou complexe. (Oliveira et al, 2007) ont préparé des microcapsules contenant des probiotiques par coacervation complexe en utilisant une combinaison caséine/pectine comme matériau de paroi. Les probiotiques microencapsulés étaient plus résistants aux conditions acides que les cellules probiotiques libres.

(Zhao et al, 2018) ont encapsulé le probiotique *L. reuteri* par coacervation complexe hétéroprotéique (gélatine de type A/caséinate de sodium, GE/Cas) et ont comparé son effet protecteur à celui de la coacervation complexe protéine/polysaccharide (gélatine de type A/gomme). La coacervation GE/Cas était efficace pour améliorer la viabilité cellulaire pendant le stockage et offrait une meilleure protection des probiotiques que la coacervation complexe protéine/polysaccharide. (Zahao et al, 2020)

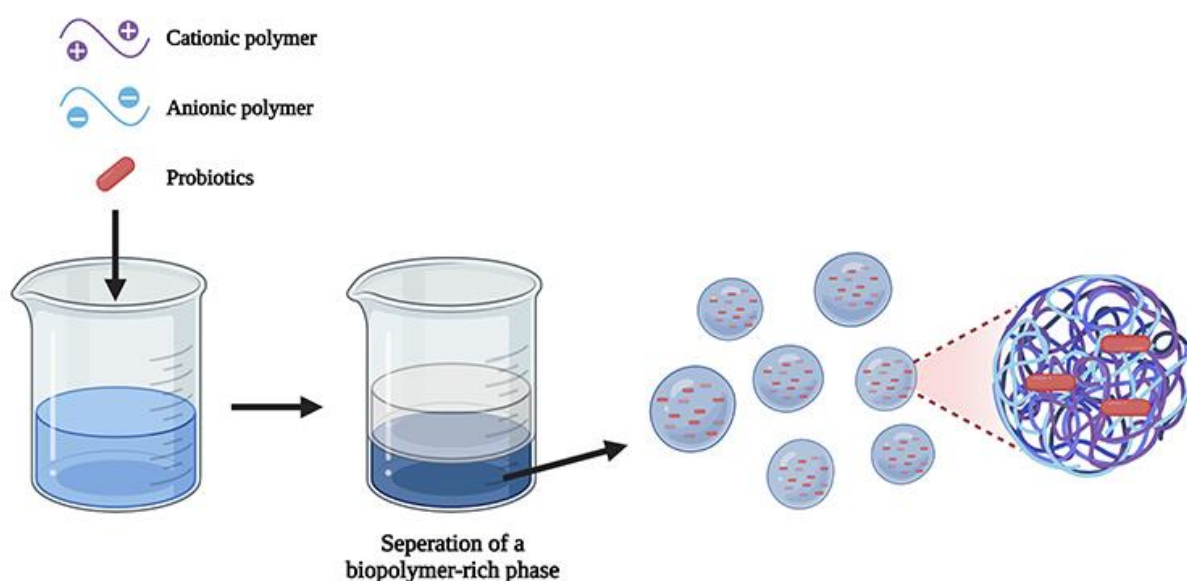


Figure 23 : illustration de la micro-encapsulation par coacervation (Zahao et al, 2020)

La micro-encapsulation par coacervation présente de nombreux avantages, notamment un faible coût, une capacité de charge élevée, la possibilité d'une libération contrôlée de probiotiques par des stimuli environnementaux (stress mécanique, température et changement de pH) et l'évitement des températures élevées ou des solvants organiques.¹⁵⁰ Cependant, comme il s'agit d'un procédé par lots produisant des coacervats dans une solution aqueuse, un processus de séchage supplémentaire est nécessaire pour prolonger la durée de conservation du produit (Zahao et al, 2020) .

III.4.3. Spray drying :

Le séchage par pulvérisation (atomisation) est une technique couramment utilisée pour prolonger la conservation des probiotiques. Il s'agit d'un procédé économique avec des coûts d'exploitation relativement faibles et qui présente de nombreux avantages, notamment la production de poudres fluides, une vitesse de séchage rapide, une évolutivité et un contrôle de la taille des particules. Pour utiliser la technique de séchage par atomisation pour la micro-encapsulation, les probiotiques et prébiotiques sont dissous dans l'agent d'encapsulation ayant des propriétés émulsifiantes ou filmogènes. Divers polymères naturels, notamment des protéines et des glucides ou leurs dérivés, sont utilisés comme agents d'encapsulation pour les probiotiques. Le procédé de séchage par atomisation implique l'atomisation de gouttelettes de liquide pulvérisées dans une chambre de séchage à air chaud, et des poudres sèches sont obtenues lorsque l'eau des gouttelettes atomisées a été évaporée dans des conditions de température et de flux d'air contrôlées (Fazilah et al, 2019).

De plus, l'utilisation combinée de protéines et de sucres comme agents protecteurs a un effet synergique pour améliorer la viabilité cellulaire. Diverses souches de lactobacilles et de bifidobactéries ont été séchées avec succès en utilisant une approche de séchage par atomisation. Par exemple, (Farahmandi et al, 2021) ont évalué la viabilité de *L. rhamnosus* pendant le processus de séchage par atomisation et ont constaté que les cellules micro-encapsulées étaient 5 fois plus stables que les cellules probiotiques non encapsulées pendant 20 jours de stockage, confirmant les effets positifs de la micro-encapsulation sur la durée de conservation des probiotiques. De plus, ils ont démontré que les traitements de stress sublétaux (chaleur, peroxyde d'hydrogène et chlorure de sodium) des bactéries probiotiques avant la micro-encapsulation par séchage par atomisation augmentent efficacement la résistance de *L. rhamnosus* aux conditions difficiles (Mandi et al, 2021).

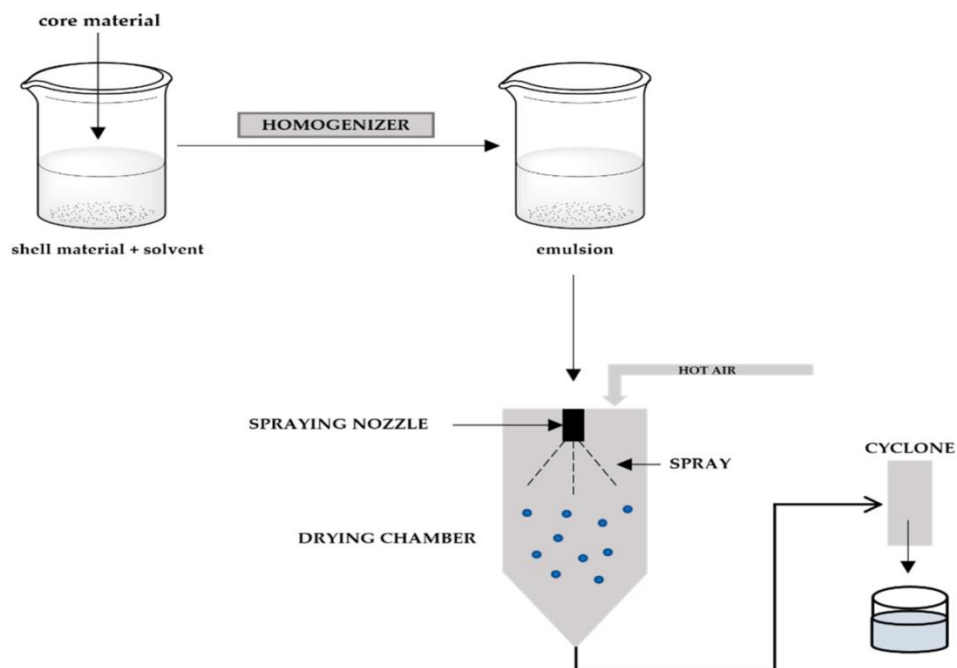


Figure 24: Schema représentatif de la technique Spray Drying (Farahmandi et al, 2021).

Les principales limitations de cette technique sont liées au matériau des parois, qui doit avoir une bonne solubilité dans l'eau, et au nombre d'agents d'encapsulation disponibles. De plus, certains matériaux peuvent être sensibles aux températures élevées introduites dans le processus d'atomisation. De plus, la production de microcapsules sous forme de poudre fine peut provoquer une agglomération et un processus supplémentaire peut être nécessaire (Bakry et al, 2016).

III.4.4. Lyophilisation et séchage sous vide :

La lyophilisation est également connue sous le nom de Freez - Drying et est largement utilisée pour solidifier les probiotiques thermosensibles. Le processus de lyophilisation comprend trois étapes telles que la congélation, le séchage primaire et le séchage secondaire. Bien qu'il soit plus coûteux et prenne plus de temps que le séchage par atomisation, il est utile pour encapsuler les probiotiques thermosensibles. Tout d'abord, les probiotiques sont congelés en présence de matériaux porteurs à basse température, puis sous vide, l'eau congelée est sublimée directement de la phase solide à la phase gazeuse. Bien que cette méthode puisse minimiser le stress thermique, la formation de cristaux de glace lors de l'étape de congélation peut induire un stress mécanique, entraînant la mort

cellulaire. Étant donné que la croissance des cristaux de glace est affectée par la vitesse de congélation et la température, une vitesse de congélation élevée est préférable car elle forme des cristaux de glace plus petits, ce qui évite des dommages cellulaires importants. (Hazarika et Gosztola, 2020).

Les inconvénients du procédé comprennent une consommation d'énergie élevée, un temps de traitement long et des coûts de production élevés (Seebaly et al, 2016).

III.4.5. Extrusion :

La méthode d'extrusion est couramment utilisée pour obtenir des microparticules de probiotiques, en raison de sa simplicité, de son faible coût et de ses conditions de formulation douces garantissant une viabilité cellulaire élevée. Le processus d'encapsulation par extrusion comprend deux étapes. Tout d'abord, les solutions hydrocolloïdes contenant des probiotiques sont extrudées à travers une buse, générant de petites gouttelettes s'égouttant librement dans la solution gélifiante. Ensuite, ces petites gouttelettes sont solidifiées par gélification ou formation d'une membrane à leur surface, ce qui entraîne la production de billes d'hydrogel poreuses. Un revêtement polymère supplémentaire est souvent appliqué aux billes d'hydrogel obtenues pour assurer une meilleure survie des bactéries probiotiques encapsulées pendant le stockage et l'application *in vivo*. La taille et la forme des gouttelettes dépendent de plusieurs variables du processus, notamment le diamètre de la buse, la distance entre la buse et la solution gélifiante et le dispositif utilisé (Rokka et Rantamäki, 2017).

III.5. Les matériaux d'encapsulation des probiotiques et prébiotiques :

L'encapsulation des probiotiques nécessite le recours à des biomatériaux. Une première définition est donnée aux biomatériaux. un biomatériau est défini comme « tout matériau naturel ou non, qui est en contact direct avec une structure vivante et qui est destiné à agir avec des systèmes biologiques »(Park et al, 2018).

Les termes « biocompatible » et « biodégradable » sont associés à certains de ces matériaux. La biocompatibilité d'un matériau est sa propriété à agir dans une application spécifique avec une réponse appropriée de l'hôte. La

biodégradabilité est la capacité intrinsèque d'un matériau à se dégrader (par divers procédés) dans un temps bien déterminé. Les biomatériaux les plus souvent utilisés en bioencapsulation sont les biopolymères. Ces derniers sont des macromolécules organiques ou inorganiques, constitués de l'enchaînement répété d'un motif (le monomère), reliés les uns aux autres par des liaisons covalentes. La structure chimique et la conformation des chaînes de monomères confèrent aux polymères des fonctionnalités spécifiques (capacité à former des gels, capacité d'absorption d'eau). Les biomatériaux sont généralement de nature protéique, polysaccharidique ou lipidique.(Yao et al., 2018).

III.5.1. Choix de la matrice d'encapsulation :

La sélection de la matrice d'encapsulation est une étape préliminaire nécessitant une approche méthodologique rigoureuse. Le choix du (ou des) polymère(s) est crucial puisqu'il détermine les propriétés des microparticules et donc l'efficacité de protection des bactéries probiotiques. Il est, par exemple, important de prendre en compte le devenir des microparticules, c'est-à-dire leur stockage sous la forme d'une poudre ou bien leur incorporation directe dans un aliment qui sera lui-même conservé. Les propriétés de l'aliment doivent dans ce cas être prises en considération pour le choix de la matrice d'encapsulation : pH, teneur en eau, concentration ionique, présence d'enzymes... Dans le cas de bactéries probiotiques, puisque leur site d'action se trouve au niveau de l'intestin, les microparticules doivent résister à des pH acides (rencontrés au niveau de l'estomac) et elles doivent pouvoir libérer leur contenu dans un environnement dont le pH est supérieur à 6. Cette valeur correspond au pH minimal rencontré au niveau de la lumière intestinale, à l'entrée du duodénum (Jennifer et al ,2016).

Les polymères utilisés pour l'encapsulation doivent être reconnus comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe). Les polymères les plus couramment utilisés pour l'encapsulation des bactéries probiotiques et prébiotiques sont :

III.5.1.1. Polysaccharides :

A. Alginate :

L'alginate est un polysaccharide d'origine naturelle, extrait des algues brunes. Ce polymère présente une alternance de résidus d'acide β -D-mannuronique (M) et α -L-guluronique (G). En industrie alimentaire, l'alginate de sodium est largement

utilisé comme agent épaississant, agent gélifiant et également comme stabilisateur colloïdal. C'est un additif peu coûteux, non toxique et biocompatible. L'une des particularités de l'alginate, exploité pour la microencapsulation de bactéries probiotiques, est son aptitude à former un gel en présence de cations divalents (Ca^{2+}). Le gel formé est soluble à un pH neutre ou supérieur, et insoluble à un pH inférieur. Cependant, le gel ainsi formé est de nature poreuse, ce qui constitue un inconvénient majeur pour la micro-encapsulation. Pour répondre à ce problème, une modification chimique peut être envisagée afin d'améliorer les propriétés physico-chimiques de l'alginate. C'est le cas par exemple de l'alginate N-palmitoylé qui a été utilisé avec succès pour l'encapsulation de bactéries probiotiques et qui a permis d'améliorer la viabilité des cellules lors de conditions gastriques simulées. (Jennifer et al ,2016)

B. Chitosane :

Le chitosane (ou chitosan) est un polysaccharide cationique obtenu par N-déacétylation partielle de la chitine. La chitine est extraite des carapaces de crustacés tels que les crabes et les crevettes. Le chitosan est principalement composé d'unités β -(1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose. La structure globale du chitosan rappelle celle de la cellulose, mais la présence de groupement amine sur le carbone 2 modifie beaucoup ses propriétés physico-chimiques, en particulier sa solubilité et sa réactivité. Le chitosan est biocompatible, biodégradable et non toxique, ce qui lui confère un large champ d'applications. Le chitosan est souvent utilisé en combinaison avec l'alginate, ce complexe permet de modifier la vitesse de diffusion de substances encapsulées. Les interactions électrostatiques qui s'établissent entre les groupements carboxyliques de l'alginate et les groupements amine du chitosan permettent la formation de billes suffisamment résistantes pour retenir les cellules encapsulées. L'une des limitations majeures de l'utilisation du chitosan est son effet bactériostatique qui, de fait, peut limiter la viabilité des bactéries probiotiques encapsulées dans ce type de système. (Jennifer et al ,2016)

C. Amidon :

L'amidon [F 4 690] est un polymère de glucose naturel, principale réserve énergétique des végétaux. L'amylose et l'amylopectine sont les deux

homopolymères constitutifs de l'amidon. Les unités de D-glucose sont liées entre elles par des liaisons α (1-4), alors que des liaisons α (1-6) sont à l'origine de ramifications. Le ratio entre amylose et amylopectine a une influence sur les propriétés physico-chimiques, thermiques et rhéologiques de l'amidon. Certaines bactéries, notamment des bifidobactéries, ont la capacité d'adhérer à l'amidon et cette propriété peut être mise à profit pour améliorer la rétention des cellules à l'intérieur des microparticules. L'autre avantage de l'amidon est le fait qu'il n'est pas totalement dégradé, ce qui constitue un substrat de choix pour des bactéries colonisant l'intestin, puisque ces dernières produiront des acides gras à courte chaîne pouvant exercer des effets positifs sur la santé de l'hôte. (Jennifer et al, 2016)

D. Kappa carraghénane :

Il existe différents types de carraghénanes [F 5 080], mais les κ -carraghénanes sont les plus utilisés notamment pour leur aptitude à former des gels. Les κ -carraghénanes sont des polymères de D-galactose-4-sulfate et de 3,6-anhydro-D-galactose qui proviennent des algues rouges *Kappaphycus alvarezii*. En présence de cations monovalents, les κ -carraghénanes peuvent former des gels thermoréversibles. Cependant, l'utilisation de ce polymère comme matrice d'encapsulation requiert une étape de chauffage pour la dissolution du polymère, étape qui est incompatible avec la survie des bactéries probiotiques. (Jennifer et al, 2016)

E. Gomme de gellane et gomme de xanthane :

La gomme de gellane est un hétéropolyoside linéaire anionique largement utilisé en industrie alimentaire. Les unités glucidiques rencontrées dans ce polymère sont des séquences de D-glucose, de L-rhamnose et d'acide D-glucuronique dans des proportions 2:1:1. Les séquences sont reliées entre elles par des liaisons α (1-3). La gomme de gellane est un polysaccharide très résistant à la chaleur, un avantage majeur pour son utilisation en industrie alimentaire. La gomme de xanthane [F 4 300] est également utilisée pour ses propriétés gélifiantes en industrie alimentaire. C'est un polymère anionique constitué d'une unité pentasaccharidique branchée, acétylée et pyruvylée. Les unités glucidiques qui la composent sont le glucose, le mannose et de l'acide glucuronique. La combinaison de ces deux polymères

permet d'obtenir des gels résistants aux conditions gastriques. En effet, la microencapsulation de bactéries probiotiques, par un mélange gellanexanthane stabilisé par des ions calcium, est efficace notamment pour protéger les cellules dans des conditions gastriques simulées ou lors de la conservation de microparticules dans du yaourt. (Jennifer et al ,2016)

F. Gomme arabique :

La gomme arabique est un exsudat de sève des tiges et branches des acacias. Elle est composée d'arrangements ramifiés de glucides et de protéines. Les matrices d'encapsulation composées de gomme arabique présentent une capacité limitée contre l'oxydation. Toutefois, combinée à d'autres polymères, la gomme arabique pourrait être un excellent candidat pour l'encapsulation. Sa faible utilisation en industrie peut s'expliquer par son coût élevé. (Jennifer et al ,2016)

G. Pectines :

Les pectines [F 5 000] sont extraites des parois de nombreux végétaux, notamment de fruits et légumes. Ces polyosides présentent une grande diversité de structure avec une chaîne primaire composée d'acide galacturonique et des ramifications α (1-4). Les pectines peuvent présenter des degrés de méthylation et d'estérification différents. L'acide galacturonique a la possibilité de se lier au Ca^{2+} , ce qui permet la formation d'un réseau, qui reste cependant moins stable que celui formé par l'alginate. (Jennifer et al ,2016)

III.5.1.2. Protéines :

A. Gélatine :

La gélatine [F 4 800] est une protéine d'origine animale issue de l'hydrolyse partielle du collagène. C'est un polymère fréquemment utilisé en industrie alimentaire et qui peut être retenu comme matrice d'encapsulation s'il est combiné à de la gomme de gellane, par exemple. En effet, à un pH inférieur au point isoélectrique de la gélatine, les charges positives situées sur le polymère interagissent avec les charges négatives portées par le polysaccharide anionique (Mandi et al, 2021).

B. Protéines laitières :

Le lait contient deux types de protéines :

les protéines de lactosérum (majoritairement β -Lactoglobuline et α -Lactalbumine) et les caséines [F 4 820]. Les protéines laitières sont naturellement d'excellents vecteurs pour les bactéries probiotiques. Les propriétés structurales et physico-chimiques assurent la production de microparticules ayant des propriétés ciblées. Tout d'abord, les protéines de lactosérum sont retrouvées dans la fraction liquide issue de la coagulation du lait lors de la fabrication du fromage. Ces protéines présentent une haute valeur nutritionnelle et d'excellentes propriétés fonctionnelles. Les protéines du lactosérum sont composées de protéines globulaires capables d'interagir avec une large gamme de molécules actives. Les protéines de lactosérum ont été utilisées pour développer des matrices d'encapsulation adaptées pour les bactéries probiotiques offrant ainsi une protection contre l'acidité rencontrée au niveau de l'estomac. Dans ce cas, la formation du gel résulte de la gélification des protéines en présence d'ions. Concernant les caséines, la coagulation enzymatique (avec ajout de chymosine ou de transglutaminase) peut être mise à profit pour former des gels dans lesquels les cellules sont retenues. L'avantage de ce type de système est que les microparticules ainsi produites sont insolubles dans des milieux aqueux, ce qui assure leur stabilité lors de leur stockage dans l'aliment. Ensuite, le réseau formé est suffisamment résistant pour protéger les bactéries des conditions stomacales et la remontée de pH observée au niveau intestinal permet de libérer des cellules viables (Mandi et al, 2021).

III.5.1.3. Fibres prébiotiques naturelles :

Des éléments prébiotiques tels que l'inuline, les fructo-oligosaccharides (FOS), les galacto-oligosaccharides (GOS), ainsi que les fibres végétales (lin, grenade, etc.) peuvent être directement incorporés dans la matrice d'encapsulation. Une fois libérés dans l'intestin, ces composés agissent comme substrat pour les bactéries probiotiques, établissant ainsi un système symbiotique (Mandi et al, 2021).

PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES

IV.1. Présentation du lieu de travail :

Notre travail pratique a été réalisé au niveau des laboratoires de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, de l'Université de Dr Moulay Tahar Saïda.

Les objectifs attribués à ce présent travail s'articulent autour des points suivants :

- Extraction de prébiotiques à partir de sources naturelles, et l'étude de leur potentiel pour la micro-encapsulation.
- Etude et contribution au développement de méthode pour la micro-encapsulation des probiotiques et prébiotiques.

IV.2. Extraction des prébiotiques :

IV.2.1. Extraction de la pectine :

A. Matériels nécessaires :

- Peaux fraîches d'oranges
- Acide citrique
- Vinaigre blanc
- Eau distillée
- Plaque chauffante avec agitateur
- Filtre à gaz
- Ethanol 70%
- Erlenmeyer
- Balance, PH mètre, entonnoir

B. Etapes du protocole : voici le protocole utilisé avec quelques modifications :

- Laver les peaux pour enlever les résidus
- Broyer les pelures fraîches



Figure 25: Des pelures d'orange broyé

- Mélanger 75gr de pelures dans 250ml d'eau distillée (PH de la solution obtenue PH=5.63)
- Ajuster le PH entre 2-2.5 (avec 200ml de vinaigre + 100gr d'acide citrique l'obtention d'un PH= 2.42)
- Chauffer à 80° pendant 90min sous agitation douce
- Laisser refroidir à température ambiante



Figure 26: Le mélange des pelures d'orange et d'eau distillée chauffé

- Filtrer pour récupérer le liquide contenant la pectine



Figure 27: Le filtrat à pectine

- Précipité la pectine obtenue dans le filtrat (250ml) par 02 volumes d'éthanol 70° (500ml)
- Laisser reposer 1h à 04°C
- Une couche blanche épaisse se forme : c'est la pectine



Figure 28: le filtrat à pectine avec l'éthanol après repos

- Récupération de la pectine par centrifugation (4000rpm pendant 12min)
- Rincer avec l'éthanol pour éliminer les impuretés

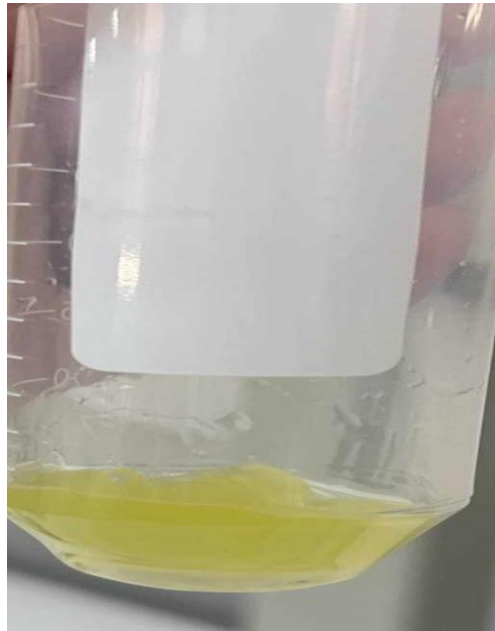


Figure 29: Le précipité du filtrat (la pectine) après centrifugation

Distribution de l'ensemble des précipités avec des couches fines sur des verres de montres et séchage au four à 50°C pendant 24h.

- Récupération de la pectine et conservation.

A. Calcul du rendement : Le rendement est calculé par la relation suivante :

$$R(\%) : (\text{Poids de la pectine obtenu} / \text{poids de la peau fraiche}) \times 100$$

$$R(\%) : (2.23/25) \times 100$$

Le rendement est de : 09%

IV.2.2. Extraction d'inuline :

A. Matériaux :

- Oignons frais
- Eau distillée
- Ethanol 96%
- Balance, mixeur, bécher
- Plaque chauffante sous agitation, entonnoir
- Thermomètre, centrifugeuse
- Flacons

B. Protocole :

- Peser 100gr de purée d'oignons déjà éplucher, laver, et mixé avec un peu d'eau distillée (rapport 1 :1) et peser là.
- Dans un bêcher mettez la purée et ajouter l'eau distillée (rapport 1 :10).

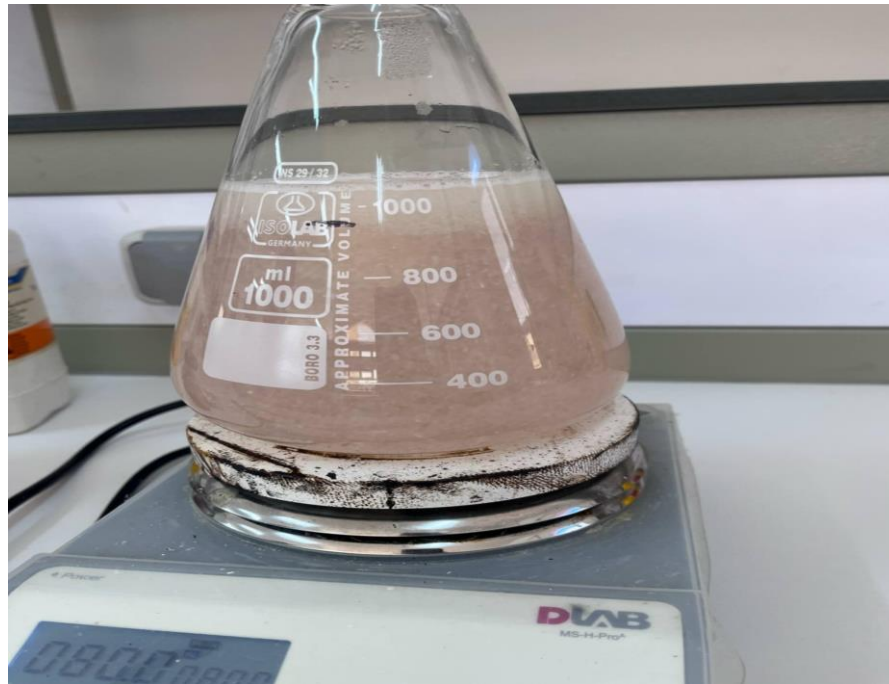


Figure 30: Mélange d'oignons et d'eau distillée sous agitation et chauffage

- Chauffer à 80°C pendant 45min sous agitation douce puis laisser refroidir.
- Filtrer la solution et récupérer le filtrat
- Ajouter 03 volumes d'éthanol 96% froid au filtrat et homogéniser doucement.
- Laisser à 04°C pendant 12h.
- Centrifuger à 4200rpm pendant 12min.
- Récupérer les culots puis sécher à 50°C.



Figure 31: L'inuline après séchage

- Récupérer et conserver l'inuline à température ambiante.

C. Calcul du rendement :

R(%) : (Poids de l'inuline obtenu/ poids de l'oignon frais) X 100

$$R(\%) = (0.65/100) \times 100$$

Le rendement d'inuline est de : 1%

IV.3. Les souches probiotiques :

- a) **Origine des souches probiotiques utilisées :** les souches utilisés comme probiotique au cours de cette recherches sont extraite à partir du fromage de chèvre.
- b) **Revivification et purification des souches probiotiques :** en suivant le protocole énoncé dans une thèse (Boubkeur, 2019).
 - Sur 10 tubes contenant la gélose MRS incliné, on ensemence les souches probiotiques fournie, puis une incubation se fait à 37°C pendant 24h-48h.
 - Les souches lactiques (*Lactobacillus*) revivifiées ont été purifiées par ensemencement par stries d'épuisement sur gélose MRS et incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.
 - Cette opération a été répétée jusqu'à l'obtention d'un résultat uniforme de point de vue morphologie des bactéries lactiques, nous renseignant sur leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques concernant leur aspect (taille, forme et couleur).
- a) **Caractéristiques macroscopiques :** En se basant sur l'observation à l'œil nu des colonies de Lactobacilles afin de déterminer l'aspect, la taille, la forme, et la couleur des colonies des cultures bactériennes obtenues sur gélose (petites colonies rondes avec surface lisse et couleur blanche).
- b) **Caractéristiques microscopiques :** L'examen microscopique a été effectué après coloration de Gram, sur une culture, Elle permet de décrire la forme des cellules, leur mode d'association (Gram +, petits bâtonnets en chainettes).
- c) **Conservation des souches probiotiques :** le protocole utilisé est énoncé dans la thèse (Bordji, 2020).
 - 1) A courte durée : Les souches pures, ont été ensemencées dans des tubes étiquetés inclinés de gélose MRS. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les tubes ont été placés à 4°C au réfrigérateur.

2) A longue durée : Dans des conditions d'asepsie, les 09 souches obtenues sont ensuite repiqué dans un Bouillon MRS : dans 05 flacons mentionnés (C7, C14, C19, C36, C43), contenant chacun 30ml de bouillon et 04 autres tubes mentionnés (C2, C9, E1, S4) contenant 10ml de bouillon pour chacun. Après, une incubation est réalisé à 37°C pendant 24h. Les cultures ont été centrifugées à 4500rpm pendant 10min pour récupérer les culots cellulaires dans des cryo-tubes. Ces culots sont ensuite additionné par un mélange stérile de glycérolé et du lait écrémé puis conserver à 04°C.

d) Dosage du PH et de l'acide lactique des souches probiotiques : on utilisant le protocole mentionner dans la thèse (El-Gendy, 2012)

Matériel :

- Tubes à essaie contenant bouillon MRS
- Souches probiotiques (*Lactobacillus*)
- Burette gradué
- NaOH (0,1N)
- Eau distillé
- Phénolphtaline
- PH mètre

Protocole :

- Ensemencé les souches probiotiques dans un bouillon MRS sur des tubes étiquetés.
- Incuber les tubes dans une étuve à 37°C pendant 24h.
- Après incubation, centrifuger le contenu des tubes à 400rpm pendant 20min et récupérer les surnageant des souches.

e) Dosage du PH :

- Doser le PH de chaque surnageant à l'aide d'un PH mètre et noter les résultats.

f) Dosage de l'acide lactique : par protocole de Titration

- Sur un V connu de surnageant et dans un becher, ajouter 02 gouttes de phénolphtaline.
- Mettre le mélange sur un agitateur.
- Ajouter doucement le NaOH 0,1N (préparer par 0,4gr dans 100ml d'eau distillé) à l'aide d'une burette gradué jusqu'au apparition d'un virage de couleur rose persistante.
- Noter le volume de NaOH ajouté à chaque souche.

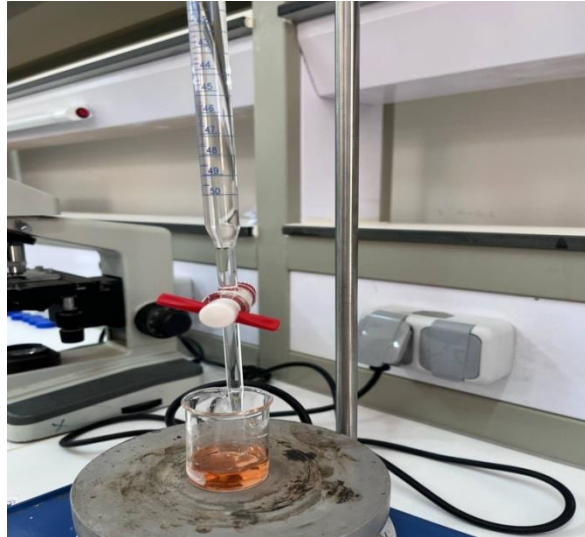


Figure 32: Dosage de l'acide lactique par titration (Phénolphthaline/NaOH).

IV.3.1. Test de l'activité anti-oxydante des souches :

Le DPPH est un radical libre de couleur violette, est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés anti-radicalaires (Molyneux, 2004).

La mise en évidence du piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) a été réalisée selon le protocole de (Lee et al, 2016) .

A. Matériel :

- Culture des souches (24h dans un bouillon MRS)
- Solution de DPPH 60% par méthanol
- Centrifugeuse
- Spectrophotomètre (517nm) + cuves

B. Protocole :

- Centrifuger les souches contenus dans le bouillon MRS à 4000rpm pendant 10min.

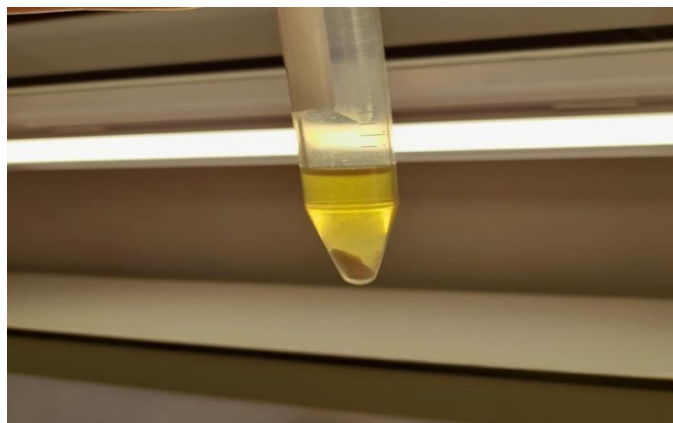


Figure 33: Cultures de souches dans bouillon MRS après centrifugation

Récupérer le surnageant et à l'aide de micropipette déposer 1ml de surnageant dans des tubes.

- Ajouter à chaque tube 1ml de solution DPPH.
- Incuber à l'obscurité et à température ambiante pendant 30min.
- La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Velazquez *et al.*, 2003 ; Pieniz *et al.*, 2014).

Contrôle négatif : Ajouter un tube témoin contrôle négatif (1ml de bouillon MRS+ 1ml de DPPH

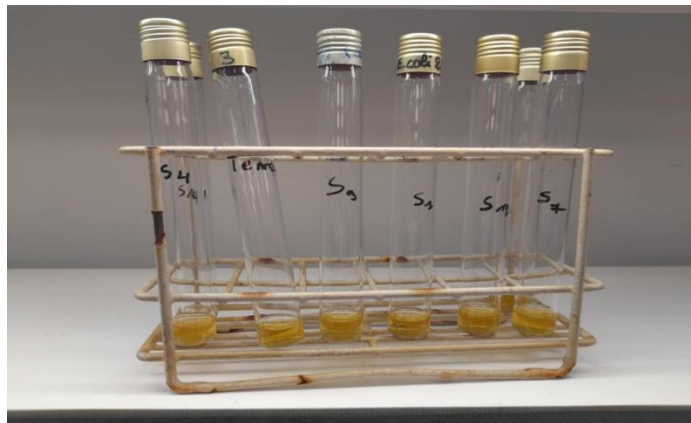


Figure 34: le mélange de surnageant avec DPPH après 30min d'incubation

Contrôle positif : par préparation d'acide ascorbique (vitamine C) avec différentes dilutions (1/1), (1/2), (1/10), (1/20), (1/100). Ajouter à chaque 1ml de dilution, 1ml de DPPH dans différents tubes et incuber à l'obscurité pendant 30min puis mesurer l'absorbance.

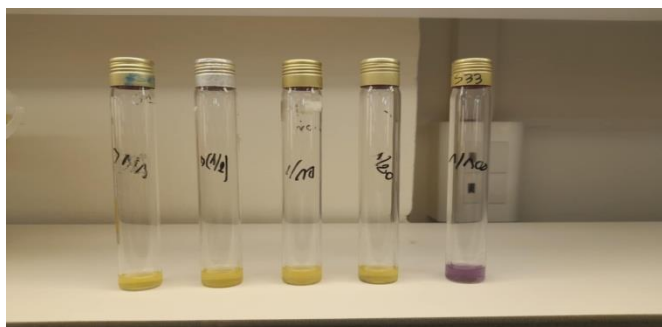


Figure 35: Les dilutions d'acide ascorbique mélangé par DPPH après 30min d'incubation

IV.3.2. Les test de viabilité :

IV.3.2.1. Dans un milieu minimum :

Un milieu minimal exempt de source de carbone a été utilisé pour étudier la capacité de probiotiques sélectionnés à se développer sur des oligosaccharides prébiotiques sélectionnés, les utilisant comme source de carbone. Le milieu de croissance (pH e 6,8) contenait du phosphate disodique (64 g/L); du phosphate monopotassique (15 g/L); du chlorure de sodium (2,5 g/L); du chlorure d'aluminium (5 g/L); et de l'eau distillée (1 L). Le milieu a été stérilisé, puis du sulfate de magnésium (2 mL/L), du chlorure de calcium (0,1 mL/L) et une source de carbone (20 mL/L) ont été ajoutés.

Les sources de carbones utilisés sont : la pectine, la cellulobiose et un autre qui est un témoin positif : le glucose. Ce protocole est testé sur 03 souches : S4, S14 et S19

(Wichienchot et al, 2010 modifié).

Après 48h d'incubation réaliser 02 dilution pour chaque flacon et tubes, puis exercer un ensemencement de surface avec 0,1ml de chaque cultures. Incuber à 37°C pendant 24h.

IV.3.2.2. Dans un suc gastrique simulé :

L'acidité de l'estomac est la première barrière à la survie des microorganismes, car elle a un pH varié de 1.5 à 6 après la prise alimentaire. Pour l'heure, il n'y a pas de véritable consensus sur le niveau de pH et la composition exacte du milieu. (Marteau, 2001).

L'action antimicrobienne de la pepsine qui est une enzyme sécrété par l'estomac, constitue la deuxième barrière biologique contre les éléments intrus ainsi qu'à la survie des bactéries dans le tractus intestinale (Pieniz et al, 2014).

Les cellules bactériennes des souches lactiques d'une culture jeune ont été récupérées par centrifugation (4500 rpm pendant 10 minutes à 4°C), le culot a été rincé 3 fois par PBS à pH=7. Après une autre centrifugation,

les cellules ont été remises en suspension dans 3 ml du NaCl 0.5% + Hcl à pH = 2 additionné à 0,3% de la pepsine.

Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 2h heures, puis ils ont été ensemencées sur milieu MRS solide (Pieniz et al, 2014).

La résistance des souches a été évaluée par la détermination du comptage des cellules incubation. (Hosseini et al, 2009).

IV.3.3. Activité antimicrobienne :

- **Méthode indirecte (*Well diffusion assay*)** : Pour évaluer l'effet inhibiteur, une méthode de (*Well diffusion assay*) a été réalisée pour cribler les souches bioactives.

Pour ce faire, on a recherché les inhibitions des éventuels facteurs susceptibles de causer l'inhibition des bactéries indicatrices. Le surnageant de centrifugation a été filtré (0.22µm) puis testé sur la souche indicatrice (Lacroix et al, 2011).

Selon la méthode de (Berefoot et Klaenhammer, 1983), la diffusion d'agent inhibiteur dans des puits creusés dans une gélose MRS contenant dans sa masse une souche indicatrice.

Des boîtes de Petri contenant 12 ml de la gélose MRS ont été recouvertes de 8 ml molle de MH (Mueller Hinton) ensemencé de la souche indicatrice ajustée à 0.5 McFarland. Après solidification, des puits de 4 mm ont été creusés dans la gélose (à travers la couche supérieure) à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Les boîtes ont été séchées à température ambiante pendant 10 min avant que les puits soient remplis d'extrait de culture.

Après la diffusion de l'extrait de culture dans la gélose (1 à 2 heures à 4°C), les boîtes ont été incubées pendant 18 heures à 37°C, puis ont été examinées pour la présence des zones d'inhibition autour des puits, exprimée en mm.

IV.4. La micro-encapsulation des probiotiques et prébiotiques :

- **Préparation de la solution de pectine** : ajouter 1gr de pectine dans un tube à 20ml d'eau distillé puis dissoudre dans un bain marie.
- **Préparation de la solution d'inuline** : mettre 0,5gr d'inuline dans 10ml d'eau distillé et faire dissoudre dans un bain marie.

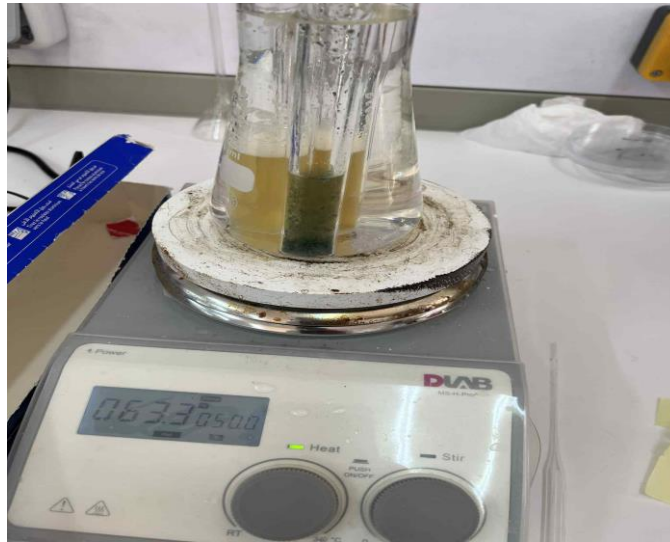


Figure 36: Préparation de pectine et d'inuline en solution

- **Préparation de la solution alginate** : ajouter 04gr d'alginate à 200ml d'eau distillé agité puis mettre à l'autoclave le mélange pendant 15min.
- **Préparation de la solution de gélatine** : ajouter 01gr de gélatine à 100ml d'eau distillé puis filtrer le mélange.
- **Préparation de la solution de chitosane** : ajouter 05ml d'acide acétique à 500ml d'eaux distillées + 04gr de chitosane. Agiter le pendant 24h.
- **L'encapsulation** : Dans 25 ml d'un mélange d'alginate et de gélatine ajouter pectine(6,6ml) ou inuline(3,3) avec 2 ml de souches probiotiques homogéniser le mélange puis injecter 1 volume de notre mélange dans 5 volumes de solution CaCl₂ (Seward Circulator 400, Angleterre)

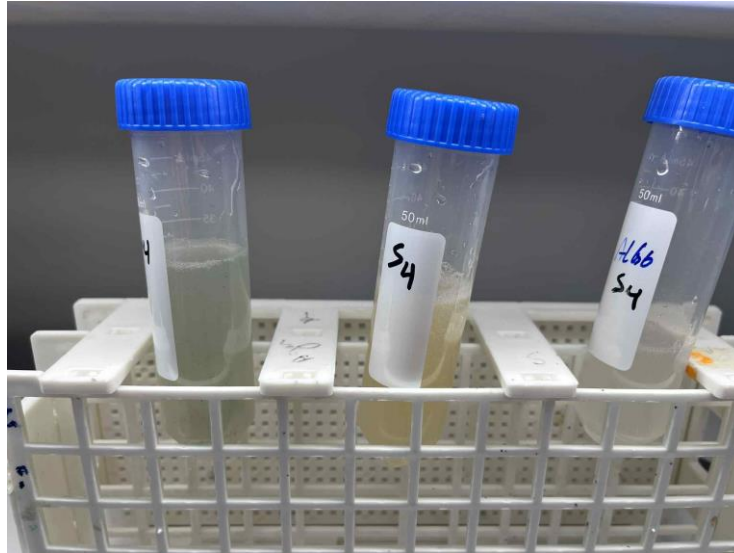


Figure 37 : La disposition de la souche 04 en trois états : seul, avec inuline et avec pectine

IV.4.1. Efficacité de l'encapsulation :

L'efficacité de l'encapsulation a été déterminée par la libération des bactéries encapsulées par dissolution de la paroi d'alginate de calcium dans une solution de citrate de sodium à 1 % ajustée à pH 6, puis par trempage des capsules pendant 15 minutes à 37 °C et homogénéisation à l'aide d'un instrument Stomacher (Seward Circulator 400, Angleterre) à 230 tr/min pendant 3 minutes. Les numérations de viabilité ont été effectuées sur gélose MRS à fin de 48 h d'incubation à 37°C (Krasaekoopt et al, 2004).

IV.4.2. Test de viabilité des capsules dans un suc gastrique simulé :

Ont été utilisés selon la méthode décrite par (Valero-Cases et Frutos, 2015), avec de légères modifications. Les sucs gastriques simulés (SJS) ont été préparés avec un bouillon MRS et 3 g/L de pepsine. Le pH a été ajusté à 2 avec de l'HCl 0,1 N.

Les microcapsules (1 g) ont été homogénéisées pendant 2 min dans un vortex (Selecta, Barcelone, Espagne) avec 9 ml de SJS à 37 °C, puis incubées pendant 60 min à 37 °C.

Les numérations de viabilité ont été effectuées sur gélose MRS à fin de 48 h d'incubation à 37°C.

IV.5. Co-culture d'un probiotique potentiel, de *Salmonella* et de *Staphylococcus* :

Une culture nocturne de probiotiques (106 UFC/ml) et de *Salmonella enterica* (103 UFC/ml) a été inoculée dans 10 ml de milieu de co-culture contenant un volume égal de bouillon tryptica-soja (MSR) double concentration et de bouillon tryptica-soja (TSB) double concentration (MSR/TSB). Le milieu a été incubé à 37 °C sous agitation. Le milieu de co-culture contenant uniquement du Sa ou du Se a servi de témoin. Les cellules viables issues de Se et de Sa co-cultivées avec les probiotiques/prébiotiques S14 et S19 sélectionnés et co-encapsulés ont été surveillées à 0, 24, 48 et 72 h par numération sur gélose (MSA et SS) respectivement.

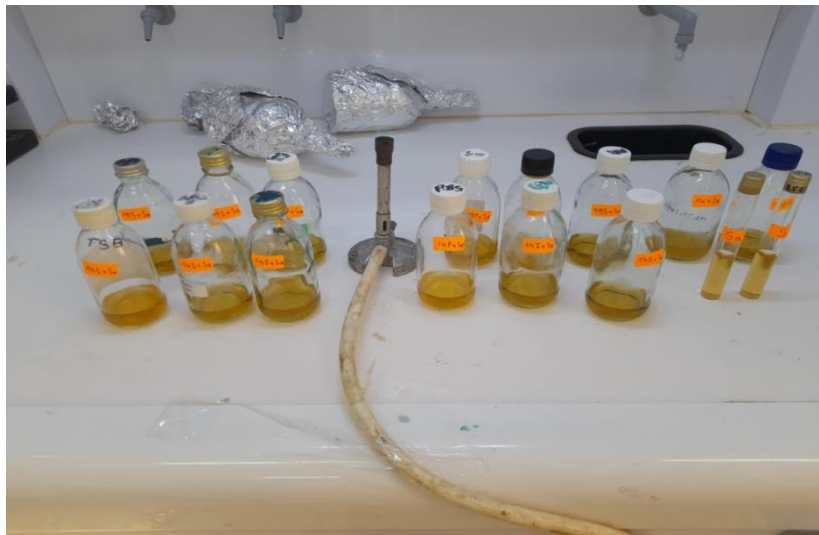


Figure 38: flacons et tubes contenant les co-cultures avant incubation

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

V.1. Les prébiotiques extraites :

V.1.1. Extraction de la pectine :

L'extraction de la pectine à partir des pelures d'orange fraîches a permis d'obtenir un rendement de 09% en pectine sèche. Ce résultat est légèrement inférieur à certains valeurs rapporté dans les thèses de (Yapo et Koffi, 2006) qui varient généralement entre 10% - 25%. L'ajout de l'agent acidifiant vinaigre et acide citrique a permis d'obtenir un PH= 2,42. Cependant ces acides sont plus faibles comparés à l'acide chlorhydrique utilisé dans la thèse (Tlidjane et Saifi, 2021) qui a révélé un rendement de 13% de pectine. Cette acidité modéré pourrait expliqué l'abaissement du rendement.

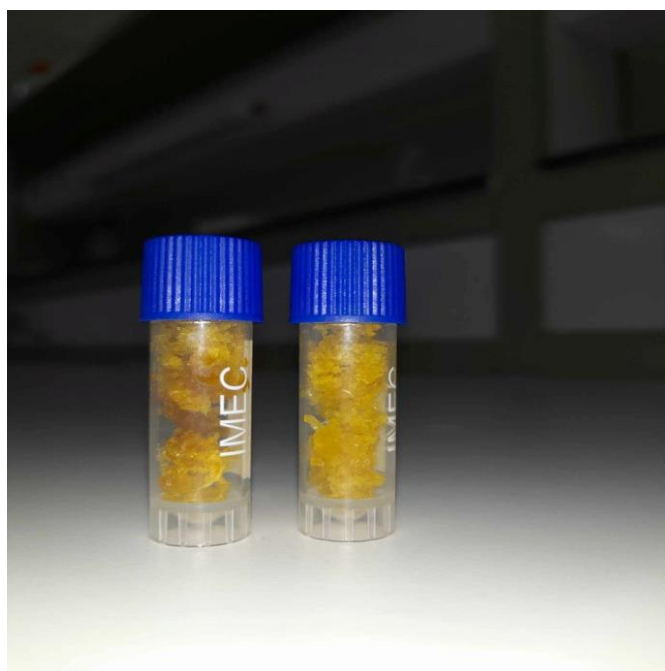


Figure 39: La pectine extraite des pelures d'oranges fraîches

V.1.2. Extraction de L'inuline :

L'extraction d'inuline à partir d'oignons en purée a donné un rendement de 1%. Ce résultat est relativement faible comparé au rendement obtenus dans d'autres travaux utilisant des sources végétales plus riche en inuline. (Silarbi et Ferroukhi, 2017), ont obtenu un rendement de 26,85% à partir d'artichaut en utilisant un chauffage conventionnel optimisé. De meme (Ronkart et al, 2007) ont rapporté un rendement compris entre 15- 20% pour l'extraction d'inuline à partir des racines de chicorée. Bien que la température de 80°C utilisée dans notre

protocole soit dans la plage généralement favorable d'extraction, les écarts de rendements s'expliquent principalement par la faible teneur d'oignons en inuline comparativement à des plantes comme chicorée ou artichaut.

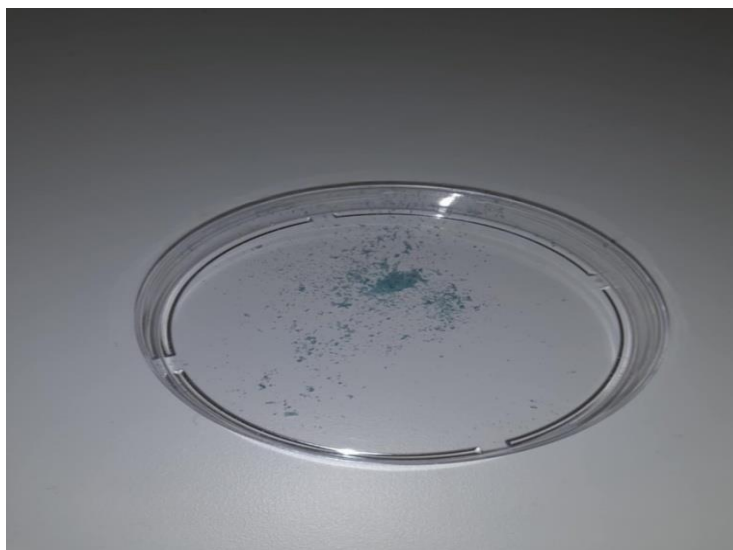


Figure 40: L'inuline obtenue de l'extraction

V.2. Caractères morphologiques et microscopiques :

L'observation macroscopique des colonies obtenu de gélose MRS solide incliné d'incubation à 37°C, a permis de décrire deux forme différent, des colonies répondant aux critères des bactéries lactiques, elles dégagent aussi une odeur particulière, semblable à celle des laits fermentés à cause de la production d'acide lactique. La coloration de Gram indique que les bactéries sont de Gram +, possèdent la forme bacille et coques et sont disposées en diplocoques ou en courtes chaînettes et en amas.

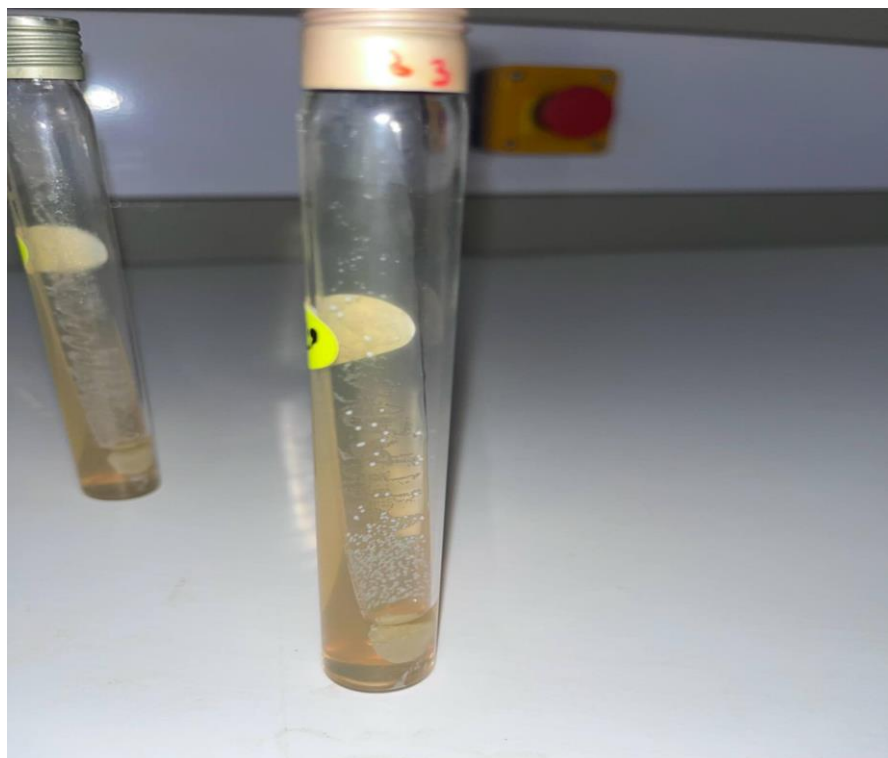


Figure 41: *Lactobacillus* sur gélose MRS incliné après incubation

V.3. Résultats du Dosage de PH et de l'acide lactique des souches probiotiques :

3.1. Résultats du dosage de PH :

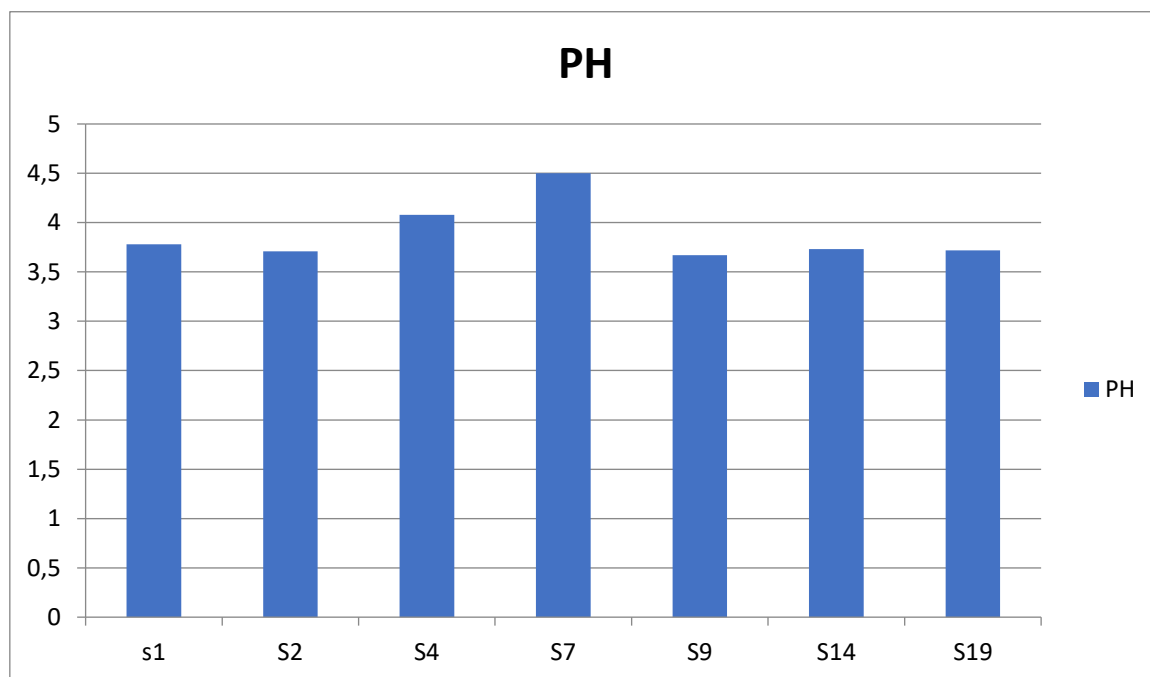


Figure 42: Histogramme démontrant les résultats du PH dosé

Les résultats obtenus montrent que les différentes souches présentent des capacités variables de production de l'acide lactique, avec des PH comprises entre 3,67 (S9) et 4,50 (S7), ce qui témoigne une hétérogénéité dans la capacité de production d'acide lactique par les souches.

Les souches S9 (PH=3,67), S2 (PH= 3,71), S19 (PH=3,72), S14(PH= 3,73), S1(PH=3 ;78) ont montré une acidification marqué du milieu. Ces faibles valeurs de PH traduisent une production élevé de l'acide lactique. Ce niveau d'acidification est généralement requis pour inhiber la croissance des micro-organismes indésirables. On revanche, les souches S4 (PH= 4,08) et S7(PH=4,50) présentent un taux d'acidité plus modéré, suggérant une activité fermentaire plus faible. Cette différence peut être due à des variations métaboliques intrinsèques ou à des différences dans la vitesse de croissance. Ces résultats sont globalement cohérents avec les résultats de (Lorey et Vuyst, 2014) qui montre que les souches de *Lactobacillus* ont un PH entre 3,5 à 5,5 selon les espèces et les conditions de culture.

3.2. Résultats du dosage de l'acide lactique :

La formule utilisée pour calculer l'acide lactique donne le pourcentage de l'acide lactique dans 100ml de solution :

$$\text{Acide lactique(\%)} = \frac{V(\text{NaOH en ml}) \times 0,1 \times 90,08 \times 100}{V(\text{echantillon en ml}) \times 1000}$$

Tableau 4: Mesure de l'acide lactique

Souche	V (échantillon) ml	V(NaOH) ml	% d'acide lactique dans 100ml
S1	4	3,1	0,70
S2	4 ,5	4,1	0,82
S4	5	3	0,54
S7	4,1	3	0,65
S9	4,6	4,1	0,80
S14	4	3,5	0,79
S19	4 ,8	3,9	0,73

Les résultats présentés dans le tableau iniquent des variations dans le Volume de NaOH pour titrer les différentes souches. En moyenne, les valeurs de V(NaOH) pour atteindre la couleur rose est augmenté avec les souches : S2(4,1ml), S9(4,1ml) et S19(3,9 ml). Une étude antérieure (Smith et al, 2018), à évolué l'acidité de divers substrat en utilisant une méthode similaire, rapporte que les souches de *Lactobacillus* , nécessitent en moyenne 3-6 ml de NaOH pour les titrations.

Le pourcentage d'acide lactique varie entre S7(0,44%) à S2(0,82%). Ces pourcentages sont cohérents avec les résultats trouvés dans l'étude de (Zhang et al, 2021), qui a rapporté des taux de production variant entre 0,50% - 0,80% pour différentes souches de *Lactobacillus*.

3.3. Résultats des tests de l'activité anti-oxydante :

Le pourcentage d'inhibition ce calcul par la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A(\text{témoin}) - A(\text{souche})}{A(\text{témoin})} \times 100$$

A (témoin)

Tableau 5: Mesure de l'activité antioxydante des souches probiotiques

Souche	Absorbance	% d'inhibition
S1	0,117	69
S2	0,100	73
S4	0,132	65
S7	0,119	68
S9	0,127	66
S14	0,119	68
S19	0,115	70
Témoin (DPPH seul)	0,381	0

Le témoin possède une absorbance de 0,151 avec 0% d'inhibition, avec des souches qui ont provoquées une baisse de cette absorbance ce qui démontre que les souches possèdent un effet antioxydant plus ou moins marqué.

Les résultats obtenus montrent que les différentes souches possèdent des pourcentages d'inhibition qui varient de 65% (S4) à 73% (S2), indiquant une capacité antioxydante notable pour l'ensemble des souches. (Zommara et al, 2021) ont rapporté que certaines souches de *Lactobacillus* présentaient une inhibition du DPPH atteignant 75%, ce qui est proche de la performance de la souche S2 dans notre étude. De même, une étude menée par (Lin et Yen, 1999) sur diverses souches lactiques a montré que l'activité antioxydante pouvait atteindre entre 60 et 80% selon les espèces et les conditions de cultures. Par ailleurs, (Amaretti et al, 2013) ont noté que les propriétés antioxydantes des probiotiques dépendent fortement de la source d'isolat et conditions de cultures. Cela pourrait expliquer l'inhibition légèrement faible des autres souches. S1, S7,

S14 et S19 montrent des pourcentages similaires autour de 68-70% suggérant une certaine homogénéité de réponse probablement liée à des mécanismes similaires de piégeage des radicaux libres.

Tableau 6: Mesure de l'activité antioxydante du témoin (acide ascorbique)

Dilution	Absorbance	% d'inhibition
(1/1)	0,079	79
(1/2)	0,173	55
(1/10)	0,221	42
(1/20)	0,295	23
(1/100)	0,323	15
Témoin (DPPH seul)	0,381	0

A La dilution (1/1), la vitamine C montre un pouvoir antioxydant élevé avec 79% d'inhibition, les souches S2, S19 et S1 présentent des % proches ou légèrement inférieurs à la vitamine C non diluée. Les autres souches (S4, S7, S9 et S14) se situent entre les dilutions intermédiaires (1/1) et (1/2) et montrent une inhibition modérée. La dilution (1/10), (1/20) et (1/100) n'offre qu'un faible pouvoir ce qui confirme que l'efficacité dépend fortement de la dose.

V.4. Résultats de l'activité antimicrobienne :

Tableau 7: Mesures des zones d'inhibition des souches probiotiques vis-à-vis les souches pathogènes

Souche/ Zone d'inhibition (mm)	S1	S2	S4	S7	S9	S14	S19
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	21	20	18	27	15	16	19
<i>Salmonella enterica</i> ATCC14028	18	16	20	18	17	17	18
<i>Escherichia coli</i> ATCC739	18	15	18	15	19	15	18



Figure 42: Test d'activité antimicrobienne

Le tableau 07 met en évidence les zones d'inhibition (en mm) formées par différentes souches probiotiques testées contre trois pathogènes courants :

Staphylococcus aureus, *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*. Ces données traduisent le potentiel antimicrobien des souches sélectionnées.

- **Vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* :**

Les zones d'inhibition varient de 15 mm (S9) à 27 mm (S7). La souche S7 se démarque nettement avec une forte activité inhibitrice (27 mm), indiquant une excellente capacité à produire des composés antimicrobiens (acides organiques, bactériocines, peroxydes...). Ces résultats sont comparables à ceux de (Mokoena, 2017), qui a observé des zones d'inhibition allant de 12 à 30 mm pour des souches lactiques selon leur production de substances bioactives.

- **Vis-à-vis de *Salmonella enterica* :**

Les zones d'inhibition sont plus homogènes, allant de 16 mm (S2) à 20 mm (S4). S4 est la souche la plus active contre *Salmonella*, suivie de S1 (18 mm) et S7 (18 mm). Cela indique une activité antibactérienne modérée à bonne, cohérente avec les mécanismes connus d'inhibition des entérobactéries par les lactobacilles, notamment via l'acidification du milieu (Hernandez et al, 2021).

- **Vis-à-vis d'*Escherichia coli* :**

L'inhibition contre *E. coli* varie entre 15 mm (S2, S4, S14) et 19 mm (S9). Les souches S9 (19 mm) et S19 (18 mm) montrent une meilleure efficacité contre cette bactérie. Ces résultats confirment que certaines souches sont capables d'exercer un effet antagoniste pertinent même contre les bactéries Gram-négatives, bien que ces dernières soient souvent plus résistantes aux bactériocines que les Gram-positives.

Les données issues de ce tableau confirment la capacité antimicrobienne satisfaisante des souches probiotiques étudiées. Ces souches, pourraient être valorisées pour des applications ciblant des pathogènes spécifiques. Ces résultats soutiennent l'intérêt de les encapsuler avec des prébiotiques, dans une optique de formulation synbiotique à effet antimicrobien renforcé.

V.5. Résultats des tests de viabilité :

5.1. Dans un suc gastrique simulé :

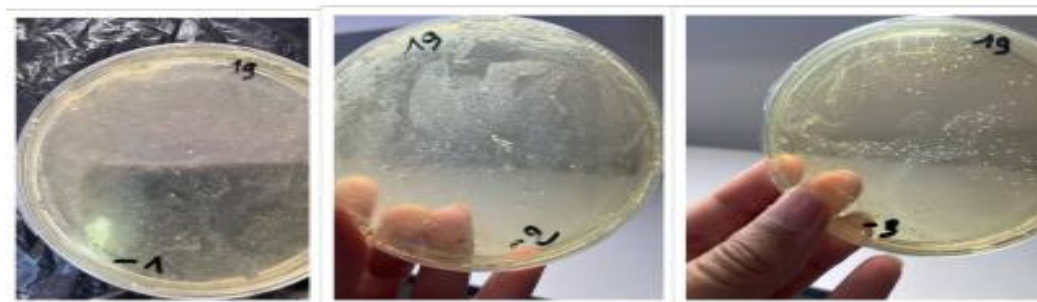


Figure 43: Test de viabilité de différentes dilutions de la souche S19

Tableau 8: Résultats de viabilité de différentes souches avec différents dilutions par UFC/ml

Souche / Dilution	S4	S14	S19
10 ⁻¹	7,8x10 ³	7,7 × 10 ³	3,4 × 10 ³
10 ⁻²	9,6 × 10 ⁴	8,3 × 10 ⁴	9,2 × 10 ⁴
10 ⁻³	1,54 × 10 ⁶	5,0 × 10 ⁵	1,22 × 10 ⁶

Les résultats montrent la présence de colonies viables sur gélose MRS après ensemencement des dilutions successives des souches. Le comptage des unités formant colonies (UFC/ml) révèle des concentrations variables selon les dilutions : par exemple, la souche S4 atteint $1,54 \times 10^6$ UFC/ml à la dilution 10^{-3} , tandis que S14 et S19 présentent respectivement $5,0 \times 10^5$ UFC/ml et $1,22 \times 10^6$ UFC/ml à la même dilution. Un nombre de colonies plus élevé a été observé dans les dilutions les plus faibles, ce qui témoigne d'une forte viabilité bactérienne.

La croissance bactérienne observée indique que, malgré l'exposition à un environnement acide et enzymatique, une proportion significative de cellules bactériennes est restée viable et capable de se multiplier. Ces données mettent en évidence la capacité des souches testées à maintenir leur viabilité après une exposition prolongée à un suc gastrique simulé. Cette aptitude à résister à un environnement acide et enzymatique constitue un indicateur important pour envisager leur utilisation comme bactéries probiotiques, notamment pour les applications orales, où le passage par l'estomac est inévitable.

5.2. Dans un Milieu Minimum :

Tableau 9: résultats de viabilités des souches dans un MM additionné par différents prébiotiques

Souche / type de prébiotique	S9	S9 ⁻¹	S14	S14 ⁻¹	S19	S19 ⁻¹
Pectine	1,71 × 10 ³	1,1 × 10 ⁴	2,96 × 10 ³	2,80 × 10 ⁴	1,87 × 10 ³	1,00 × 10 ⁴
Cellulobiose	2,73 × 10 ³	2,59 × 10 ⁴	2,82 × 10 ³	2,24 × 10 ⁴	2,8 7 × 10 ³	1,91 × 10 ⁴
Témoin (glucose)	2,92 × 10 ³	2,81 × 10 ⁴	2,85 × 10 ³	2,94 × 10 ⁴	2,80 × 10 ³	2,75 × 10 ⁴

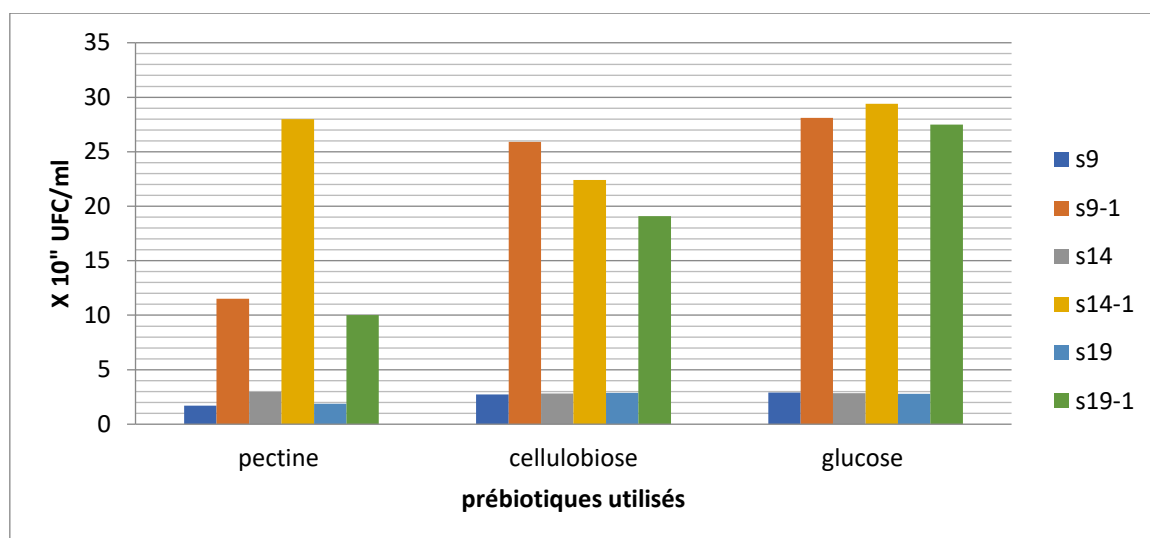


Figure 45: Histogramme qui représente la viabilité des souches dans un MM additionné par différents prébiotiques

L'objectif de cette expérience était d'évaluer l'effet des prébiotiques extraites sur la viabilité des souches probiotiques cultivés dans un milieu minimum, par rapport à un témoin contenant du glucose comme source unique de carbone.

- **Pour la pectine :** les souches S9, S14, S19 ont présentés des valeurs de viabilité respectives de, $1,71 \times 10^3$, $2,96 \times 10^3$ et $1,87 \times 10^3$ UFC/ml ce qui indique une bonne capacité de métabolisation de ce polysaccharide. Les dilutions montrent une variation tout en maintenant une tendance globale positive.



Figure 44: viabilités des souches dans un milieu MM additionner par la pectine

Pour la cellulobiose : La cellulobiose s'est révélée être un prébiotique particulièrement favorable à la viabilité des souches testées. Les trois souches (S9, S14 et S19) ont affiché des concentrations allant de $2,73 \times 10^3$ à $2,87 \times 10^3$ UFC/ml sans dilution, et atteignant jusqu'à $2,59 \times 10^4$ UFC/ml après dilution, ce qui traduit une croissance bactérienne importante et constante. Ces résultats mettent en évidence une forte affinité des *Lactobacillus* pour la cellulobiose, un disaccharide dérivé de la cellulose, qui semble être facilement métabolisé par les enzymes impliquées dans la dégradation des glucides complexes. Cette aptitude suggère un potentiel prébiotique réel pour la cellulobiose, notamment dans des formulations ciblant ces souches.

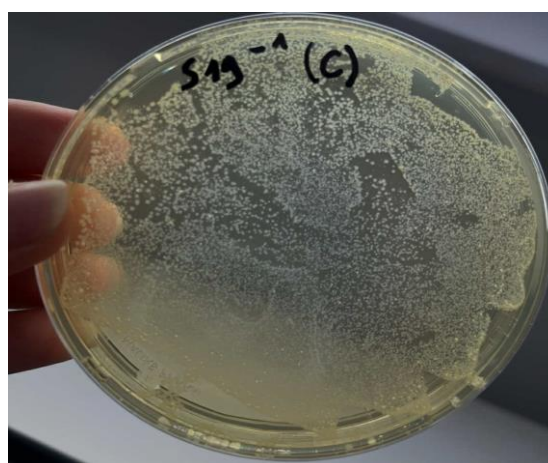


Figure 45: Viabilité de la 1ere dilution de la souche S19 dans un MM+cellulobiose

Pour le témoin (glucose) : le glucose a servi de témoin positif de croissance, étant une source de carbone facilement métabolisable. La viabilité reste élevée pour toutes les souches jusqu'à $2,94 \times 10^4$ UFC/ml après dilution.



Figure 46: Viabilité de la 1ere dilution de la souche 09 dans le glucose (témoin)

L'addition des prébiotiques dans un MM améliore significativement la viabilité des souches probiotiques. Ces résultats confirment non seulement leur capacité à métaboliser certains polysaccharides, mais aussi l'intérêt de développer des formulations synbiotiques (prébiotique+probiotique) spécifiques. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de (Tarifa et al, 2022), qui ont utilisé des microparticules de pectine comme matrice synbiotique pour les probiotiques.

V.6. Résultats de la micro-encapsulation :

La micro-encapsulation des probiotiques et prébiotiques repose sur la gélification ionotrope de l'alginate renforcé par l'adjonction de gélatine pour augmenter la stabilité et la souplesse des capsules formées. La méthode utilisée (goutte à goutte) dans le CaCl_2 a permis la formation rapide de billes. Par ailleurs, chaque souche a été encapsulée selon 03 conditions : seule, avec pectine ou avec inuline comme prébiotique. Cela vise à créer une symbiose fonctionnelle (synbiotique), favorisant la croissance des bactéries.

Pour la pectine les capsules obtenues sont de couleur beige, ronde de tailles similaires. L'inuline a permis d'obtenir des billes bleuâtre alors que les souches seuls encapsulées ont permis d'obtenir des billes blanches.

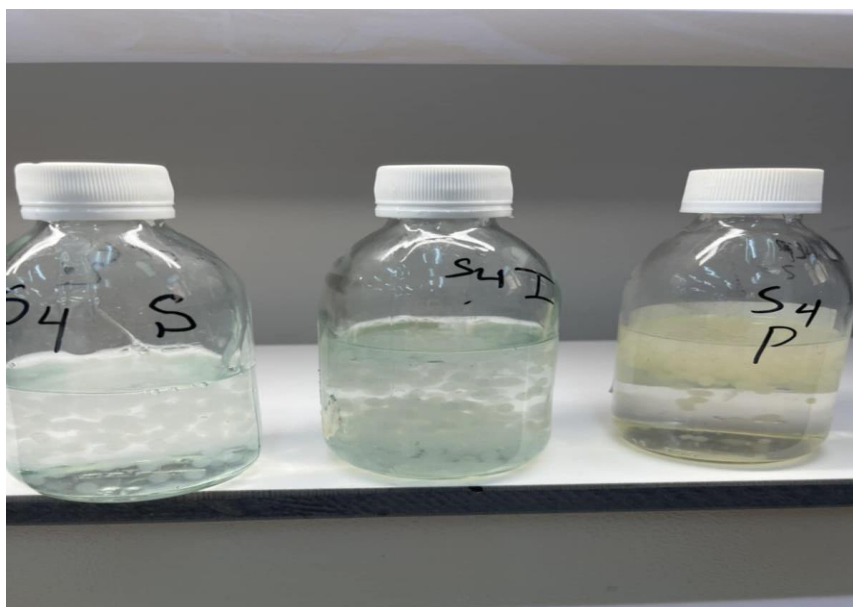


Figure 47: La souche 04 encapsulé dans les trois conditions



Figure 48: La souche 14 encapsulé dans les trois conditions

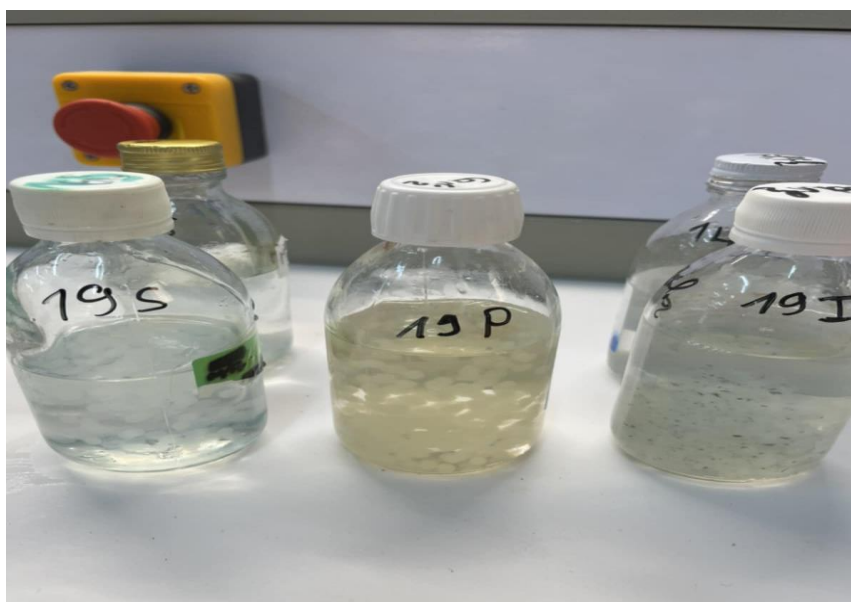


Figure 49: La souche 19 encapsulé dans les trois conditions

Les capsules obtenues ont été soumises à un séchage par filtration sous vide, méthode permettant une déshydratation progressive. L'observation des capsules montre une homogénéité.. Ce complexe est bien documenté pour améliorer la résistance mécanique et limite la perméabilité aux acides comme confirmé dans les travaux de (Tarifa et al, 2022)

Ces capsules, ont été soumises à une filtration sous vide, méthode permettant une déshydratation progressive et douce, évitant la perte de viabilité par stress thermique, tout en assurant une structure compacte et uniforme. L'observation des capsules montres une homogénéité satisfaisante, critère

essentiel pour garantir une libération contrôlée des probiotiques et prébiotiques dans l'intestin. Les capsules sont à 03mm et environ 8 gr de poids.

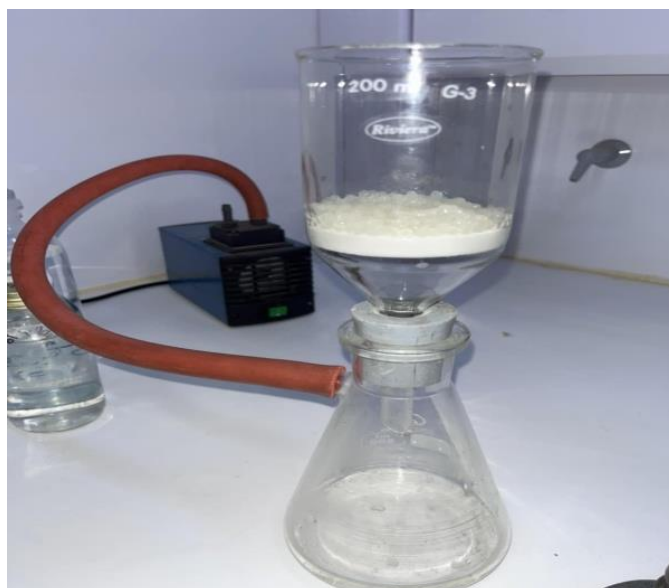


Figure 50: Filtration sous vide des capsules

6.1. Résultats de l'efficacité et de viabilité des capsules:

Tableau 10: Résultats de viabilité de différents formulations de la souche S19 vis-à-vis les conditions gastriques

Souche	S19 + pectine	S19+ inuline	S1 9 seul capsulé	S1 9 non capsulé
Nombre par UFC/ml	$3,7 \times 10^1$	$1,75 \times 10^2$	1, 13×10^2	8, 9×10^1

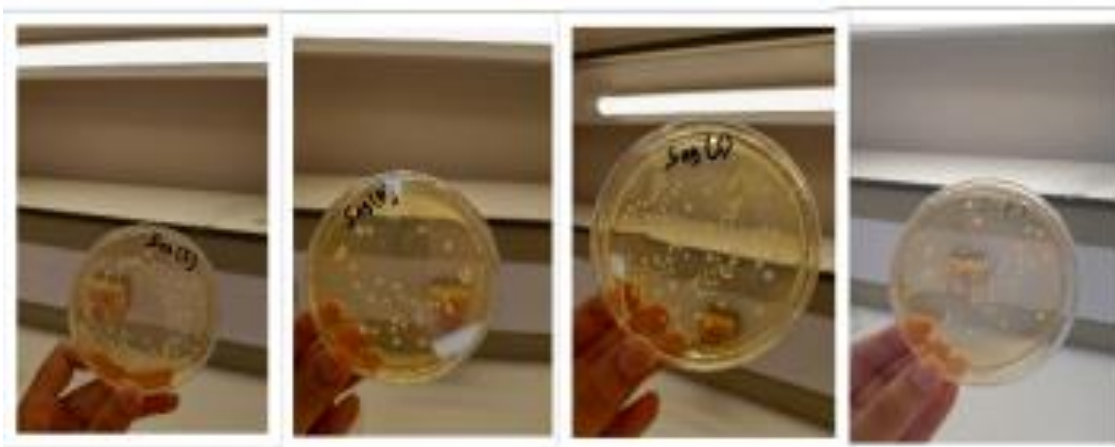


Figure 51: Les formulations de S19 après incubation dans un suc gastrique simulé

L'objectif de cette expérience était d'évaluer la capacité de survie de la souche après encapsulation et exposition à un suc gastrique simulé, en comparant différentes formules : sans prébiotique, avec pectine, avec inuline, et non encapsulé. L'inuline montre la formulation la plus efficace en tant que prébiotique de nature fructooligosaccharidique, améliore la résistance des bactéries en stabilisant la capsule en fournissant un substrat énergétique. De plus elle présente une meilleure synergie avec matrice alginate+gélatine favorisant une libération contrôlée.

L'encapsulation seule ($1,13 \times 10^2$ UFC/ml) apporte une protection significative par rapport à l'absence de capsule ($8,9 \times 10^1$ UFC/ml) confirmant l'effet barrière de l'alginate+gélatine. Cependant l'absence de prébiotique réduit la viabilité comparée à l'inuline.

S19+ pectine, cette formulation a montré une viabilité plus faible possiblement en raison d'interférence ou libération bactérienne inhibée sur le milieu de culture comme rapporte (Amine et al, 2023) que la stabilité est diminué lorsque les capsules contenant de la pectine en milieu acide, surtout lorsqu'elle est associé à des poly-cations comme le chitosane.

(Dafe et al, 2021), ont montré que la combinaison gélatine-alginate- inuline, offrait une meilleure protection que la pectine seule en raison de la meilleure compatibilité électrostatique.

La tolérance au pH bas est cruciale pour déterminer la capacité des souches à conserver leur viabilité en atteignant le site d'action afin de stimuler tout bénéfice physiologique pour le consommateur (Motey et al, 2021). Divers facteurs peuvent augmenter la résistance des bactéries probiotiques aux conditions acides dans l'estomac, y compris la matrice alimentaire qui agit comme vecteur de bactéries probiotiques, ce qui peut augmenter le pH et permettre aux bactéries de survivre plus longtemps (Barzegar et al, 2021).

V.7. Résultats des co-cultures :

L'objectif principal était d'évaluer leur effet inhibiteur sur des souches pathogènes, notamment *Salmonella enterica* et *Staphylococcus aureus*, à travers

une culture mixte avec les probiotiques et prébiotiques encapsulés mets en incubation pendant 3jours sur un agitateur.

Le comptage de souches viables est fait sur 02 milieux spécifiques : MSA pour *Staphylococcus* et SS pour *Salmonella* danst=0, après 24h, après 48h et après 72h.

- A t=0 :

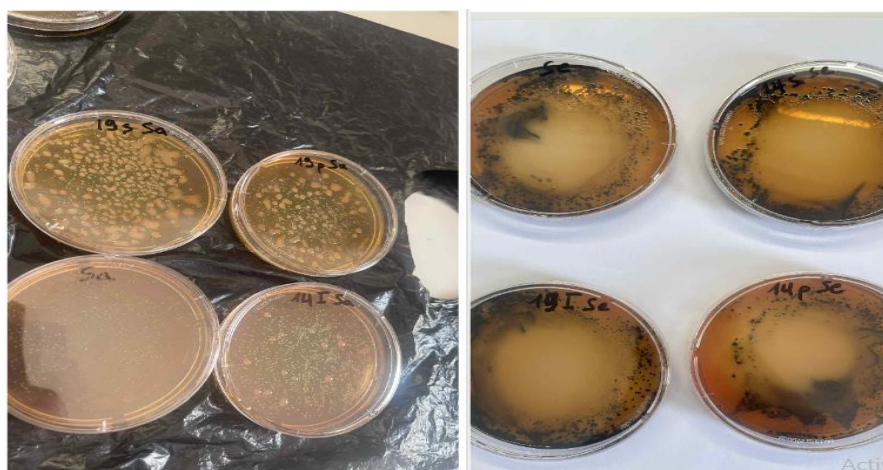


Figure 52: La co-culture des probiotiques encapsulés avec *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica* à t=0 après 24h d'incubation

À T=0, soit immédiatement après la mise en co-culture et l'incubation initiale, les ensemencements réalisés sur milieux sélectifs MSA (pour *Staphylococcus aureus*) et SS (pour *Salmonella enterica*) ont conduit à l'apparition de tapis bactériens couvrant l'ensemble de la surface des boîtes de Pétri. Ce phénomène a empêché le comptage fiable des unités formant colonies (UFC/ml), en raison d'une densité cellulaire trop élevée et d'une absence de colonies isolées.

- Après 24h :

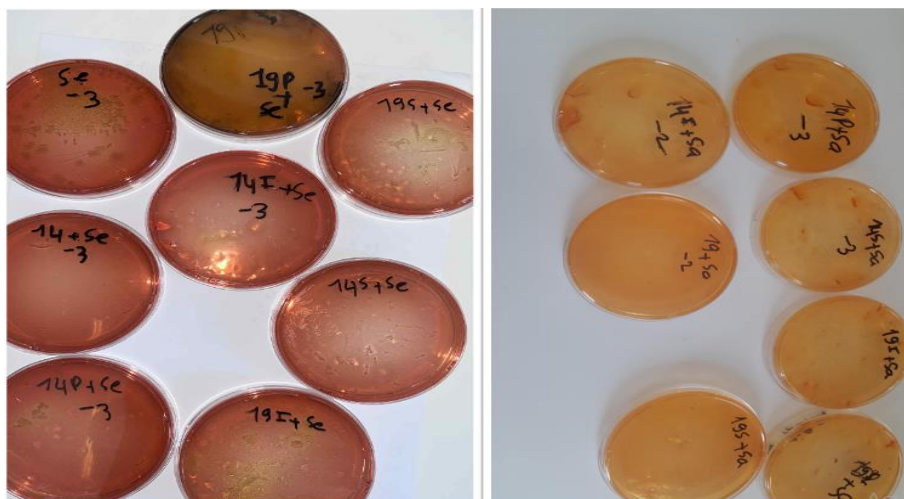


Figure 53: La co-culture des probiotiques encapsulés avec *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica* à $t=24h$ après incubation

À $T = 24 h$, les résultats de co-culture montrent une inhibition notable de la croissance de *Salmonella enterica* (Se) par les capsules probiotiques. Le témoin pathogène seul a atteint une concentration élevée de $2,95 \times 10^7$ UFC/ml, tandis que les co-cultures ont permis de réduire significativement cette croissance. En particulier, les formulations S14 + pectine, S19 + pectine, S19 encapsulé seul, et S19 + inuline ont respectivement donné des concentrations de $4,4 \times 10^5$, $5,4 \times 10^5$, $4,8 \times 10^5$ et $1,5 \times 10^6$ UFC/ml. La formulation S14 + pectine a montré la réduction la plus marquée, avec une baisse de plus de 99 % par rapport au témoin.

Pour *Staphylococcus aureus* (Sa), les résultats sont encore plus significatifs. Aucune croissance n'a été détectée dans les boîtes contenant les co-cultures avec les capsules, sauf dans le témoin Sa seul, qui a atteint 5×10^5 UFC/ml. Ce résultat suggère une inhibition complète de la croissance de Sa par les probiotiques encapsulés. Cette sensibilité accrue peut s'expliquer par la nature Gram-positive de Sa, rendant sa membrane plus vulnérable aux métabolites produits par les souches lactiques.

- Après 48h :

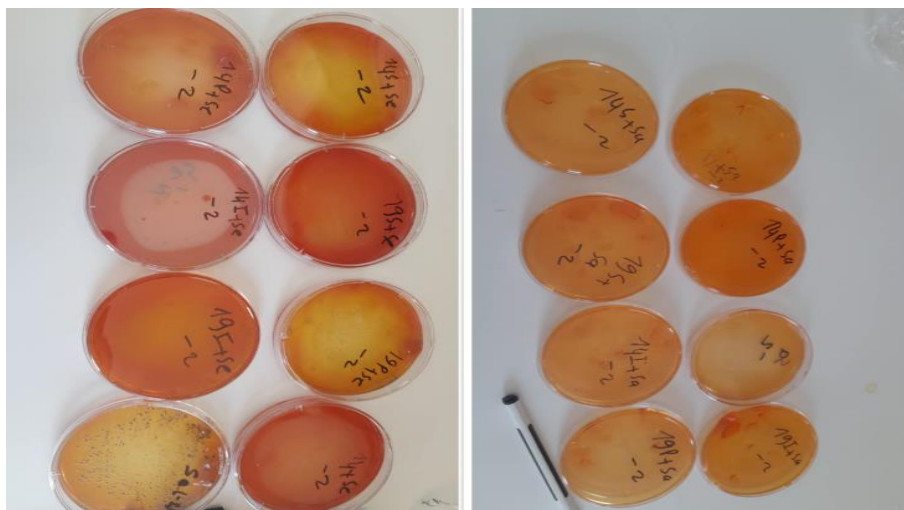


Figure 54: La co-culture des probiotiques encapsulés avec *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica* à t=48h après incubation

- Après 48 heures :

Après 48 heures de co-culture, les résultats confirment la poursuite de l'activité antimicrobienne des capsules probiotiques, avec une efficacité particulièrement marquée contre *Staphylococcus aureus*. Ce dernier n'a montré aucune croissance sur MSA dans les milieux contenant des capsules, confirmant l'inhibition complète et prolongée observée déjà à T = 24h. Le témoin Sa seul a atteint 4×10^5 UFC/ml, ce qui met en évidence l'effet protecteur clair des probiotiques encapsulés. En ce qui concerne *Salmonella enterica*, bien que la croissance soit toujours présente dans les co-cultures, elle est nettement réduite par rapport au témoin. Les formulations S19 + pectine et S19 + inuline ont permis de contenir la charge bactérienne à 7×10^3 UFC/ml et $1,5 \times 10^4$ UFC/ml respectivement, alors que le témoin (Se) seul affiche $1,87 \times 10^5$ UFC/ml. Ces résultats confirment une inhibition partielle mais persistante, démontrant que les effets antimicrobiens se maintiennent au fil du temps, en particulier pour les formulations à base de pectine.

- Après 72h :



Figure 56 : La co-culture des probiotiques encapsulés avec *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica* à $t=72h$ après incubation

Les co-cultures contenant des capsules probiotiques ont présenté une **inhibition totale** de *Salmonella enterica*, avec aucune colonie détectée sur les milieux de culture. En revanche, le témoin contenant *Se* seul a montré une croissance résiduelle de $1,4 \times 10^3$ UFC/ml.

Pour *Staphylococcus aureus* une légère croissance a été détectée dans certaines conditions. Le témoin *Sa* seul a atteint $1,75 \times 10^3$ UFC/ml, tandis que la co-culture *S19* + *Sa* a présenté une croissance réduite à $2,5 \times 10^2$ UFC/ml. Ces résultats contrastent avec ceux observés aux temps antérieurs ($T = 24 h$ et $T = 48 h$), où *S. aureus* était totalement inhibé dans toutes les formulations. Cette reprise partielle de croissance à 72 h pourrait s'expliquer par un affaiblissement progressif de la libération des composés actifs dans certaines formulations, ou par une résistance adaptative modérée de la souche pathogène. Ces observations sont cohérentes avec les données rapportées par (Zommara et al, 2021), qui ont montré que certaines souches de *Lactobacillus*, isolées de produits laitiers fermentés, présentent une activité antimicrobienne contre des pathogènes comme *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica*, bien que cette dernière soit généralement plus résistante en raison de sa membrane externe (Gram-négatif).

De même, (Amaretti et al, 2013) ont montré que des *Lactobacillus* producteurs d'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène peuvent inhiber efficacement les pathogènes Gram+ via la modification du pH local et la production de bactériocines.

La meilleure efficacité observée avec la matrice à base de pectine est également soutenue par les travaux de (Tarifa et al, 2022), qui ont démontré que les microcapsules à base de pectine protègent efficacement les probiotiques tout en permettant une libération contrôlée, favorisant ainsi leur action antimicrobienne prolongée. En revanche, les capsules à base d'inuline, bien que bénéfiques pour la croissance des souches probiotiques, semblent moins efficaces pour limiter rapidement la croissance de pathogènes, ce qui rejoint les observations de (Šipailienė et Petraitytė, 2018).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion générale

L'intérêt croissant pour les aliments fonctionnels a mis en lumière l'importance des probiotiques, des prébiotiques et de leur association dans des systèmes micro-encapsulés. Les probiotiques, microorganismes vivants bénéfiques pour la santé humaine, voient leur efficacité renforcée par l'ajout de prébiotiques, substrats sélectivement fermentés. La micro-encapsulation, quant à elle, est une technologie clé permettant de protéger ces bactéries durant le stockage, la transformation et surtout lors du passage dans le tractus gastro-intestinal. Dans cette étude, des souches lactiques isolées à partir de fromage de chèvre artisanal ont été sélectionnées pour leurs propriétés biologiques intéressantes, puis encapsulées avec des prébiotiques naturels extraits de coproduits végétaux, à savoir la pectine (pelures d'orange) et l'inuline (oignons).

D'un point de vue technologique, les rendements d'extraction de la pectine (9 %) et de l'inuline (1 %) restent modestes comparés aux valeurs rapportées par (Yapo et Koffi, 2006) ou (Silarbi et Ferroukhi, 2017) qui varient entre 10–25 % dans la littérature de ces derniers pour la pectine ou 15–26 % pour la chicorée ou l'artichaut concernant l'inuline, ce qui s'explique par la nature des matières premières choisies (pelures d'orange fraîches et oignons) et les conditions d'extraction plus douces utilisées.

Du point de vue fonctionnel, les souches isolées ont démontré :

- Une production élevée d'acide lactique, avec des pH aussi bas que 3,67 (S9), confirmant leur potentiel inhibiteur sur les pathogènes, conformément aux observations de (Leroy et De-Vuyst, 2014).

- Des taux d'acide lactique atteignant jusqu'à 0,82 %, cohérentes aux données de (Zhang et al, 2021).

- Une activité anti-oxydante notable, avec des inhibitions DPPH allant jusqu'à 73 %, proches des valeurs rapportées par (Lin et Yen, 1999) et (Zommara et al, 2021).

Concernant la viabilité dans des conditions simulées, les souches ont maintenu une forte croissance (jusqu'à $1,54 \times 10^6$ UFC/ml), même après exposition au suc gastrique, ce qui confirme leur aptitude à survivre au transit

digestif. La culture dans un milieu minimum enrichi en prébiotiques extraits (pectine et cellulobiose) a permis d'améliorer leur viabilité, ce qui rejoint les résultats de (Tarifa et al, 2022).

L'activité antimicrobienne a été clairement démontrée à travers des zones d'inhibition marquées contre *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* et *E. coli*, malgré la résistance naturelle des bactéries Gram-négatives due à leur membrane externe. Certaines souches comme S7 et S4 et S19 ont montré une action particulièrement efficace, traduisant une capacité compétitive élevée. Ces observations s'accordent avec les mécanismes décrits par (Hernández et al, 2021). Les souches donc présentent des caractéristiques probiotiques marquées, notamment une activité antimicrobienne puissante. Cela appuie leur potentiel de protéger l'hôte contre les infections digestives et de maintenir l'équilibre du microbiote.

La micro-encapsulation des souches par gélification ionotrope (alginate-gélatine), cette technique a permis d'obtenir des capsules homogènes, stables et protectrices. Les tests de résistance au suc gastrique simulé ont montré une meilleure survie des souches encapsulées, notamment S19 associée à l'inuline, avec une viabilité supérieure à $1,75 \times 10^2$ UFC/ml. Ces données sont en accord avec celles de (Tarifa et al, 2022) et (Šipailienė et Petraitytė, 2018), qui ont souligné l'efficacité de l'alginate combiné à des matrices prébiotiques pour améliorer la protection contre les conditions gastrique

Enfin, les formulations obtenues ont été testées en co-culture avec des souches pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica*). Les résultats ont révélé une inhibition totale de (Sa) dans toutes les capsules dès 24 h, tandis que la croissance de Se a été significativement réduite, en particulier avec S14 + pectine (réduction de 99 % à 24 h). Après 72 h, l'effet antimicrobien persistait. Ces résultats confirment l'activité antimicrobienne des souches, déjà démontrée dans la littérature par (Zommara et al, 2021) et (Mokoena, 2017), en lien avec la production de métabolites tels que les acides organiques et les bactériocines.

En conclusion, cette étude met en évidence que la micro-encapsulation combinée à l'utilisation de prébiotiques extraits de sources naturelles constitue

une stratégie efficace pour renforcer la stabilité, la viabilité et l'activité antimicrobienne des probiotiques.

Perspectives :

Au regard des résultats obtenus, plusieurs pistes de recherche et d'application peuvent être envisagées :

- Études in vivo : Tester l'efficacité des formulations dans des modèles animaux ou humains pour confirmer leur effet probiotique réel sur la flore intestinale, l'immunité ou la santé digestive.

- Valorisation des coproduits agricoles : Étendre l'approche d'extraction des prébiotiques à d'autres déchets végétaux (carottes, betteraves, peaux de pommes), dans une optique d'économie circulaire et de réduction des pertes post-récolte.

- Encapsulation multi strate ou symbiotique : Développer des capsules multicomposants intégrant simultanément plusieurs souches probiotiques et prébiotiques pour un effet synergique plus puissant.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abboud, S., & Adda, K. (2024). Étude des critères d'adhésion de certaines souches probiotiques [Mémoire de master, Université Abdelhamid Ibn Badis – Mostaganem].
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, 18(5), 240–251.
- Amaretti, A., Di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., & Bordoni, A. (2013). Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: Lactobacilli and Bifidobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 807–817.
- Amund, D. (2016). Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(9), 715–725.
- Andreu, P. (2021). Les synbiotiques : bien plus qu'une simple combinaison de probiotiques et prébiotiques. *Gut Microbiota for Health*.
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 143–182.
- Behera, S. S., & Panda, S. K. (2020). Ethnic and industrial probiotic foods and beverages: Efficacy and acceptance. *Current Opinion in Food Science*, 32, 29–36.
- Biocodex microbiota institue. (2024). Prébiotiques : l'essentiel pour comprendre [en ligne]. Disponible sur : <https://www.biocodexmicrobiotainstitute.com/fr/prebiotiques-lessentiel-pour-comprendre>
- Biscarra T, P. (2023). Exploration approfondie des interactions entre des prébiotiques et une sélection de bactéries intestinales pertinentes pour la santé. Mémoire de Master, Université Paris-Saclay, France.

- Bohbot, J. M., & Zhioua, F. (2021). Intérêt de *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 dans la prise en charge des infections vulvo-vaginales. *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie*, 49(9), 716–723. <https://doi.org/10.1016/j.gofs.2021.06.012>
- Bordji, C. (2020). Caractérisation des activités acidifiantes des souches autochtones de *Lactobacillus* : *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus* pour l'élaboration d'un ferment à haute aptitude fromagère [Mémoire de master, Université Abdelhamid Ben Badis Mostaganem].
- Boubkeur, M. (2019). Revivification et contrôle des aptitudes technologiques des souches lactiques thermophiles [Mémoire de master, Université Abdelhamid Ben Badis Mostaganem].
- Canadian digestive health foundation. (2023, avril). Les prébiotiques comparés aux fibres alimentaires [en ligne]. Disponible sur : <https://cdhf.ca/fr/les-prebiotiques-comparees-aux-fibres-alimentaires/>
- Cela, L., Brindisi, G., Gravina, A., Pastore, F., Semeraro, A., Bringheli, I., Marchetti, L., Morelli, R., Cinicola, B., & Capponi, M. (2023). Molecular mechanism and clinical effects of probiotics in the management of cow's milk protein allergy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 9781.
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A., & Ouwehand, A. C. (2020). Criteria to qualify microorganisms as “probiotic” in foods and dietary supplements. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1662.
- Chaerafa, F., & Sifoune, S. (2024). La résistance des probiotiques aux antibiotiques [Mémoire de master, Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf – Mila].
- Dasriya, V., Samtiya, M., Ranveer, S., Dhillon, H. S., Devi, N., Sharma, V., Nikam, P., Puniya, M., Chaudhary, P., & Chaudhary, V. (2024). Modulation of gut-microbiota through probiotics and dietary interventions to improve host health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Egert, M. (2021). Probiotiques, une option thérapeutique complémentaire. *Revue Médecine & Santé*, 48(6), 17–22.
- El-Gendy, S. (2012). Lactic acid production by *Lactobacillus* strains. *African Journal of Microbiology Research*, 6(3), 491–500.

- Farahmandi, K., Rajab, S., Tabandeh, F., Shahraky, M. K., Maghsoudi, A., & Ashengroph, M. (2021). Efficient spray-drying of *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637 using total CFU yield as the decision factor. *Food Bioscience*, 40, 100816.
- Fazilah, N. F., Hamidon, N. F., Ariff, A. B., Khayat, M. E., Wasoh, H. S., & Halim, M. (2019). Microencapsulation of *Lactococcus lactis* Gh1 with gum arabic and *Synsepalum dulcificum* via spray drying for potential inclusion in functional yogurt. *Molecules*, 24(7), 1422.
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., & Ouwehand, A. C. (2019). The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, 7(3), 83.
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., & Ouwehand, A. C. (2019). The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, 7(3), 83.
- Ghiasvand, F., Müller, J., Hohmann, B., Schmitz, S., Schäfer, R., Grobe, R., Härtel, L., Fuchs, M., & Tautz, K. (2022). A virulence factor as a therapeutic: The probiotic *Enterococcus faecium* SF68 arginine deiminase inhibits innate immune signaling pathways. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 119.
- Gibson, G.R. et al. (2017). The concept of prebiotics revisited: A consensus report. **Gut**, 66(1), 6–18.
- Guarner, F., & Sanders, M. E. (2017). Lignes directrices mondiales de l'Organisation mondiale de gastroentérologie : Probiotiques et prébiotiques. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines.
- Gupta, A., & Maity, C. (2020). Efficacy and safety of *Bacillus coagulans* LBSC in irritable bowel syndrome: A prospective, interventional, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study [CONSORT compliant]. *Medicine*, 99(43), e22947.
- Halloran, K., & Underwood, M. A. (2019). Probiotic mechanisms of action. *Early Human Development*, 135, 58–65.
- Hazarika, U., & Gosztola, B. (2020). Lyophilization and its effects on the essential oil content and composition of herbs and spices—A review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 19(4), 467–473

- Hernández, M., Rodríguez, G., & Suárez, E. (2021). Antimicrobial mechanisms of probiotics: *Lactobacillus* spp. as a case study. *Frontiers in Microbiology*, 12, 765084.
- Hill, C. et al. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 11(8), 506–514.
- Hyland, N., & Stanton, C. (2023). The gut-brain axis: Dietary, probiotic, and prebiotic interventions on the microbiota. In *Advances in Microbiota Research*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824482-3.00007-3>
- Kagambèga, A. B., Cissé, H., Tapsoba, F., Sawadogo, A., Zongo, C., Traoré, Y., & Savadogo, A. (2019). Bouillies fermentées traditionnelles à base de céréales au Burkina Faso : Diversité, technologies de production et microorganismes à potentiel probiotique associés. Synthèse : *Revue des Sciences et de la Technologie*, 25(2), 12–24.
- Kailasapathy, K. (2009). Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. **CAB Reviews**, 4(9), 1–19.
- Khushboo, K., Karnwal, A., & Malik, T. (2023). Characterization and selection of probiotic lactic acid bacteria from different dietary sources for development of functional foods. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1170725.
- Laboratoire Lescuyer. (2024, décembre). Nos actifs : prébiotiques [en ligne]. Disponible sur : <https://www.laboratoire-lescuier.com/nos-actifs/prebiotiques>
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2014). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), 78–89.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2014). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67–78.
- Lin, M. Y., & Yen, C. L. (1999). Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1460–1466.

- Malbos, D. (2021). Place des pré-et probiotiques dans la stratégie thérapeutique. *Actualités Pharmaceutiques*, 60(607), S12–S14. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2021.05.011>
- Martin, L. (2009). Probiotiques, prébiotiques, symbiotiques et « métabiotiques » : ce qu'il faut savoir [Internet]. Toulouse : Centre de Physiopathologie Purpan. Consulté le 18 mai 2022, sur
- Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., & Rotondo, J. (2023). Probiotics' mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. *Cells*, 12(1), 184. <https://doi.org/10.3390/cells12010184>
- Mehta, N., Kumar, P., Verma, A., Umaraw, P., Kumar, Y., Malav, O., Sazili, A., & Lorenzo, J. M. (2022). Microencapsulation as a noble technique for the application of bioactive compounds in the food industry: A comprehensive review. *Applied Sciences*, 12, 1424.
- Mingfei, Y., Li, B., Haowei, Y., Wenhao, H., Qixia, L., Hang, X., McClements, D. J., & Lanjuan, L. (2020). Enhanced viability of probiotics (*Pediococcus pentosaceus* Li05) by encapsulation in microgels doped with inorganic nanoparticles. *Food Bioscience*, 83, 246–252.
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.
- Oliveira, A. C., Moretti, S. C., Boschini, C., Baliero, J. C., Freitas, O., & Favaro-Trindade, C. S. (2007). Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 24(7), 673–681.
- Park, J., & Bronzino, J. (2018). *Biomaterials: Principles and applications* (4th ed.). CRC Press.
- Paulo, F., & Santos, L. (2017). Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 77, 1327–1340.
- Qi, W., Liang, X., Yun, T., & Guo, W. (2019). Growth and survival of microencapsulated probiotics prepared by emulsion and internal gelation. *Journal of Food Science and Technology*, 56(3), 1398–1404.

- Rachel. (2023). Les compléments probiotiques les plus efficaces en 2025. Probiotiques et Santé Magazine. [Page consultée le 10 juin 2025].
- Rachelshoemaker. (2016). How probiotics work. [Blog]. <https://rachelshoemaker.com/how-probiotics-work>
- Rokka, S., & Rantamäki, P. (2017). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: Challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231(1), 1–12.
- Roberfroid, M. (2020). Prebiotics: The Concept Revisited. **The Journal of Nutrition**, 150(7), 1433–1438.
- Sebaaly, C., Greige-Gerges, H., Stainmesse, S., Fessi, H., & Charcosset, C. (2016). Effect of composition, hydrogenation of phospholipids and lyophilization on the characteristics of eugenol-loaded liposomes prepared by ethanol injection method. *Food Bioscience*, 15, 1–10.
- Sharifi-Rad, J., Rodrigues, C. F., Stojanović-Radić, Z. Z., Aleksic, V., Neffe-Skocińska, K., Zielinska, D., & others. (2020). Probiotiques : des composants bioactifs polyvalents pour promouvoir la santé humaine. *Medicina (Kaunas)*, 56(9), 433.
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, 5(4), 1417–1435.
- Šipailienė, A., & Petraitytė, S. (2018). Encapsulation of probiotics: Proper selection of the probiotic strain and the influence of encapsulation technology and materials on the viability of encapsulated microorganisms. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(1), 1–10.
- Smith, J., Brown, A., & Green, T. (2018). Titration of organic acids in fermentation processes. *Journal of Fermentation Technology*, 35(2), 145–152.
- Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K., Holscher, H. D., Azad, M. B., Delzenne, N. M., & Sanders, M. E. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(11), 687–701. Xiao, J., & Zhao, L. (2024). Microbiote intestinale : De la

- stérilité chez les nouveau-nés à la complexité des interactions chez l'adulte. *Gut Microbiota*, 59, 172–183.
- Tarifa, A., Boukhris, H., Ayadi, D., & Fguira, L. F. B. (2022). Pectin-based microcapsules as carriers of probiotics: Improvement of viability and gastrointestinal resistance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 210, 460–468.
 - Vanhaecke, T., Grohard, P., Aubert, P., Jaulin, J., Chevalier, J., Durand, T., Boudin, H., Naveilha, P., Ligneul, A., & Fressange-Mazda, C. (2017). Renforcement de la barrière épithéliale intestinale par la souche probiotique *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 chez le raton nouveau-né. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 31(1), 48.
 - Yapo, B. M., & Koffi, K. L. (2006). Pectins from citrus peels: A comparative study of extraction by hydrochloric acid and citric acid. *African Journal of Biotechnology*, 10(1), 1–7.
 - Zhang, L., Xu, Y., & Wang, J. (2021). Production of lactic acid by different *Lactobacillus* strains: A comparative study. *Journal of Applied Microbiology*, 131(6), 1805–1815.
 - Zhao, M., Huang, X., Zhang, H., et al. (2020). Probiotic encapsulation in water-in-water emulsion via heteroprotein complex coacervation of type-A gelatin/sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 105, 105790.
 - Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., ... & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
 - Zheng, Y., Jana, M., Tereza, C., Eva, K., Peter, S., & others. (2017). Screening of lactic acid bacteria with antioxidant activity for application as functional starter cultures in fermented foods. *Food Control*, 75, 1–9.
 - Zommara, M., El-Dawy, E., Ibrahim, M., & Al-Baadani, F. (2021). Evaluation of antioxidant activity of selected *Lactobacillus* strains using DPPH assay and their probiotic potential. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108973.

- Zommara, M., El-Shafei, K., Allam, G., & Darwish, M. (2021). Antioxidant and antimicrobial activities of selected probiotic strains isolated from traditional fermented dairy products. *LWT – Food Science and Technology*, 145, 111307.

ANNEXES

Annexes

Milieux de cultures préparés :

- Préparation du milieu de culture MRS « Man, Rogosa et Sharpe » (gélose / bouillon)
- Préparation du milieu de culture MSA « Mannitol Salt Agar » (gélose)
- Préparation du milieu de culture MH « Mueller-Hinton » (gélose)
- Préparation du milieu de culture PBS « Tampon Phosphate Salin » (bouillon)
- Préparation du milieu de culture TSB « trypto-caséine soja » (bouillon)
- Préparation du milieu minimum (bouillon)
- Préparation du milieu SS «gélose Salmonella-Shigella »

Composition des milieux de culture utilisés

- **Milieu MRS (Man, Rogosa, and Sharpe) – Bouillon ou gélose**

Composition pour 1 Litre :

- Peptone de caséine : 10 g
- Extrait de viande : 8 g
- Extrait de levure : 4 g
- Glucose : 20 g
- Citrate d'ammonium : 2 g
- Acétate de sodium : 5 g
- Sulfate de magnésium : 0,2 g
- Sulfate de manganèse : 0,05 g
- Dipotassium phosphate (K_2HPO_4) : 2 g
- Tween 80 : 1 mL
- Agar (si gélose) : 15 g
- pH : ajusté à $6,5 \pm 0,2$

- **Milieu MSA (Mannitol Salt Agar) – Gélose**

111 g de poudre de MSA pour 1 litre d'eau distillée

- **Milieu MH (Mueller-Hinton) – Gélose**

Composition pour 1 Litre : 38 g de poudre de Mueller-Hinton pour 1 litre d'eau distillée

- **Milieu PBS (Tampon Phosphate Salin) – Bouillon**

Composition pour 1 Litre

- NaCl : 8 g
- KCl : 0,2 g
- Na₂HPO₄ : 1,44 g
- KH₂PO₄ : 0,24 g
- pH : ajusté à 7,4

- **Milieu TSB (Tryptic Soy Broth) – Bouillon**

Composition pour 1 L d'eau distillée :

- Peptone tryptique de caséine : **17 g**
- Extrait de levure (**substitut de la peptone de soja**) : **3 g**
- Glucose (dextrose) : **2,5 g**
- Chlorure de sodium (NaCl) : **5 g**
- Phosphate dipotassique (K₂HPO₄) : **2,5 g**

- **Milieu Minimum – Bouillon**

Composition pour 1 Litre :

- Glucose ou prébiotique testé : 2 g
- (NH₄)₂SO₄ : 1 g
- KH₂PO₄ : 3 g
- Na₂HPO₄ : 6 g
- NaCl : 0,5 g
- MgSO₄•7H₂O : 0,2 g
- pH : ajusté à 7,0

- **Milieu SS (Salmonella-Shigella Agar) – Gélase** sous forme de poudre prête à l'emploi, : 60 g de poudre pour 1 litre d'eau distillée

