



DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**LIMAM MOHAMMED**

**BELHOCINE ABDERRAHMANE**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCE ALIMENTAIRE**

**Spécialité: Sécurité Alimentaire et qualité des produits**

THÈME

*Étude comparative de techniques d'encapsulation de souches à potentiel probiotique pour l'élaboration de compléments alimentaires fonctionnels*

Soutenue le 07/07/2025

DEVANT LE JURY

Présidente	Mme. Deramchia Nawel	MCA	U. Mostaganem
Examineur	M. BENABDELMOUMEN Djillali	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur	M. BENBOUZIANE Bouasria	MCA	U. Mostaganem
Co- encadrant	M. BENTAHER Mohamed Cherif	Doctorant	U. Mostaganem

## **Remercîment**

*Avant tout, nous adressons nos louanges et notre gratitude à Dieu, le Tout-Puissant et le Miséricordieux, pour nous avoir accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires à la réalisation de ce travail.*

*Nous exprimons nos sincères remerciements à notre encadrant M. BENBOUZIANE Bouasria, pour ses orientations précieuses, ses remarques pertinentes et sa disponibilité constante qui ont fortement contribué à l'aboutissement de ce mémoire.*

*Nos remerciements les plus chaleureux vont également à notre co-encadrant M. BENTAHER Mohamed Cherif, qui nous a accompagnés tout au long de notre stage au laboratoire, nous guidant avec patience, partageant ses connaissances, et nous soutenant quotidiennement dans la réalisation pratique de ce travail.*

*Nous tenons aussi à remercier Mme. Deramchia Nawel, Maître de Conférences A, enseignant-chercheur au département des Sciences Alimentaires, pour avoir accepté de présider le jury de soutenance.*

*Nos vifs remerciements s'adressent également à M. BENABDELMOUMEN Djillali, Professeur, enseignant-chercheur au département d'Agronomie, pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire et y apporter ses observations enrichissantes.*

*Nous exprimons notre gratitude à l'ensemble des enseignants du département des Sciences Alimentaires de l'Université Abdelhamid Ibn Badis pour leur dévouement et la qualité de l'enseignement reçu tout au long de notre parcours.*

*Nos remerciements vont également aux techniciens du laboratoire de recherche Enfin, nous remercions chaleureusement chef du département, ainsi que tous les membres du corps pédagogique pour leur accompagnement tout au long de notre formation.*

**Mercie à vous tous**

## ***Dédicace***

*Je dédie ce mémoire à mes chers parents, pour leur amour inconditionnel, leur patience et leur soutien indéfectible tout au long de mon parcours universitaire.*

*Une pensée particulière à mon binôme, pour sa présence, son sérieux, et son soutien constant tout au long de cette expérience, tant sur le plan académique qu'humain.*

*À toute ma famille, pour leur affection, leurs encouragements et leur confiance en moi.*

*À mes amis, pour leur soutien, leur écoute et leurs encouragements dans les moments difficiles comme dans les instants de réussite.*

*Et enfin, à toutes les personnes qui me connaissent et que je connais, ainsi qu'à tous ceux qui croient au travail bien fait, et qui avancent avec détermination face aux défis de la vie.*



***Mohammed***

## ***Dédicace***

*Je dédie ce modeste travail à la mémoire de mon père, que Dieu ait son âme.  
Bien qu'il ne soit plus présent physiquement, sa présence continue d'habiter mon  
cœur et de guider mes pas.*

*Qu'Allah fasse de cet accomplissement une lumière dans sa tombe et une aumône  
continue pour son âme.*

*J'adresse également cette dédicace à ma chère mère, pilier de tendresse et de  
patience, pour son amour inconditionnel, ses prières et son soutien constant.*

*Je n'oublie pas de dédier ce travail à mon binôme, avec qui j'ai partagé cette belle  
aventure faite de collaboration, de respect et d'efforts communs.*

*À ma famille, à ceux qui m'ont encouragé, soutenu, et cru en moi.*

*Et enfin, à tous ceux qui poursuivent leurs rêves avec persévérance, foi et courage  
malgré les épreuves de la vie.*



***Abderrahmane***

## Résumé

Les probiotiques sont reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé digestive et immunitaire, mais leur faible résistance aux conditions environnementales comme l'acidité gastrique, la chaleur ou l'oxydation limite leur efficacité.

Face à cette problématique, ce travail a pour objectif d'évaluer et de comparer deux techniques d'encapsulation, l'extrusion et l'émulsion, afin de développer un complément alimentaire fonctionnel capable de protéger efficacement les souches probiotiques. Les souches sélectionnées (TF03, DC04, HM, KL14, LGG, DC01) ont été caractérisées microbiologiquement, puis encapsulées à l'aide d'alginate de sodium. Les capsules issues de l'extrusion se sont révélées sphériques, homogènes et stables, tandis que celles obtenues par émulsion présentaient une structure fragile. La viabilité bactérienne après encapsulation était de  $2,54 \times 10^9$  UFC/ml et de  $1,38 \times 10^8$  UFC/ml après une semaine. Les tests fonctionnels ont mis en évidence une forte auto-agrégation pour DC04, TF03 et KL14, une autolyse élevée chez KL14 ( $\approx 66\%$ ) et une bonne hydrophobicité chez TF03, DC04 et LGG.

Ces résultats montrent que la méthode d'extrusion offre une meilleure protection des souches tout en conservant leurs propriétés probiotiques, ce qui la rend plus adaptée à la formulation de compléments alimentaires.

**Mots clés :** Probiotiques – Encapsulation – Extrusion – Émulsion – Alginate de sodium – Viabilité bactérienne

## **Abstract**

Probiotics offer multiple health benefits, but their survival remains limited under harsh conditions such as gastric acidity, heat, and oxidation.

This study aims to compare two encapsulation techniques—extrusion and emulsion—for the development of a functional dietary supplement using sodium alginate as a protective agent. Six probiotic strains were tested, and their viability, morphology, and functional properties were evaluated. The extrusion method produced spherical, stable capsules with high bacterial viability ( $2.54 \times 10^9$  CFU/ml at day 0 and  $1.38 \times 10^8$  CFU/ml after 7 days). Functional tests revealed strong auto-aggregation in DC04, TF03, and KL14, significant autolysis in KL14 (~66%), and high hydrophobicity in TF03, DC04, and LGG.

These findings suggest that extrusion is a more efficient method for maintaining probiotic viability and functional integrity in supplement formulations.

**Keywords:** Probiotics – Encapsulation – Extrusion – Emulsion – Sodium alginate – Bacterial viability

تُعد البروبيوتيك عناصر فعالة لتعزيز الصحة، لكنها تواجه ضعفًا في البقاء تحت ظروف قاسية مثل الحموضة المعدية والحرارة والأكسدة.

يهدف هذا العمل إلى مقارنة تقنيتين للتغليف، هما البثق والاستحلاب، لتطوير مكمل غذائي وظيفي باستخدام أجيئات الصوديوم كمادة واقية. تم اختبار ست سلالات بروبيوتيكية من حيث الشكل، والقدرة على البقاء، والخصائص الوظيفية. أظهرت طريقة البثق كفاءة عالية، حيث أعطت كبسولات كروية ومستقرة مع بقاء ميكروبي مهم ( $2.54 \times 10^9$  وحدة/مل في اليوم 0 و  $1.38 \times 10^8$  وحدة/مل بعد 7 أيام). كما أظهرت الاختبارات الوظيفية قدرة ارتباط ذاتي عالية في DC04 و TF03 و KL14، وتحلل ذاتي مرتفع في KL14 (~66%) ، وميل للارتباط السطحي في TF03 و DC04 و LGG.

تشير هذه النتائج إلى أن طريقة البثق أكثر فاعلية في حفظ خصائص السلالات البروبيوتيكية داخل مكمل غذائي.

الكلمات المفتاحية: بروبيوتيك – التغليف – البثق – الاستحلاب – أجيئات الصوديوم – بقاء البكتيريا

## *Liste des figures*

<b>Figure 1 : Compléments alimentaires .....</b>	<b>5</b>
<b>Figure 2 : Complément alimentaire en forme de comprimé.....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 3 : Complément alimentaire en forme de capsule molle .....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 4 : Complément alimentaire en forme de gélule. ....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 5 : Complément alimentaire en poudre .....</b>	<b>13</b>
<b>Figure 6 : Complément alimentaire en forme d'ampoule. ....</b>	<b>13</b>
<b>Figure 7 : Complément alimentaire en forme goutte.....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 8 : Complément alimentaire sous forme de sirop .....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 9 : Complément alimentaire sous forme de boisson .....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 10 : Complément alimentaire en forme de stick-pack.....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 11 : Voie métabolique des bactéries lactiques homofermentaires (ligne continue) et hétérofermentaires (lignes pointillée).....</b>	<b>25</b>
<b>Figure 12 : Les facteurs influencent sur les probiotiques.....</b>	<b>27</b>
<b>Figure 13 : Représentation graphique de la répartition de l'utilisation de l'encapsulation dans les différents domaines d'application .....</b>	<b>32</b>
<b>Figure 14: Méthode de préparation .....</b>	<b>35</b>
<b>Figure 15 : Les différents techniques d'encapsulation .....</b>	<b>38</b>
<b>Figure 16 : Illustration schématique des différentes morphologies possibles des microparticules.....</b>	<b>39</b>
<b>Figure 17 : Photographie obtenue par MEB d'une solution de microcapsules. ....</b>	<b>39</b>
<b>Figure 18 : Photographie obtenues par MEB : A. Microsphère ou le PA est dissout dans la matrice ; B. Microsphère ou le PA est dispersé dans la matrice .....</b>	<b>40</b>
<b>Figure 19 : Schéma représentant la méthode de séchage par pulvérisation.....</b>	<b>53</b>
<b>Figure 20 : Schéma représentant la technique d'extrusion.....</b>	<b>54</b>
<b>Figure 21 : Schéma représentatif de la coacervation complexe des probiotiques 2017) .....</b>	<b>55</b>
<b>Figure 22 : Les souches bactériennes utilisées.....</b>	<b>59</b>
<b>Figure 23 : Les produits chimiques utilisés .....</b>	<b>61</b>
<b>Figure 24 : L'huile de soja.....</b>	<b>61</b>

<b>Figure 25 : Centrifugeuse à 6000 tours/min à 4°C .....</b>	<b>63</b>
<b>Figure 26 : Préparation du matériel pour le test d'auto-agrégation bactérienne .....</b>	<b>64</b>
<b>Figure 27 : Etape de l'encapsulation par extrusion .....</b>	<b>68</b>
<b>Figure 28 : Etape de l'encapsulation par émulsion dans l'huile .....</b>	<b>69</b>
<b>Figure 29 : Méthode du test d'efficacité des capsules (le premier jour et après une semaine) .</b>	<b>70</b>
<b>Figure 30 : Résultats de la revivification des souches bactériennes sur gélose MRS.....</b>	<b>73</b>
<b>Figure 31 : Observation microscopique des souches bactériennes colorées au Gram.....</b>	<b>74</b>
<b>Figure 32 : Résultats du test catalase des souches bactériennes (HM, DC01, DC04, LGG, KL14 et TF03) .....</b>	<b>74</b>
<b>Figure 33 : Pourcentage d'auto-agrégation des différentes souches bactériennes testées.....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 34 : Pourcentage d'activité autolytique (%) des souches bactériennes.....</b>	<b>76</b>
<b>Figure 35 : Taux d'hydrophobicité (%) des différentes souches bactériennes en présence d'acétate d'éthyle.....</b>	<b>77</b>
<b>Figure 36 : Taux d'hydrophobicité (%) des différentes souches bactériennes en présence de chloroforme.....</b>	<b>78</b>
<b>Figure 37 : Préparation et observation des capsules obtenues par la méthode d'extrusion pour différentes souches de bactéries lactiques .....</b>	<b>80</b>
<b>Figure 38 : Etat des capsules obtenues par la méthode d'émulsion avant et après centrifugation .....</b>	<b>81</b>
<b>Figure 39 : Les boîtes de Pétri après incubation le premier jour, juste après encapsulation ...</b>	<b>82</b>
<b>Figure 40 : Boîtes de Pétri après incubation, une semaine après stockage.....</b>	<b>83</b>

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1 : Types des compléments alimentaires fonctionnels .....</b>	<b>16</b>
<b>Tableau 2 : Les espèces des micro-organismes considérées de probiotique .....</b>	<b>18</b>
<b>Tableau 3 : Récapitulatif des différents critères de sélection des probiotiques .....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau 4 : Les effets thérapeutiques des probiotiques et leurs métabolites sur la santé humaine.....</b>	<b>21</b>
<b>Tableau 5 : Les voies de fermentation lactique .....</b>	<b>24</b>
<b>Tableau 6 : Quelques propriétés technologiques et nutritionnelles des bactéries lactiques .....</b>	<b>26</b>
<b>Tableau 7 : Exemples d'applications des micro-encapsulations.....</b>	<b>33</b>
<b>Tableau 8 : Les techniques d'encapsulation les plus courantes, leurs avantages et leurs inconvénients .....</b>	<b>35</b>
<b>Tableau 9 : Polymères naturels utilisés en micro-encapsulation dans le domaine d'alimentaire .....</b>	<b>42</b>
<b>Tableau 10 : Les souches lactiques utilisées.....</b>	<b>58</b>

## *Liste des abréviations*

- **MRS** : Man Rogosa et Sharpe
- **BPS** : bouillon phosphate saline
- **DO** : densité optique
- **LGG** : désigne *Lactobacillus rhamnosus GG*
- **DC01** : correspond à *Levilactobacillus brevis*
- **DC04** : désigne *Lactiplantibacillus pentosus*
- **TF03** : représente *Levilactobacillus brevis*
- **HM** : fait référence à *Bacillus coagulans*
- **KL14** : abréviation de *Pediococcus pentosaceus*
- **UFC/ml** : unités formant colonies par millilitre
- **CaCl<sub>2</sub>** : chlorure de calcium
- **FAO/OMS** : abréviation conjointe pour Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture et Organisation Mondiale de la Santé.
- **CFU** : *Colony Forming Units*, équivalent anglais de UFC (unités formant colonies)
- **MATS** : Microbial Adhesion To Solvents
- **FAO** : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **LAB** : Bactéries lactiques

## *Table des matières*

*Remercîment*

*Dédicace*

**Résumé**

**Abstract**

**ملخص**

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

*Table des matières*

### *Introduction générale*

#### *Chapitre I : Synthèse bibliographique*

<b>I. Généralité sur les compléments alimentaires</b> .....	4
<b>I.1. Définition générale</b> .....	4
<b>I.2. Définition scientifique</b> .....	5
<b>I.3. Objectifs d'utilisation des compléments alimentaires</b> .....	6
<b>I.4. Principes de la complémentation alimentaire</b> .....	6
<b>I.5. Classification des compléments alimentaires</b> .....	7
<b>I.6. Types de compléments alimentaires</b> .....	8
<b>I.7. La forme galénique</b> .....	11
<b>I.8. Les compléments alimentaires fonctionnel</b> .....	15
<b>II. Les probiotiques</b> .....	16
<b>II.1. Définition</b> .....	16
<b>II.2. Les principaux types de micro-organismes probiotiques</b> .....	17
<b>II.3. Évaluation et critères de sélection</b> .....	20
<b>II.4. Effets thérapeutiques des probiotiques et leurs métabolites sur la santé humaine</b> .	21
<b>II.5. Le microbiote intestinal et les probiotiques</b> .....	23
<b>II.6. Les bactéries lactiques comme probiotiques</b> .....	24
<b>II.7. Les facteurs influencent sur les probiotiques (du processus jusqu'à la consommation)</b> .....	27

#### *Chapitre II : Généralité sur l'encapsulation*

<b>I. Histoire de l'encapsulation</b> .....	29
<b>II. Définition de l'encapsulation</b> .....	29

<b>III. Intérêt de l'encapsulation</b> .....	30
<b>IV. Domaines d'application de l'encapsulation</b> .....	31
<b>V. Procédés d'encapsulation</b> .....	34
<b>VI. Les techniques d'encapsulation les plus courantes, leurs avantages et leurs inconvénients</b> .....	35
<b>VII. Microparticules obtenues</b> .....	38
<b>VII.1. Taille</b> .....	38
<b>VII.2. Structure interne</b> .....	39
<b>VII.3. Quantification de l'actif encapsulé</b> .....	40
<b>VIII. Matériaux utilisés pour l'encapsulation</b> .....	41
<b>VIII.1. Polysaccharides</b> .....	42
<b>VIII.2. Protéines</b> .....	46
<b>VIII.3. Lipides</b> .....	51
<b>VIII.4. Levures</b> .....	51
<b>IX. Technique d'encapsulation des probiotiques</b> .....	52
<b>IX.1. Techniques les plus importantes utilisées pour l'encapsulation des cellules probiotiques</b> .....	52
<b>IX.2. Technique de coacervation dans l'encapsulation des probiotiques</b> .....	55

### *Chapitre III : Matériels & méthodes*

<b>I. Présentation du lieu et durée de travail</b> .....	58
<b>II. Objectif du travail</b> .....	58
<b>III. Les bactéries lactiques</b> .....	58
<b>IV. Matériels de laboratoire et milieux de culture</b> .....	59
<b>V. Méthodes d'analyses</b> .....	61
<b>V.1. Revivification des souches</b> .....	61
<b>V.2. Vérification de la pureté des souches</b> .....	62
<b>V.3. Préparation de la suspension bactérienne</b> .....	63
<b>VI. Méthode d'extrusion</b> .....	66
<b>VII. Méthode d'émulsion</b> .....	68
<b>VIII. Évaluation de la viabilité des capsules</b> .....	70

### *Chapitre IV : Résultats & Discussion*

<b>I. Résultats</b> .....	73
<b>I.1. Résultats de la revivification des souches bactériennes</b> .....	73
<b>I.2. Résultats de la vérification de la pureté des souches</b> .....	73
<b>I.3. Résultat du test d'auto agrégation</b> .....	75
<b>I.4. Résultat d'activité autolytique</b> .....	76
<b>I.5. Résultat test MATS</b> .....	77

<b>I.6. Interprétation des tests fonctionnels liés au potentiel probiotique .....</b>	<b>78</b>
<b>I.7. Résultat de la méthode d'extrusion .....</b>	<b>80</b>
<b>I.8. Résultat de la méthode d'émulsion .....</b>	<b>81</b>
<b>I.9. Résultat de l'évaluation de la viabilité des capsules .....</b>	<b>82</b>
<b>II. Discussion .....</b>	<b>84</b>
<b><i>Conclusion générale &amp; Perspective .....</i></b>	<b>87</b>
<b><i>Références bibliographiques .....</i></b>	<b>90</b>

*Annexes*

# *Introduction générale*

Les compléments alimentaires fonctionnels suscitent un intérêt croissant dans les domaines de la nutrition et de la santé humaine. Situés à la croisée de l'alimentation préventive et thérapeutique, ces produits visent à contribuer au bien-être global en apportant des substances actives capables d'améliorer certaines fonctions physiologiques ou de réduire le risque de maladies. Parmi ces substances, les probiotiques occupent une place prépondérante. Définis par l'Organisation mondiale de la santé comme des " micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte ", les probiotiques ont démontré leur efficacité dans la régulation du microbiote intestinal, le renforcement du système immunitaire, ainsi que la prévention de divers troubles digestifs, métaboliques ou infectieux (Hill et *al.*, 2014).

Dans ce contexte, la technique d'encapsulation apparaît comme une solution prometteuse. L'encapsulation consiste à enfermer les cellules probiotiques dans une matrice protectrice, généralement à base de polymères naturels tels que l'alginate de sodium, afin de les protéger contre les stress environnementaux (pH acide, enzymes digestives, oxydation, chaleur, etc.). Ce procédé permet non seulement d'améliorer la viabilité des souches encapsulées, mais aussi de contrôler leur libération dans le tube digestif (Gbassi et *al.*, 2009). Plusieurs techniques d'encapsulation existent, parmi lesquelles l'extrusion et l'émulsion sont les plus courantes, chacune présentant des avantages et des limites en termes de faisabilité, de coût, de stabilité des capsules et de rendement en viabilité.

Ce mémoire s'inscrit dans un contexte académique où l'accès à des équipements industriels sophistiqués est limité. Il est donc essentiel d'identifier une méthode d'encapsulation simple, reproductible et accessible dans un environnement universitaire. La problématique centrale de ce travail est la suivante : comment protéger efficacement les souches probiotiques dans un complément alimentaire fonctionnel en utilisant des techniques d'encapsulation simples et économiquement viables ? Autrement dit, quelle méthode permet de maintenir une bonne viabilité des souches probiotiques tout en garantissant une stabilité structurale satisfaisante des capsules dans des conditions de laboratoire ?

Pour répondre à cette problématique, deux approches ont été testées expérimentalement : la méthode d'émulsion et la méthode d'extrusion, toutes deux basées sur la gélification ionique de l'alginate par le chlorure de calcium. La première consiste à disperser la solution contenant les bactéries dans une phase huileuse suivie d'une réticulation, tandis que la seconde repose sur le dépôt goutte à goutte du mélange alginate-bactéries dans une solution de  $\text{CaCl}_2$ . Des observations ont été menées sur l'aspect des capsules, leur stabilité, leur capacité de filtration, ainsi que sur la viabilité bactérienne immédiatement après encapsulation et après une semaine de stockage.

Les résultats obtenus montrent que la technique d'extrusion, bien qu'elle produise des capsules plus grosses, permet une meilleure régularité de la forme sphérique et une manipulation plus simple. En revanche, l'émulsion donne des capsules plus petites mais plus hétérogènes, dont l'extraction est plus difficile. En termes de viabilité, les deux méthodes ont permis de maintenir une population bactérienne significative, mais l'extrusion a donné une meilleure stabilité des souches après 15 jours de stockage à 4 °C. Ces observations confirment que l'encapsulation par extrusion en alginate est une méthode adaptée pour la formulation de compléments alimentaires probiotiques dans un cadre universitaire, conciliant simplicité, reproductibilité et efficacité de protection.

Le présent document est structuré en quatre parties :

- La première partie est consacrée aux compléments alimentaires et aux probiotiques, présentant leurs définitions, leurs rôles et leur importance dans le domaine de la santé.
- La deuxième partie aborde les généralités sur l'encapsulation, ses principes, ses applications, les matériaux utilisés ainsi que les techniques les plus répandues.
- La troisième partie détaille le matériel et les méthodes utilisés lors de l'expérimentation.
- La quatrième partie présente et discute les résultats obtenus.
- Le travail se conclut par une conclusion générale, suivie des références bibliographiques et des annexes.

# *Chapitre I : Synthèse bibliographique*

L'intérêt pour les compléments alimentaires s'est intensifié au cours des dernières décennies, en réponse à une recherche croissante de solutions naturelles et préventives en matière de santé. Cette évolution s'inscrit dans un contexte où l'alimentation moderne ne répond plus toujours aux besoins physiologiques, et où les consommateurs se tournent vers des produits susceptibles de soutenir leur bien-être. Dans ce cadre, les compléments alimentaires suscitent un véritable engouement, tout en posant de nouveaux défis scientifiques et réglementaires. Ce chapitre s'attache à explorer cette thématique à travers une approche fondée sur les avancées scientifiques récentes et les exigences du secteur.

## **I. Généralité sur les compléments alimentaires**

### **I.1. Définition générale**

Les compléments alimentaires sont définis comme des produits destinés à enrichir l'alimentation quotidienne en apportant des nutriments ou d'autres substances ayant un effet bénéfique sur la santé, sur le plan nutritionnel ou physiologique. Ils se présentent sous des formes unitaires et dosées, telles que les gélules, comprimés, pastilles, pilules, sachets de poudre, ampoules buvables, flacons avec compte-gouttes, ou autres formes similaires de préparation, qu'elles soient liquides ou en poudre (Karleskind et *al.*, 2013).

Ces produits, également appelés compléments nutritionnels, visent à pallier des carences alimentaires ou à maintenir un bon équilibre nutritionnel. Ils peuvent contenir des vitamines, des minéraux, des acides aminés, des plantes ou d'autres substances actives. L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) les définit comme des sources concentrées de nutriments ou de substances à effet physiologique, conçues pour compléter l'alimentation habituelle. La Food and Drug Administration (FDA), de son côté, les décrit comme des produits oraux contenant un ingrédient alimentaire destiné à compléter le régime alimentaire.

Le marché mondial de ces produits est en pleine expansion, atteignant environ 120 milliards de dollars, avec une croissance annuelle estimée à 6 %. Leur consommation est répandue aussi bien dans les pays asiatiques qu'en Amérique du Nord et en Europe. Utilisés par des personnes de tous âges – qu'elles soient en bonne santé ou souffrantes – et y compris par les femmes enceintes, ces produits sont disponibles sans ordonnance dans les pharmacies, supermarchés, points de vente divers et en ligne.

Cependant, leur usage généralisé et parfois non encadré peut présenter des risques pour la santé. En effet, des problèmes peuvent survenir en cas de surdosage, d'interactions médicamenteuses, de composition non conforme ou de contamination par des substances ou micro-organismes dangereux (Fibigr et *al.*, 2018).

## I.2. Définition scientifique

Les compléments alimentaires regroupent une vaste diversité de produits, parmi lesquels ceux à base d'ingrédients d'origine végétale figurent parmi les plus prisés. Leur consommation s'étend à un large public, incluant aussi bien les individus en bonne santé que les personnes souffrant de divers troubles. Cependant, l'absence d'une réglementation harmonisée au niveau international augmente les risques liés à la qualité chimique et microbiologique de ces produits, pouvant représenter un danger réel pour les consommateurs.

Cette revue vise à souligner certains problèmes majeurs concernant la qualité microbiologique des compléments alimentaires contenant des extraits végétaux. L'accent est mis sur les études récentes rapportant des cas de contamination par des bactéries, des champignons et la présence de mycotoxines. Ces produits sont fréquemment exposés à des contaminations microbiennes diverses, ce qui soulève des inquiétudes quant à leur innocuité. En effet, ils peuvent contenir des micro-organismes pathogènes susceptibles de nuire à la santé humaine. De plus, les métabolites toxiques issus de ces micro-organismes peuvent représenter un risque sanitaire important.

Ainsi, ce travail met en lumière la nécessité de mener des analyses approfondies sur la qualité microbiologique des compléments alimentaires d'origine végétale, afin d'assurer la sécurité des consommateurs (Sato et *al.*, 1969).



**Figure 1** : Compléments alimentaires (la provence, 2025)

### **I.3. Objectifs d'utilisation des compléments alimentaires**

Les compléments alimentaires sont principalement utilisés pour enrichir l'alimentation quotidienne, notamment en cas de risque de carence nutritionnelle. Ils jouent un rôle important dans le maintien ou l'amélioration de l'état de santé général d'un individu. Leur consommation peut répondre à des besoins spécifiques, qu'ils soient liés à des fonctions physiologiques (par exemple, favoriser la circulation sanguine), au bien-être général (comme la lutte contre la fatigue), à des objectifs esthétiques (tels que la protection de la peau face aux effets du soleil) ou encore à la gestion du poids (par exemple, le contrôle de l'appétit) (Kodama K *et al.*, 2004).

### **I.4. Principes de la complémentation alimentaire**

L'influence de l'alimentation sur la santé humaine, notamment en lien avec des pathologies telles que le cancer ou les maladies cardiovasculaires, fait l'objet d'investigations scientifiques approfondies depuis plusieurs décennies. L'équilibre nutritionnel est ainsi devenu un critère central dans les choix alimentaires au quotidien.

Certaines populations présentent des besoins nutritionnels spécifiques qui justifient le recours aux compléments alimentaires. Par exemple, les personnes suivant un régime végétarien doivent compenser l'absence de vitamine B12 dans les végétaux, soit par des aliments enrichis, soit par des suppléments adaptés. Chez les nourrissons et les jeunes enfants, la vitamine D est également essentielle à leur développement, mais son apport alimentaire reste souvent insuffisant ; elle est donc fréquemment administrée sous forme de complément (Khalifaoui, 2018).

Les femmes présentent quant à elles des besoins accrus en fer dès la puberté, en raison des pertes liées aux menstruations et à la grossesse — leurs besoins sont en moyenne supérieurs de 77 % à ceux des hommes. À la ménopause, l'apport en calcium devient crucial pour prévenir l'ostéoporose, liée aux modifications hormonales.

Les teneurs en nutriments tels que le fer, la vitamine D ou le calcium varient selon les aliments. Ainsi, seul un régime alimentaire varié et équilibré, associant différentes sources nutritionnelles, peut garantir une couverture adéquate des besoins en éléments essentiels pour l'organisme (Khalifaoui, 2018).

### I.5. Classification des compléments alimentaires

La classification des compléments alimentaires varie selon les pays, ce qui crée un certain flou. En effet, certaines législations les considèrent comme de simples denrées alimentaires, tandis que d'autres les assimilent à des médicaments. Cette ambiguïté peut également prêter à confusion avec les additifs alimentaires. Pour ces raisons, plusieurs classifications ont été proposées, reposant notamment sur la nature des produits, leur catégorie ou les effets recherchés.

Dans un cadre plus large, en tenant compte des différentes interprétations possibles, on distingue notamment :

- ✓ Les aliments diététiques à usage médical,
- ✓ Les substances diététiques à usage médical,
- ✓ Les aliments diététiques à usage vétérinaire,
- ✓ Les substances diététiques à usage vétérinaire,
- ✓ Les aliments pour nourrissons,
- ✓ Et les compléments alimentaires.

Parmi ces catégories, les aliments diététiques à des fins médicales spéciales sont eux-mêmes divisés en trois sous-groupes, en fonction des besoins des personnes auxquelles ils sont destinés:

- **Aliments complets sur le plan nutritionnel** : leur composition standard leur permet, s'ils sont utilisés selon les indications, de constituer l'unique source de nutrition pour des individus ayant des besoins spécifiques en lien avec une pathologie ou un trouble.
- **Aliments complets adaptés** : ils possèdent une formulation conçue pour répondre à des besoins particuliers liés à une maladie, et peuvent également suffire à couvrir l'alimentation complète d'une personne dans ce contexte médical.
- **Aliments incomplets sur le plan nutritionnel** : qu'ils soient formulés de manière classique ou adaptée à une maladie spécifique, ils ne peuvent pas à eux seuls couvrir l'ensemble des besoins nutritionnels, mais sont utilisés en complément ou en remplacement partiel de l'alimentation.

Il est donc important que toute classification englobe non seulement les compléments alimentaires à proprement parler, mais aussi les substituts de repas, les aliments et boissons diététiques, ainsi que certains additifs.

Cependant, dans le cadre de cette étude, l'accent est mis exclusivement sur les compléments alimentaires, ce qui nous conduit à adopter une classification plus ciblée. De manière générale, ces produits peuvent être classés selon leur nature chimique, notamment :

- Les vitamines,
- Les minéraux,
- Les oligo-éléments,
- Les acides aminés,
- Les protéines,
- Ainsi que les plantes et extraits végétaux.

Ces substances sont destinées à compléter un régime alimentaire habituel ou à contribuer à la santé globale. Elles sont généralement consommées par voie orale, sous forme de comprimés, capsules, poudres, liquides ou gélules.

En complément des classifications basées sur leur composition, une autre approche pertinente consiste à classer les compléments alimentaires selon leur objectif fonctionnel ou l'effet recherché. C'est cette dernière approche, plus claire et cohérente, qui a été retenue dans notre étude (Nazeri et *al.*, 2009).

## **I.6. Types de compléments alimentaires**

### **I.6.1. Les macronutriments**

*Les macronutriments* sont des molécules de grande taille constituées de l'assemblage de petites unités. Ils jouent un rôle fondamental dans l'organisme, assurant la majorité des fonctions cellulaires essentielles. On distingue trois grandes catégories de macronutriments qui fournissent l'énergie nécessaire au bon fonctionnement du corps : les protéines, les lipides et les glucides. Ensemble, ils participent aux processus métaboliques, c'est-à-dire l'ensemble des réactions chimiques permettant la transformation ou la libération d'énergie. En moyenne, les protéines contribuent à hauteur de 15 % de l'apport énergétique, les lipides 36 %, et les glucides 44 % (Masson, 2009).

#### **a) Les protéines**

Les protéines, principalement issues des aliments d'origine animale, se distinguent par leur richesse en acides aminés essentiels et leur excellente digestibilité. Elles sont indispensables pour couvrir les besoins en acides aminés que le corps ne peut pas synthétiser (huit sur vingt doivent être apportés par l'alimentation) (Castelli, 2020).

Les protéines remplissent trois fonctions clés dans l'organisme :

- **Fonction énergétique** : elles contribuent à l'apport calorique nécessaire au fonctionnement de l'organisme, justifiant leur présence à chaque repas.
- **Fonction fonctionnelle** : elles interviennent dans la défense immunitaire contre les maladies.
- **Fonction structurale** : elles participent à la construction et au renouvellement des tissus, y compris la peau, les cheveux et les ongles (Théo, 2017).

Parmi les compléments protéinés disponibles sur le marché, on retrouve la caséine, la créatine, la poudre d'œufs, ainsi que les protéines de soja – ces dernières étant particulièrement prisées par les végétariens et végétaliens (Farkas, 2019).

## b) Les lipides

Les lipides alimentaires proviennent à la fois des sources animales (poissons, œufs, fromages, charcuteries, viandes) et végétales (graines, fruits oléagineux, huiles). Ils sont également présents dans certains produits transformés comme les viennoiseries ou les barres chocolatées (Anses, 2021).

Dans l'organisme, les lipides assurent deux rôles essentiels :

- **Stockage de l'énergie** : sous forme de triglycérides, ils sont principalement localisés dans les tissus adipeux.
- **Fonction structurale** : présents dans les membranes cellulaires sous forme de phospholipides, ils garantissent leur intégrité et leur fluidité.

Parmi les compléments lipidiques, on trouve notamment les oméga-3 (EPA et DHA), souvent extraits d'huile de poisson, qui sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme (Bouriche, 2019).

### I.6.2. Les micronutriments

*Les micronutriments* sont des éléments indispensables à l'organisme, présents en très faible quantité (environ 2 % de l'apport nutritionnel total) et sans valeur énergétique. Malgré leur faible concentration, leur rôle est essentiel dans de nombreux processus biologiques. Ils interviennent comme cofacteurs enzymatiques, coenzymes ou régulateurs génétiques. Par exemple, le zinc est impliqué dans plus de 100 réactions enzymatiques, tandis que la riboflavine et la niacine jouent un rôle actif dans le transport des électrons. De plus, certains micronutriments, tels que les "doigts de zinc", régulent la transcription des récepteurs hormonaux (Bird, 2003).

De nos jours, la micro nutrition est de plus en plus utilisée pour optimiser la santé, prévenir et traiter certaines pathologies. La majorité des micronutriments ne sont pas synthétisables par l'organisme et doivent donc être apportés par l'alimentation (El Kssimi, 2021).

Les principales catégories de micronutriments sont :

- **Les vitamines** : A, B, C, D, E, K
- **Les minéraux** : fer, cuivre, magnésium...
- **Les oligoéléments** : zinc, iode, sélénium, fluor... (El Kssimi, 2021)

#### **a) Les minéraux**

Les minéraux sont présents en petites quantités dans l'organisme et sont essentiels à son bon fonctionnement. Outre les macronutriments et l'eau, les aliments nous apportent aussi ces éléments minéraux vitaux, tels que le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), le sodium ( $\text{Na}^+$ ), le potassium ( $\text{K}^+$ ) ou le magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (Anses, 2012).

Ils contribuent à la croissance, à la régulation métabolique et à de nombreuses fonctions biologiques. Les compléments minéraux peuvent être proposés individuellement (ex. magnésium, fer) ou en synergie dans des formulations combinées (Valette, 2015).

#### **b) Les vitamines**

Les vitamines sont des composés organiques actifs indispensables au métabolisme cellulaire. Elles remplissent des rôles variés : croissance, développement osseux, digestion, énergie cellulaire, etc. À l'exception des vitamines D et K, la majorité des vitamines ne sont pas synthétisées par le corps humain et nécessitent donc un apport externe via l'alimentation ou la supplémentation.

Les vitamines hydrosolubles, comme celles du groupe B, sont impliquées dans le métabolisme énergétique, tandis que la vitamine C renforce l'immunité et lutte contre la fatigue. Les vitamines liposolubles, comme :

**La vitamine A (vision), la vitamine D (santé osseuse), la vitamine E (antioxydant), ont des rôles cruciaux dans l'équilibre physiologique.**

Une carence en vitamines peut engendrer des pathologies graves. La supplémentation vitaminique est donc souvent utilisée à titre préventif ou curatif (Valette, 2015 ; El Kssimi, 2021).

## I.7. La forme galénique

La forme galénique désigne la présentation physique du complément alimentaire (CA). Il en existe une grande variété : comprimés, poudres, capsules, solutions buvables, entre autres.

Le choix de cette forme ne repose pas uniquement sur des considérations esthétiques ou de praticité pour le consommateur. Il découle d'un ensemble de critères essentiellement techniques, tels que la nature des ingrédients utilisés, la zone cible de diffusion dans l'organisme, le volume des substances actives, le profil du consommateur (enfants, adultes, personnes âgées), l'effet recherché, ainsi que la biodisponibilité des composants (Anonyme, 2021).

### I.7.1. Forme solide

- **Le comprimé** : Il s'agit de la forme la plus courante. Il peut se désagréger directement dans l'estomac ou fondre dans la bouche dans le cas des comprimés à croquer (voir Figure 02).



**Figure 2** : Complément alimentaire en forme de comprimé (Lab-cmcpharma,2024)

- **La capsule** : Généralement constituée de gélatine d'origine animale, souvent de poisson, cette forme est particulièrement adaptée à l'encapsulation des extraits de plantes et des huiles (comme l'huile de foie de morue ou l'huile de bourrache). Elle permet une libération rapide de la substance active une fois ingérée.
- **La capsule molle** : Elle est conçue pour masquer les goûts ou odeurs désagréables, ce qui améliore l'acceptabilité du produit par le consommateur. Grâce à sa texture souple et à la composition de son enveloppe à base de gélatine, elle est plus facile à avaler que les gélules classiques (voir Figure 03).



**Figure 3 :** Complément alimentaire en forme de capsule molle (Hij Machinery, 2019)

- **La gélule :** Elle est principalement utilisée pour contenir des préparations hydrosolubles. En fonction de la nature des principes actifs qu'elle renferme, elle nécessite généralement une faible quantité d'excipients. Certaines gélules peuvent être gastro-résistantes, ce qui permet une libération ciblée des ingrédients actifs après le passage dans l'estomac. Un autre avantage notable des gélules est la possibilité de vider leur contenu dans un liquide, ce qui les rend adaptées aux personnes ayant des difficultés à avaler (voir Figure 04)



**Figure 4 :** Complément alimentaire en forme de gélule (Lab-phytoceutic, 2024).

- **La poudre :** Présentée sous forme de stick, elle offre l'avantage de pouvoir contenir une quantité importante d'ingrédients, ce qui la rend particulièrement adaptée aux formulations complexes. Sa nature hydrosoluble constitue une alternative idéale pour les personnes éprouvant des difficultés à avaler des formes solides et volumineuses telles que les comprimés (voir Figure 05).



**Figure 5 :** Complément alimentaire en poudre (Fitzone, 2022)

### I.7.2. Forme liquide

- **Ampoule buvable** : Il s'agit d'un petit récipient en verre contenant une solution liquide concentrée de la substance active, prêt à être consommé par voie orale (voir Figure 06).



**Figure 6 :** Complément alimentaire en forme d'ampoule (Lab-new galencica, 2024).

- **Gouttes** : Présentées dans un flacon avec compte-gouttes, elles permettent un dosage précis et adaptable en fonction de l'âge ou du poids de l'utilisateur (voir Figure 07).



**Figure 7 :** Complément alimentaire en forme goutte (Lafaurie, 2021)

- **Sirop :** Cette forme liquide, généralement épaisse ou légèrement visqueuse, est formulée à base de glucose, de fructose, de glycérine ou d'extraits végétaux. Elle est particulièrement adaptée aux enfants ou aux personnes ayant des difficultés à avaler (voir Figure 08).



**Figure 8 :** Complément alimentaire sous forme de sirop (Lab-Eric Favre, 2024)

- **Boissons :** Inspirées des boissons énergisantes, les boissons enrichies en multivitamines ou destinées à la perte de poids représentent une tendance croissante, particulièrement prisée par les jeunes consommateurs.



**Figure 9 :** Complément alimentaire sous forme de boisson (Nutricia, 2025)

- **Stick-pack** : Le stick-pack est un conditionnement primaire unidose, fabriqué à partir d'un seul film complexe enroulé autour du tube de remplissage lors du processus de conditionnement. Il est scellé aux extrémités supérieure et inférieure. Ce format peut contenir différents types de formulations : poudres, liquides ou encore formes pâteuses.



**Figure 10** : Complément alimentaire en forme de stick-pack (Lab-pharmacioreto, 2024).

### I.8. Les compléments alimentaires fonctionnel

Face aux besoins croissants en matière de prévention, de bien-être et de soutien ciblé de certaines fonctions biologiques, les compléments alimentaires connaissent une évolution majeure. Ainsi, une nouvelle catégorie a émergé : les compléments alimentaires fonctionnels. Contrairement aux compléments classiques qui visent à corriger des carences nutritionnelles, ceux-ci se distinguent par leur capacité à agir de manière ciblée sur des fonctions spécifiques de l'organisme, telles que l'immunité, la digestion, la santé cardiovasculaire ou encore la performance mentale. Ils sont souvent formulés à base de substances bioactives, comme les probiotiques, les antioxydants, ou les acides gras essentiels (Dubois, 2022)

**Tableau 1** : Types des compléments alimentaires fonctionnels (Dubois, 2022 ; DGCCRF ,2023)

Type de CA fonctionnel	Substances actives principales	Fonction ciblée	Exemples
<b>Probiotiques</b>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i>	Équilibre de la flore intestinale, immunité	Yaourts enrichis, gélules probiotiques
<b>Antioxydants</b>	Vitamine C, Vitamine E, polyphénols, sélénium	Protection cellulaire contre le stress oxydatif	Compléments à base de baies, thé vert
<b>Oméga-3</b>	Acides gras EPA, DHA (huile de poisson, lin)	Santé cardiovasculaire, cerveau, inflammation	Capsules d'huile de poisson
<b>Fibres alimentaires</b>	Inuline, psyllium, fibres solubles	Transit intestinal, satiété	Poudres de fibres, barres fonctionnelles
<b>Plantes adaptogènes</b>	Ginseng, Rhodiola, Ashwagandha	Résistance au stress, énergie, concentration	Gélules, tisanes
<b>Vitamines &amp; minéraux ciblés</b>	Zinc, magnésium, vitamine D	Immunité, métabolisme énergétique	Multivitamines enrichis
<b>Compléments pour articulations</b>	Glucosamine, chondroïtine, MSM	Mobilité, confort articulaire	Gélules articulaires

## II. Les probiotiques

### II.1. Définition

Le concept de probiotiques a connu une évolution progressive, en lien avec les avancées scientifiques et les réflexions des chercheurs au fil du temps.

Les premiers à avoir introduit le terme furent Lilly et Stilwell. Selon leur définition, il s'agissait de « substances produites par des micro-organismes favorisant la croissance d'autres micro-organismes » (Lilly et *al.*, 1956 ; Bernier, 2010).

Par la suite, en 1974, R.B. Parker élargit cette définition en y incluant directement les micro-organismes producteurs de ces substances. Il les décrit comme des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore » (Parker, 1974 ; Ninane et *al.*, 2009 ; Bernier, 2010).

Cependant, cette approche suscita des critiques. Fuller considéra que la définition pouvait inclure des antibiotiques, ce qui ne correspondait pas à l'idée initiale. Il proposa donc une nouvelle formulation, centrée sur l'effet bénéfique direct sur l'hôte : « des micro-organismes ajoutés à l'alimentation, ayant un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale » (Fuller, 1991). Cette version insiste davantage sur la nature microbienne des probiotiques.

Plus récemment, un groupe d'experts européens, avec l'approbation de la FAO et de l'OMS, a établi des lignes directrices précises pour l'usage du terme dans le domaine alimentaire. Ces organisations définissent les probiotiques comme suit :

« Micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, produisent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. » (Consultation mixte d'experts FAO/OMS).

## **II.2. Les principaux types de micro-organismes probiotiques**

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants, le plus souvent des bactéries ou des levures (voir tableau 2), naturellement présents dans le microbiote intestinal humain. On les retrouve également dans divers aliments, en particulier les produits laitiers fermentés tels que les yaourts, ainsi que dans certains médicaments et compléments alimentaires (Sébastien et *al.*, 2013).

Parmi les micro-organismes dotés de propriétés probiotiques, on distingue principalement les groupes suivants :

Tableau 2 : Les espèces des micro-organismes considérées de probiotique (Otlés, 2013)

Microorganismes	Genre	Espèces
<b>Bactéries lactiques</b>	<i>Lactobacilles spp.</i>	<i>L. acidophilus</i>
		<i>L. amylovorus</i>
		<i>L. court</i>
		<i>L. bulgaricus</i>
		<i>L. casei</i>
		<i>L. crispatus</i>
		<i>L. delbrueckii spp. Bulgaricus</i>
		<i>L. levure</i>
		<i>L. poulets</i>
		<i>L. gesseri</i>
		<i>L. helveticus</i>
		<i>L. johnsonii</i>
		<i>L. lactis</i>
		<i>L. paracasei</i>
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. salivaire</i>		
	<i>Streptocoque spp</i>	<i>S. salivariussubsp.</i> <i>Thermophilus</i>
	<i>Lactococcus spp.</i>	<i>L. lactis</i>
	<i>Leuconostoc spp</i>	<i>LC. Mésentéroïdes</i>

	<i>Pesiococcus spp.</i>	<i>P. pontosaceus</i> <i>P. acidilactici</i>
<b>Bifidobactéries</b>	<i>Bifidobactérie spp</i>	<i>B. adolescent</i> <i>B. animal</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. court</i> <i>B. essensis</i> <i>B. de l'enfant</i> <i>B. laterosporus</i> <i>B. longum</i>
<b>Propionibactéries</b>	<i>Propionibactérie spp.</i>	<i>P. acidipropionici</i> <i>P. freudenreichii</i> <i>P.jensenii</i> <i>P. thoenii</i>
<b>Entérobactéries</b>	<i>Entérocooccus spp.</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
<b>Bactéries sporulées</b>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>B. alcalophile</i> <i>B. cereus</i> <i>B. coagulans</i> <i>B. subtilis</i>
<b>Levures</b>	<i>Saccharomyces spp.</i>	<i>S. cerevisiae (boulardii) d</i>
<b>Autres bactéries</b>	<i>Escherichia spp.</i> <i>Sporolactobacillus spp.</i>	<i>E. coli</i> <i>S. inulinus</i>

### II.3. Évaluation et critères de sélection

L'OMS et la FAO ont établi plusieurs critères permettant d'identifier les souches les plus prometteuses en matière de propriétés probiotiques (voir tableau 03). Cette évaluation repose principalement sur trois aspects fondamentaux : les propriétés fonctionnelles, la viabilité des souches, ainsi que leur innocuité. À ces critères s'ajoutent des considérations technologiques, telles que la résistance aux bactériophages, la stabilité lors des procédés de fabrication, ainsi que la durabilité durant le stockage (Bruno, 2012).

D'autres critères essentiels interviennent après l'ingestion du probiotique. Ces critères sont influencés par des facteurs intrinsèques à la souche, ainsi que par ceux liés à l'hôte. Parmi eux, on retrouve notamment la résistance à l'acidité gastrique, aux sels biliaires, et au potentiel redox. Par ailleurs, l'interaction avec la flore microbienne endogène peut entraver la survie des probiotiques au sein du tube digestif (Marteau et *al.*, 2003).

Pour être efficaces, les souches probiotiques doivent survivre au passage dans le tractus gastro-intestinal et être capables de se développer dans l'intestin. Ainsi, le choix du vecteur ou du support dans lequel elles sont administrées joue un rôle crucial dans le maintien de leur viabilité jusqu'à leur site d'action (Marteau et *al.*, 2003).

Face à ces défis, de nouvelles stratégies d'encapsulation ont été développées. Elles visent à protéger les micro-organismes probiotiques, notamment contre l'action inhibitrice du suc gastrique, afin d'en améliorer la stabilité et l'efficacité dans le système digestif.

**Tableau 3 :** Récapitulatif des différents critères de sélection des probiotiques (Ganguly et *al.*, 2011).

<b>Critères de sécurité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Historique de non pathogénicité (GRAS)</li> <li>• Souche d'origine humaine ou alimentaire</li> <li>• Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques</li> <li>• Souche déposée dans une collection de culture internationale</li> <li>• Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques</li> <li>• Pas de deshydroxylation des sels biliaires</li> </ul>
-----------------------------	--

<b>Critères fonctionnels</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tolérance à l'acidité</li> <li>• Tolérances à la bile</li> <li>• Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes</li> <li>• Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus</li> <li>• Stimulation du système immunitaire</li> </ul>
<b>Critères technologiques et organoleptiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stabilité tout au long du processus de production et dans les produits finaux.</li> <li>• Conservation des propriétés probiotiques et organoleptiques.</li> </ul>

#### II.4. Effets thérapeutiques des probiotiques et leurs métabolites sur la santé humaine

**Tableau 4 :** Les effets thérapeutiques des probiotiques et leurs métabolites sur la santé humaine (Otlés, 2013)

<b>Activité probiotique</b>	<b>Mécanismes</b>	<b>Effet sur la santé</b>
<b>Antibactérien</b>	Libération d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène et de bactériocines capables de moduler la croissance et/ou l'adhésion des agents pathogènes ou d'autres populations bactériennes au niveau de la muqueuse intestinale	Prévention et/ou prise en charge des infections gastro-intestinales ainsi que des épisodes diarrhéiques.
<b>Fourniture d'enzymes</b>	Activité B-galactosidase Activité A-galactosidase Activité estérase	Amélioration de la digestion et de la tolérance au lactose chez les personnes présentant une hypolactasie.  Optimisation de la digestion et de la tolérance aux

		<p>galactosides tels que la raffinose, la stachyose et ceux présents dans le soja.</p> <p>Hydrolyse des polyphénols par déglycosylation, facilitant leur assimilation.</p>
<p><b>Composants cellulaires immuno- modulateurs et / ou activité anti-inflammatoire</b></p>	<p>Les exopolysaccharides, les acides lipotéichoïques et d'autres composés bactériens sont en mesure de moduler la réponse immunitaire de l'hôte. Ils peuvent notamment favoriser la libération d'IgA sécrétoires ou de défensines, activer les récepteurs Toll-like, renforcer l'activité cytotoxique des lymphocytes T, stimuler la phagocytose par les neutrophiles et les macrophages, ainsi que réguler la sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoires selon les besoins immunitaires de l'organisme.</p>	<p>Prévention et/ ou prise en charge des infections bactériennes et virales locales et systémique.</p> <p>Diminution de la symptomatologie chez les personnes allergiques.</p> <p>Diminution de l'inflammation chez les sujets Présentant des pathologies inflammatoires (MICI, NEC, pathologies autoimmunes....etc</p>
<p><b>Activité anti- tumorales</b></p>	<p>Inhibition des activités enzymatiques procancérogènes (Bglucuronidase, nitroréductase, azoréductase) par les populations bactériennes de l'IM</p>	<p>Diminution du risque de cancer colorectal</p>

	stimulation de l'apoptose antioxydant/antiinflammatoire activités liaison mutagène	
<b>Activité trophique</b>	Augmentation des polyamines ( <i>saccharomyces boulardi</i> )	Stimule la croissance de la muqueuse intestinale

## II.5. Le microbiote intestinal et les probiotiques

Le microbiote humain constitue un écosystème complexe, comprenant entre 1 000 et 1 150 espèces bactériennes, pour un total estimé entre  $10^{13}$  et  $10^{14}$  micro-organismes. La plus grande diversité et densité bactérienne se situe au niveau de l'iléon distal et du côlon. À la naissance, le tractus intestinal est stérile ; sa colonisation débute dès l'accouchement et se poursuit avec les premiers repas. Après la petite enfance, la composition du microbiote tend à se stabiliser, bien qu'il conserve une grande capacité de résilience face aux perturbations.

Chez les individus sains, la flore bactérienne est peu abondante dans l'estomac et le jéjunum en raison de la motilité intestinale et de l'acidité gastrique. L'iléon terminal représente une zone de transition, avec une augmentation progressive de la charge bactérienne, jusqu'à atteindre  $10^9$  UFC/ml près de la valve iléo-caecale, dominée par des bactéries Gram négatif et anaérobies. Dans le côlon, la concentration atteint jusqu'à  $10^{12}$  UFC/ml, avec une prédominance de bactéries anaérobies strictes telles que *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Clostridium*, surpassant largement les aérobies.

La distribution des bactéries varie également selon la proximité de la muqueuse ou de la lumière intestinale. Le microbiote intestinal exerce un rôle fondamental dans de nombreuses fonctions: nutrition, maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale, immunité muqueuse, motilité intestinale, métabolisme de l'hôte, et même régulation de l'humeur et du comportement. Les altérations de cet équilibre (dysbioses) ont été associées à divers états pathologiques, bien que la nature causale de ces liens reste parfois à clarifier (Otlés, 2013).

## II.6. Les bactéries lactiques comme probiotiques

### II.6.1. Définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont des micro-organismes à Gram positif, généralement de forme coccoïde ou bacillaire. Elles sont non sporulées, présentent une bonne tolérance aux environnements acides et sont principalement reconnues pour leur capacité à produire de l'acide lactique à partir de la fermentation des sucres. Parmi les espèces les plus couramment étudiées, on retrouve *Lactocaseibacillus rhamnosus GG*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Lactocaseibacillus casei LA1*, et *Lactobacillus gasseri*, entre autres (Varela-Pérez et al., 2022).

### II.6.2. Le processus de fermentation

La fermentation est un processus biochimique au cours duquel des micro-organismes tels que les bactéries, les levures ou les moisissures transforment des composés organiques complexes en substances plus simples, souvent dotées de propriétés bioactives, fonctionnelles et nutritionnelles. Ce mécanisme repose sur l'action d'enzymes et de catalyseurs microbiens. Selon la voie métabolique empruntée, la fermentation se divise généralement en quatre types principaux : alcoolique, lactique, acétique et alcaline (Varela-Pérez et al., 2022).

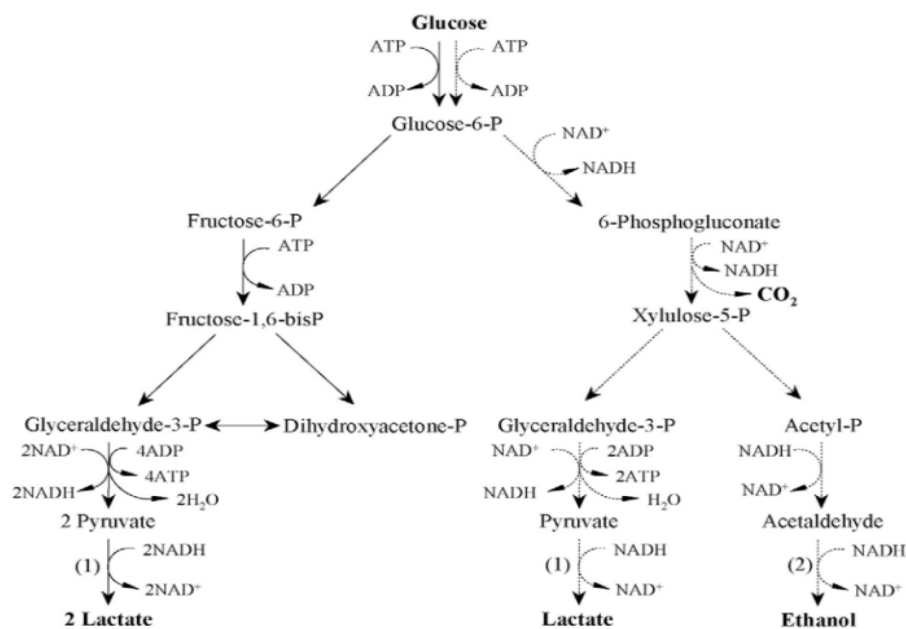
**Tableau 5** : Les voies de fermentation lactique (Mannaa, Han, Seo, et Park, 2021)

Le type de fermentation	Le mécanisme	L'espèce
<b>Fermentation acétique</b>	Convertit les sucres en acide acétique	Acétobacter
<b>Fermentation lactique</b>	Convertit les sucres en acide lactique (voie homofermentaire) et parfois avec d'autres en faible concentration CO <sub>2</sub> , acides organiques, éthanol. (voie hétérofermentaire)	Lactobacilles et streptocoques
<b>Fermentation alcoolique</b>	Convertit les sucres en éthanol et en CO <sub>2</sub>	Levures et moisissures
<b>Fermentation alcaline</b>	Convertit les protéines en acides aminés et en ammoniac.	Bacillus et staphylocoques

### II.6.3. La fermentation lactique

Les bactéries lactiques (LAB) sont des micro-organismes à Gram positif reconnus comme les principaux producteurs industriels sûrs d'acide lactique (AL). Ce dernier est synthétisé via la glycolyse en conditions anaérobies, à partir de la métabolisation des hexoses et des pentoses. La productivité et le rendement de cette production dépendent de plusieurs facteurs tels que le pH (optimal entre 3,5 et 9,6), la température (entre 5 et 45 °C), la disponibilité de nutriments (acides aminés, peptides, nucléotides, vitamines) et les souches bactériennes utilisées. Les genres bactériens couramment impliqués dans cette fermentation comprennent *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus* et *Weissella*.

Les LAB sont classées en deux groupes selon leur capacité fermentaire : les LAB homofermentaires transforment le glucose quasi exclusivement en acide lactique, tandis que les LAB hétérofermentaires produisent également de l'éthanol ou de l'acide acétique, ainsi que du dioxyde de carbone (Varela-Pérez et al., 2022).



**Figure 11 :** Voie métabolique des bactéries lactiques homofermentaires (ligne continue) et hétérofermentaires (lignes pointillée) (Wee, Kim, & Ryu, 2006)

#### II.6.4. Quelques propriétés technologiques et nutritionnelles des bactéries lactiques

**Tableau 6 :** Quelques propriétés technologiques et nutritionnelles des bactéries lactiques

(Otlés, 2013)

<b>Avantages</b>	<b>Fonctionnalités</b>
<b>Conservation des aliments</b>	Production des bactériocines, modification du pH , production du peroxyde d'oxygène ...
<b>Organoleptiques</b>	Formation des exopolysaccharides, des acides organiques, des molécules aromatiques, production d'enzymes bénéfiques.
<b>Technologique</b>	Résistance aux bactériophages, viabilité aux cours de transformation, prévention du phénomène over acidification...
<b>Nutritionnel</b>	Production de macro et micronutriments, digestion des sucres, réduction des toxiques et des antinutriments, sécrétion de galactase et lactase, réduction de la production des aminés biogènes

II.7. Les facteurs influencent sur les probiotiques (du processus jusqu'à la consommation)

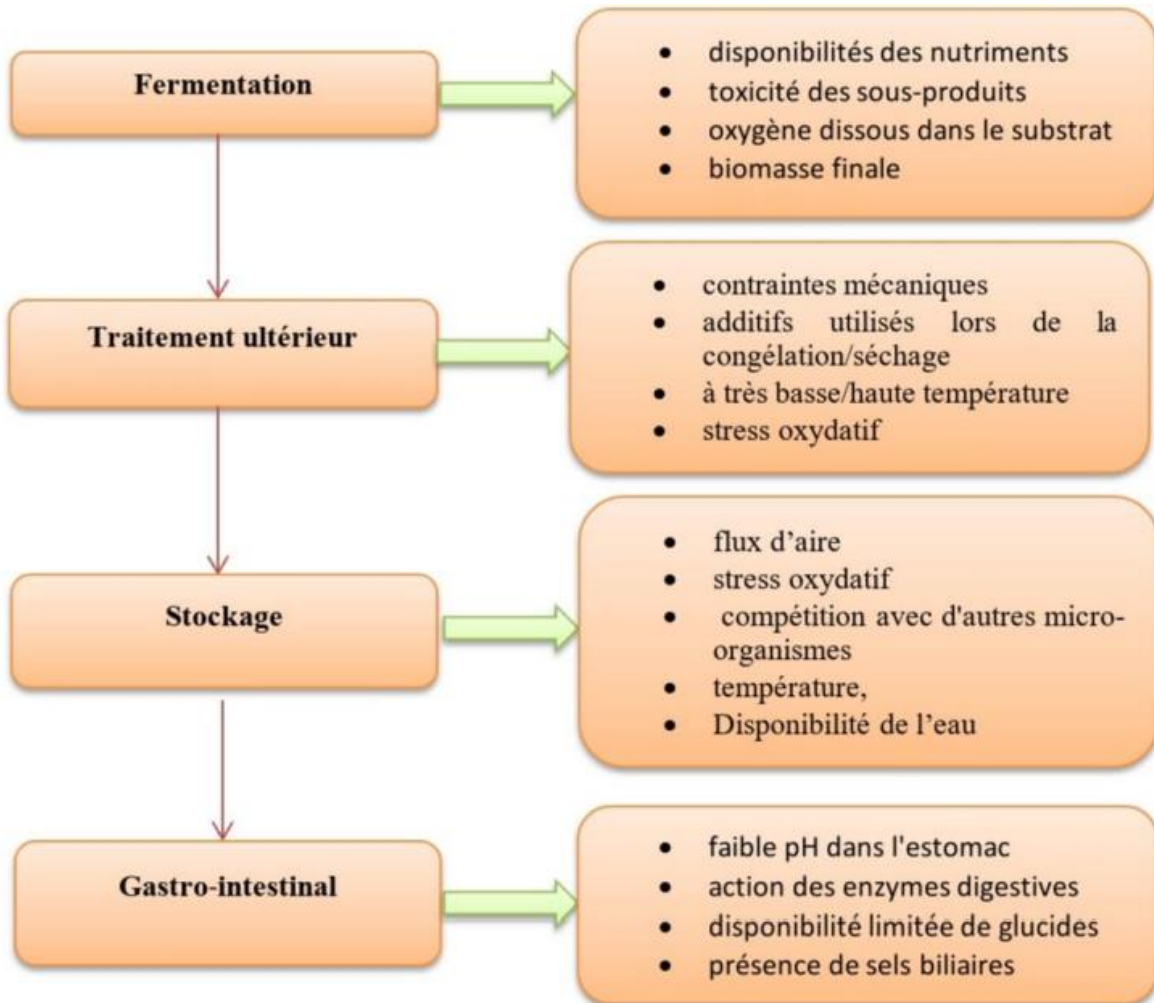


Figure 12 : Les facteurs influencent sur les probiotiques (Pejcz, 2024)

*Chapitre II : Généralité sur  
l'encapsulation*

L'encapsulation est une technique largement utilisée dans de nombreux secteurs, notamment dans l'agroalimentaire, la pharmacie et la cosmétique. Elle permet de protéger des substances bioactives, sensibles aux conditions environnementales, telles que l'humidité, la chaleur ou l'oxydation. L'objectif principal de cette technologie est d'assurer une protection optimale des ingrédients tout en permettant une libération contrôlée et ciblée. Ce chapitre explore les différentes méthodes d'encapsulation, les matériaux utilisés et les avantages qu'elles offrent pour améliorer la stabilité et l'efficacité des bioactifs dans diverses applications industrielles.

## I. Histoire de l'encapsulation

L'encapsulation a vu le jour dans les années 1950 aux États-Unis, initialement dans le domaine de l'imprimerie, avec le développement du papier autocopiant sans carbone, également appelé papier "autocollant" (Green et Scheicher, 1955). Rapidement, cette technologie a trouvé d'autres usages, notamment pour masquer le goût désagréable de certains ingrédients, ou encore pour transformer des substances liquides en formes solides.

À partir du milieu des années 1980, l'encapsulation a été exploitée dans la communication olfactive. C'est ainsi qu'ont émergé des encarts parfumés dans les magazines, servant à promouvoir des produits tels que les parfums, savons, adoucissants ou détergents. Ces supports publicitaires utilisaient des encres spéciales contenant des microcapsules de parfum, libérant leur contenu lorsqu'elles étaient frottées (Nelson, 2002).

L'encapsulation a ensuite été développée dans le secteur agroalimentaire, notamment pour masquer le goût peu agréable de certaines vitamines ou pour solidifier des substances liquides. Elle permet également de protéger les principes actifs contre l'oxydation - comme les arômes - ou l'humidité, dans le cas du sel ou du sucre (Augustin et *al.*, 2001 ; Heinzen, 2002).

Au cours des vingt dernières années, la microencapsulation a suscité un intérêt croissant dans divers domaines de la recherche fondamentale (pharmaceutique, chimique, cosmétique et alimentaire), ainsi que dans de nombreuses applications industrielles (Gouin, 2004 ; Madene, 2006).

## II. Définition de l'encapsulation

L'encapsulation est une technique qui consiste à piéger ou à enrober une substance, ou un mélange de substances spécifiques, à l'aide de matériaux appropriés. Les substances encapsulées peuvent être liquides, solides ou gazeuses, et sont généralement des principes actifs sensibles ou instables face à certains facteurs environnementaux. Cette méthode permet également la vectorisation ciblée de ces

substances, ou encore la modification de leur état physique, comme la transformation d'un liquide en solide (Kerdudo, 2014).

Dans le domaine de l'encapsulation, on distingue principalement deux types de particules, en fonction de leur taille :

- ✓ Les microparticules
- ✓ Les nanoparticules

Selon Benoit et *al.*, (2013), la taille des microparticules varie entre 1  $\mu\text{m}$  et 1000  $\mu\text{m}$ , tandis que Thies (1987) a proposé une définition plus restreinte, situant leur taille entre 1  $\mu\text{m}$  et 500  $\mu\text{m}$ . En conséquence, toute particule dont le diamètre est inférieur à 1  $\mu\text{m}$  est considérée comme une nanoparticule.

### III. Intérêt de l'encapsulation

Dans divers secteurs d'application tels que l'alimentaire, le pharmaceutique, ou encore le cosmétique, l'encapsulation est utilisée pour confiner des matériaux (principe actif, PA) dans une particule, avec les objectifs suivants :

#### ➤ Immobilisation ou isolation

L'immobilisation est fréquemment appliquée aux cellules microbiennes (Zhu, 2007). Le confinement de ces cellules au sein d'une membrane semi-perméable permet de les isoler physiquement du milieu extérieur tout en préservant un environnement interne optimal pour leur croissance et leur métabolisme, ce qui favorise une activité maximale (Poe, 2000).

#### ➤ Protection

De nombreux composés actifs, étant sensibles aux facteurs externes, nécessitent une protection. L'encapsulation joue ici un rôle crucial en les protégeant des contraintes environnementales. Par exemple, les vitamines E et C sont souvent encapsulées afin de les protéger contre la dégradation causée par la lumière, la chaleur ou l'oxygène (Dubernet et *al.*, 1991 ; Stevanović et *al.*, 2007). Cette technique est également utilisée dans le domaine médical, notamment pour l'encapsulation de bactéries probiotiques, offrant ainsi une protection contre les conditions des tractus gastro-intestinal (Chávarri et *al.*, 2010).

#### ➤ Libération

L'industrie textile utilise la micro-encapsulation pour limiter l'évaporation des molécules volatiles et garantir une action prolongée. Par exemple, des textiles en coton peuvent contenir des insecticides encapsulés, comme l'huile essentielle de citronnelle (Specos et *al.*, 2010).

### ➤ Structuration

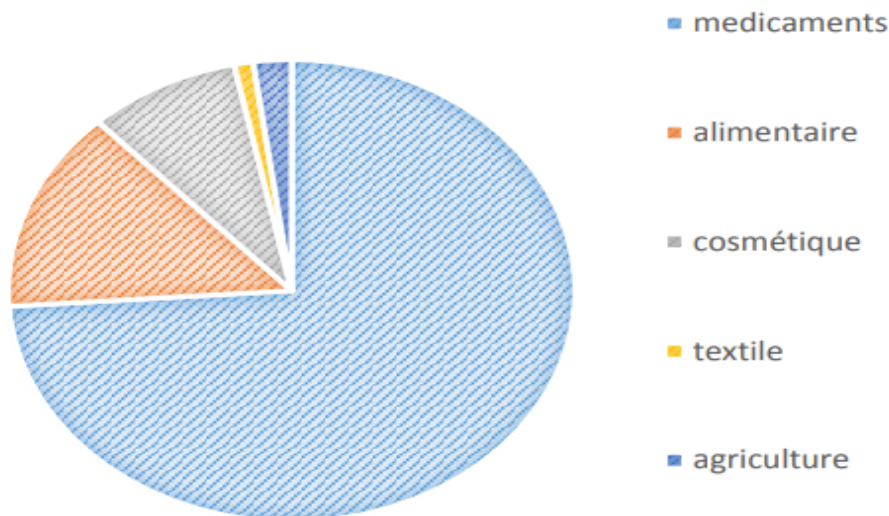
L'encapsulation d'un composé liquide dans des microparticules solides permet de modifier l'état physique de la substance, la transformant de l'état liquide à solide (Fuchs et *al.*, 2006).

Pour atteindre ces objectifs, plusieurs critères sont essentiels afin qu'un système d'encapsulation soit efficace, notamment dans un cadre alimentaire (McClements et *al.*, 2007):

- L'utilisation de méthodes respectant les principes de la chimie verte, c'est-à-dire sans recours à des solvants organiques toxiques comme les acides organiques, l'acétate, le lactate, ou l'éthanol (Tamer, 2016).
- Le système doit être capable d'incorporer des composés bioactifs dans des matrices alimentaires stables physico chimiquement, tout en minimisant l'impact sur les propriétés organoleptiques du produit final (Donsi et *al.*, 2011).
- Il doit protéger les composés encapsulés contre les interactions avec d'autres ingrédients alimentaires ainsi que contre la dégradation due à la lumière, la température ou le pH (McClements et *al.*, 2007).
- Le système doit optimiser l'absorption des composés lors de la consommation et permettre une libération contrôlée en réponse à un stimulus environnemental spécifique (Tamer, 2016 ; McClements et *al.*, 2007).
- Le système doit être adapté à une production à l'échelle industrielle (Donsi et *al.*, 2011 ; Donsi et *al.*, 2010).

### IV. Domaines d'application de l'encapsulation

L'encapsulation représente une technique innovante permettant la conception de produits à haute valeur ajoutée dans de nombreux secteurs. La figure 14 illustre la répartition, en pourcentage, de son utilisation selon les domaines d'application. Il en ressort que le domaine pharmaceutique domine largement avec 68 % des applications, suivi par l'agroalimentaire (13 %) et la cosmétique (8 %). En revanche, certaines branches comme l'électronique – à l'exemple des textiles intelligents – ne représentent qu'une faible part, soit environ 1 % (Abdallaoui, 2018).



**Figure 13 :** Représentation graphique de la répartition de l'utilisation de l'encapsulation dans les différents domaines d'application (Abdallaoui, 2018)

L'encapsulation trouve sa place dans une grande diversité de secteurs, grâce à sa capacité à répondre à des besoins spécifiques selon les contextes d'utilisation. Chaque procédé d'encapsulation est choisi en fonction de plusieurs paramètres bien définis : la nature du principe actif à encapsuler, la taille des particules souhaitée, le domaine d'application visé (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire, peinture, etc.), la vitesse et les conditions de libération désirées, les rendements attendus, ainsi que les contraintes techniques et économiques liées à la production (Akdim, 2017).

Le tableau 07 ci-dessous présente quelques exemples illustrant les principales applications de l'encapsulation dans divers domaines.

**Tableau 7** : Exemples d'applications des micro-encapsulations (Madene, 2006 ; Vandamme et *al.*, 2007).

<b>Domaines d'applications</b>	<b>Exemples de composés encapsulés</b>
<b>Pharmacie et médical</b>	Antibiotiques, contraceptifs, enzymes, vaccins, bactéries, vitamines, minéraux, antigènes, anticorps...
<b>Cosmétique</b>	Parfums, huiles essentielles, anti transpirants, agents bronzants, crèmes solaires, colorants capillaires, baumes démêlants, mousses à raser...
<b>Alimentaire</b>	Huiles essentielles, graisses, épices, arômes, vitamines, minéraux, colorants, enzymes, levures, micro-organismes...
<b>Agriculture</b>	Herbicides, insecticides, engrais, répulsifs, hormones végétales...
<b>Biotechnologie</b>	Enzymes immobilisées, microorganismes, cellules vivantes, cellules artificielles, cultures tissulaires, composés nutritionnels...
<b>Chimie</b>	Catalyseurs, enzymes, additifs pour plastiques, eau (plâtre et béton), inhibiteurs de corrosion, retardateurs d'incendie, colorants et pigments, agents UV protecteurs, parfums, huiles essentielles, agents lubrifiants...
<b>Détergents</b>	Adoucissants, antistatiques, agents décolorants, agents moussants, silicones, cires, détachants...
<b>Textile</b>	Colorants, parfums, pigments, bactéricides, fongicides, répulsifs d'insectes, agents antistatiques, retardateurs d'incendie, agents imperméabilisants, adhésifs, composés bioactifs médicaux, composés bioactifs cosmétiques
<b>Graphismes et impression photographie</b>	Colorants, pigments, parfums, révélateurs, cristaux liquides, toners, composés photosensibles... Halogénures d'argent, pigments, colorants, composés photo polymérisables, révélateurs pour photographies couleurs, plastifiants...
<b>Electronique</b>	Cristaux liquides, matériaux semi-conducteurs, adhésifs, agents de séchage, retardateurs de flammes, antistatiques...
<b>Traitement des déchets</b>	Microorganismes, substrats, détoxifiants, déchets liquides (solidification), déchets industriels à risques, déchets radioactifs

## V. Procédés d'encapsulation

Il existe plusieurs méthodes permettant d'encapsuler des composés bioactifs. Le choix de la technique la plus adaptée dépend principalement du type de matériau utilisé ainsi que des propriétés souhaitées pour le produit final. Un élément clé à prendre en compte est la nature du matériau constituant la paroi de la capsule, car celui-ci influence fortement l'efficacité de l'encapsulation et les propriétés de la substance encapsulée. Il est donc essentiel de le sélectionner avec soin (Dias et *al.*, 2017).

Les procédés industriels d'encapsulation peuvent être classés selon différents critères (Richard & Benoit, 2000) :

- L'utilisation ou non d'un solvant organique ;
- La nature du milieu dispersant (liquide, gazeux ou supercritique) ;
- L'usage de polymères préformés, de lipides ou de monomères ;
- Le type de procédé employé pour réaliser l'encapsulation.

Cette dernière classification, basée sur le principe de fonctionnement du procédé, est la plus couramment utilisée. Elle permet de regrouper les procédés en trois grandes catégories (Bile, 2015):

### ➤ Les procédés mécaniques

Ils reposent sur des techniques de séchage ou de solidification de gouttelettes contenant l'ensemble des composants nécessaires à la formation des particules encapsulées.

### ➤ Les procédés chimiques

Ces méthodes impliquent la formation simultanée de la membrane (ou matrice) et l'encapsulation du principe actif. Contrairement aux procédés mécaniques, ils ne font pas appel à des matériaux enrobants déjà formés.

### ➤ Les procédés physico-chimiques

Ces techniques exploitent :

- La solubilité des agents enrobants, modulée par des variations de conditions physiques (température, pH, ajout de non-solvant ou de polymère incompatible) ;
- Des changements d'état tels que la fusion puis la solidification des agents encapsulants (Bile, 2015).

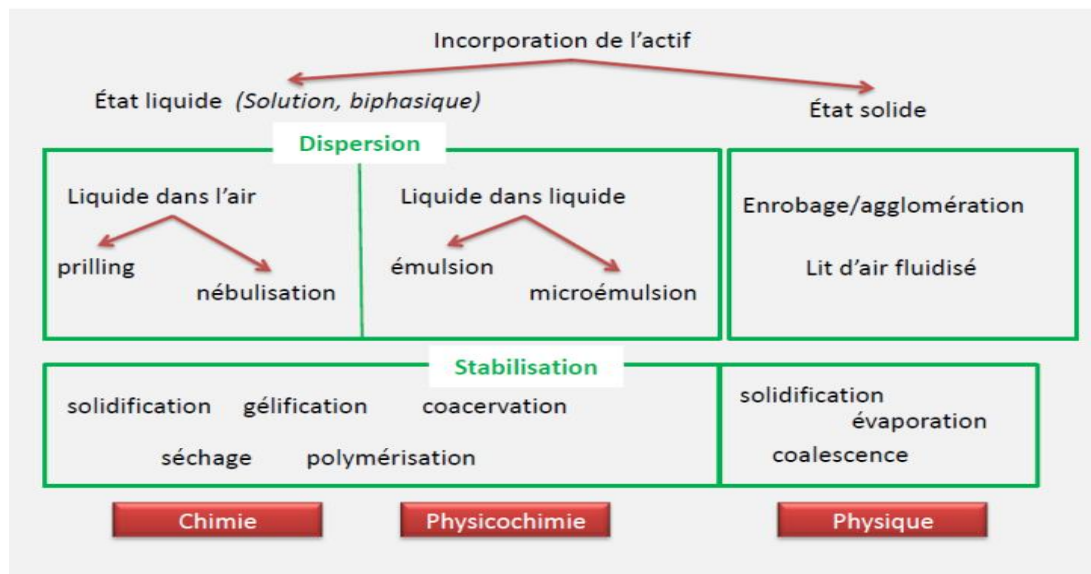


Figure 14: Méthode de préparation (Microencapsulation, 2022)

VI. Les techniques d'encapsulation les plus courantes, leurs avantages et leurs inconvénients

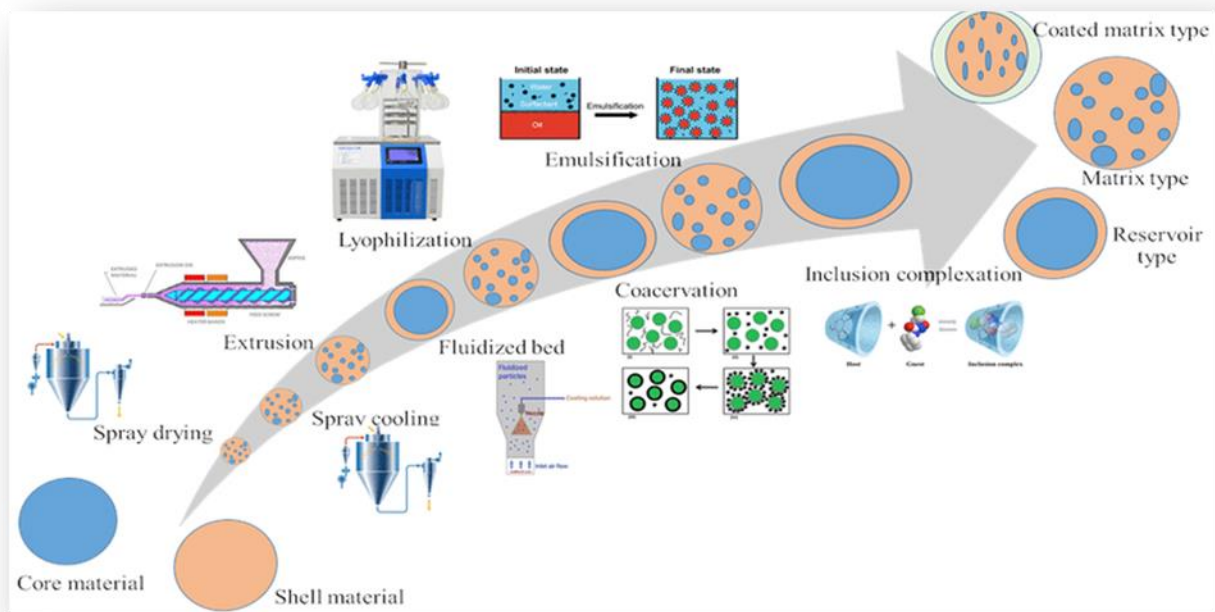
Tableau 8 : Les techniques d'encapsulation les plus courantes, leurs avantages et leurs inconvénients (Koh et al., 2022)

Méthodes	Propriétés de l'encapsulation	Avantages	Inconvénients
<b>Extrusion (gélification ionique externe)</b>	Produit des capsules d'une taille de 100 µm à 3mm. Peut encapsuler des composés hydrophiles et hydrophobes /lipophiles	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Monodispersité des particules, garantissant une taille homogène.</li> <li>- Procédé simple et doux, préservant l'intégrité des substances actives.</li> <li>- Peut être réalisé aussi bien en conditions aérobies qu'anaérobies.</li> <li>- Faible coût d'exploitation, rendant le procédé économiquement avantageux.</li> <li>- Taux de survie élevé des probiotiques, assurant</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Génère des perles de taille relativement importante, peu adaptées à certaines applications fines.</li> <li>- Processus de solidification lent, limitant la rapidité de production.</li> <li>- Peu adapté à la production à grande échelle, en raison de ses contraintes techniques.</li> <li>- Nécessite une étape supplémentaire de séchage, ce qui augmente le temps et les coûts de traitement.</li> </ul>

		une meilleure efficacité fonctionnelle.	
<b>Émulsion (gélification ionique interne)</b>	Produit des capsules d'une taille de 200 nm à 1 mm Peut encapsuler des composés hydrophiles et hydrophobes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Procédé simple à mettre en œuvre, ne nécessitant pas d'équipements complexes.</li> <li>- Génère des perles de petite taille, adaptées à diverses applications industrielles.</li> <li>- Compatible avec une production à grande échelle, idéal pour les procédés industriels.</li> <li>- Assure un taux de survie élevé des bactéries, favorable à l'encapsulation de probiotiques.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Particules polydisperses</li> <li>- Coût d'exploitation élevé</li> <li>- Instabilité thermodynamique des émulsions classiques</li> <li>- Inadaptée aux matrices alimentaires pauvres en matières grasses</li> <li>- Nécessite un séchage supplémentaire</li> </ul>
<b>Coacervation (complète la coacervation)</b>	Produit des capsules d'une taille de 1µm à 1mm.  Encapsule les composés hydrophobes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Processus simple et doux.</li> <li>- Adapté au secteur agroalimentaire</li> <li>- Offre une efficacité élevée d'encapsulation</li> <li>- Permet une libération contrôlée des composés encapsulés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coût opérationnel élevé.</li> <li>- Ne convient pas à la production en grande quantité.</li> <li>- Les protéines d'origine animale sont couramment utilisées.</li> <li>- Stabilité limitée à un pH, une force ionique et une plage de température spécifiques.</li> </ul>
<b>Séchage par pulvérisation</b>	Produit des capsules d'une taille de 5 à 150 µm. Encapsule des composés hydrophiles et hydrophobes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Manodispersité.</li> <li>- Processus rapide et continu Faible coût d'exploitation.</li> <li>- Convient à la production de masse.</li> </ul>	<p>Faible viabilité cellulaire.</p> <p>Produit des perles avec une faible uniformité</p> <p>Les biomatériaux utilisés doivent</p>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Produit des perles sèches avec une faible densité apparente, une activité de l'eau et une stabilité élevée</li> </ul>	
<b>Lyophilisation</b>	<p>Produit des capsules de 1 à 1,5 mm.</p> <p>Encapsule les composés hydrophiles et hydrophobes /lipophiles</p>	<p>Convient aux probiotiques sensibles à la température. Le produit final séché est adapté à la plupart des applications alimentaires.</p>	<p>Coût d'exploitation élevé. Ne convient pas à la production de masse. Des cryoprotecteurs sont nécessaires.</p>
<b>Refroidissement par pulvérisation</b>	<p>Produit des capsules avec des tailles de composés hydrophobes 20-200 µm</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Monodispersité.</li> <li>- Processus rapide, continu et doux, avec un faible coût d'exploitation.</li> <li>- Convient à la production de masse et promet une libération contrôlée de probiotiques.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible efficacité d'encapsulation.</li> <li>- Libération rapide des probiotiques encapsulés.</li> <li>- Des conditions de stockage spécifiques peuvent être nécessaires.</li> </ul>
<b>Revêtement à lit fluidisé</b>	<p>Produit des capsules de tailles 5-5000 µm.</p> <p>Encapsule hydrophile et composés hydrophobes</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Processus léger Faible cout d'opération Convient à la production de masse Peut fournir couches multicouches.</li> <li>- Convient à la température probiotiques sensibles</li> </ul>	<p>Processus lent Les probiotiques doivent être pré-encapsulé et séché</p>

Cette illustration (Figure 15) présente différentes techniques d'encapsulation permettant d'emprisonner un matériau actif dans une matrice ou une coque protectrice. On y retrouve plusieurs méthodes telles que le séchage par atomisation, la lyophilisation, l'extrusion, la coacervation, l'émulsification, et l'enrobage en lit fluidisé. Ces techniques aboutissent à divers types de structures : réservoir, matrice simple ou matrice enrobée, en fonction du procédé utilisé et des matériaux impliqués.



**Figure 15** : Les différents techniques d'encapsulation (Hanumantharaju et *al.*, 2021)

## VII. Microparticules obtenues

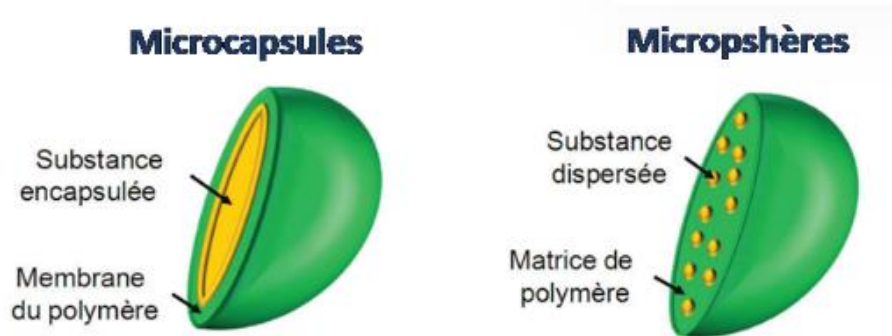
Les microparticules sont des systèmes colloïdaux principalement développés pour des applications thérapeutiques. Leur composition et leur structure varient selon les matériaux utilisés et les objectifs recherchés.

### VII.1. Taille

La taille des microparticules dépend à la fois de la technique d'encapsulation choisie et des dimensions du principe actif. En général, ces particules ont une taille comprise entre 1 et 1000  $\mu\text{m}$ . Lorsque la taille est inférieure à 1  $\mu\text{m}$ , on parle alors de nanoparticules, que l'on distingue en nanocapsules ou nanosphères. À l'inverse, lorsque la taille dépasse les 1000  $\mu\text{m}$ , il s'agit de macroparticules (Jyothi et *al.*, 2010 ; Whelehan et *al.*, 2011).

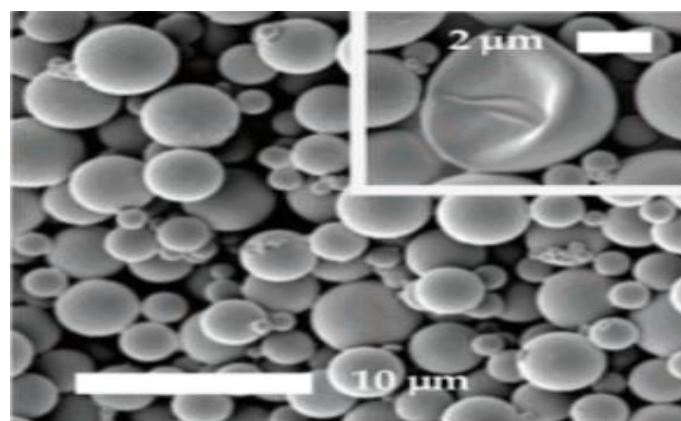
## VII.2. Structure interne

Les microparticules polymériques peuvent présenter principalement deux types de structures internes distinctes, comme le montre la figure 16 :



**Figure 16 :** Illustration schématique des différentes morphologies possibles des microparticules (Giraud, 2002).

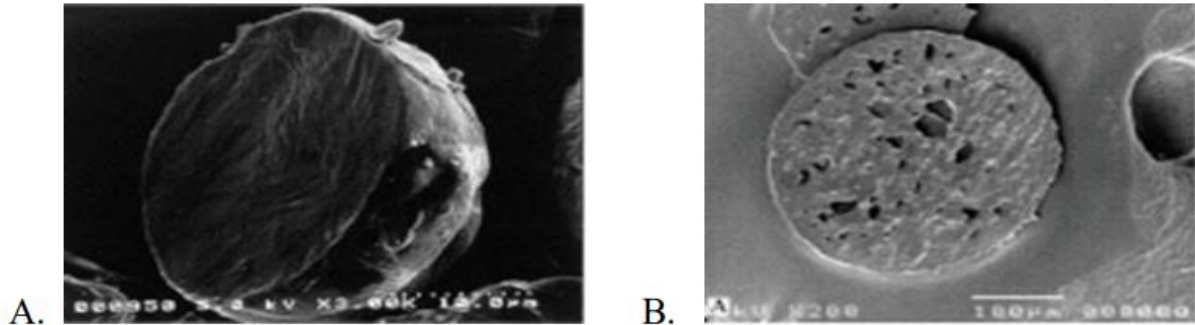
- **Les systèmes vésiculaires (microcapsules)** Les microcapsules sont des systèmes de type réservoir, composés d'un noyau - le plus souvent huileux - entouré d'une enveloppe polymérique. Cette structure permet d'emprisonner un principe actif pouvant être liquide, solide ou gazeux (Qv et al., 2011). Ces systèmes présentent des taux d'encapsulation particulièrement élevés, atteignant entre 85 et 90 % de la masse totale de la microparticule (Richard, 2000). Bien qu'on les représente souvent sous forme sphérique, les microcapsules peuvent également adopter une morphologie ovoïde.



**Figure 17 :** Photographie obtenue par MEB d'une solution de microcapsules (Pisani et al., 2006).

- Les systèmes matriciels (microsphères)

Les microsphères sont des systèmes de forme sphérique constitués d'une matrice polymérique ou lipidique continue, au sein de laquelle le principe actif (PA) est soit dissous, soit dispersé (Boukhouya, 2019). Le taux d'encapsulation, défini comme le rapport entre la masse de principe actif et la masse totale des microparticules, se situe généralement entre 20 % et 35 % (Benyahya et al., 2006).



**Figure 18** : Photographie obtenues par MEB : A. Microsphère ou le PA est dissout dans la matrice (Jeong et al., 2003) ; B. Microsphère ou le PA est dispersé dans la matrice (Yang et al., 2001)

### VII.3. Quantification de l'actif encapsulé

Le principe actif incorporé dans les microparticules peut être évalué à travers plusieurs paramètres (Gupta et al., 2001 ; Shu et al., 2006). Le plus couramment utilisé est le rendement d'encapsulation (également appelé *encapsulation yield* en anglais), qui se calcule selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'encapsulation} = \frac{\text{masse de microsphère obtenues en g}}{\text{masse de polymères} + \text{PA introduits en g}} \times 100$$

Il est aussi utilisé la teneur en principe actif (*loading* en anglais) ou taux d'encapsulation, qui est défini comme :

$$\text{Teneur en PA} = \text{Taux d'encapsulation} = \frac{\text{masse de PA encapsulé en g}}{\text{masse de particules en g}} \times 100$$

Enfin, l'efficacité d'encapsulation (encapsulation efficiency en anglais) est également un paramètre utilisé lors de la réalisation de microparticules :

$$\text{Efficacité} = \frac{\text{masse de PA encapsulé en g}}{\text{masse de PA introduit en g}} \times 100$$

### VIII. Matériaux utilisés pour l'encapsulation

Le choix d'un matériau d'enrobage adapté représente une étape essentielle dans le processus d'encapsulation. Cette sélection dépend de plusieurs facteurs : les propriétés souhaitées des microparticules (telles que la taille, la charge, la porosité, la dégradabilité, ou encore la résistance mécanique), les caractéristiques du principe actif à encapsuler (comme la solubilité, la polarité et la stabilité), ainsi que les conditions de libération ciblées (pH, température, force ionique) (Gharsallaoui et *al.*, 2007 ; Davidov-Pardo et *al.*, 2015).

Les propriétés intrinsèques du polymère utilisé - notamment sa non-toxicité, sa biodégradabilité, sa stabilité, ses aptitudes mécaniques et filmogènes, ainsi que son coût - sont des critères déterminants (Gharsallaoui et *al.*, 2007 ; Sharif et *al.*, 2017). Le polymère joue un rôle crucial dans la libération contrôlée de l'actif, en assurant qu'il soit délivré au bon site, à la concentration requise et pendant la durée souhaitée (Ma et *al.*, 2014).

Dans le secteur agroalimentaire, les polymères utilisés doivent figurer sur une liste d'additifs autorisés, être approuvés par des organismes tels que la FDA ou l'AFSSA, être comestibles, non réactifs, inodores ou au goût neutre, et présenter un coût raisonnable (Madene, 2006).

Le tableau ci-après présente les principaux polymères d'origine naturelle couramment utilisés en micro encapsulation dans l'industrie alimentaire.

**Tableau 9 :** Polymères naturels utilisés en micro-encapsulation dans le domaine d'alimentaire  
(Renard et Reddy, 2007).

Origine	polysaccharide	Protéine	Lipide
<b>Végétale</b>	Amidon	Gluten (blé)	Huile de palme hydrogénée  Huile de ricin hydrogénée  Lécithine (soja)  Cires
	Cellulose et dérivés		
	Pectine		
	Gomme arabique		
	Gomme caroube		
	Gomme guar		
<b>Marine</b>	Carraghénane		
	Alginate		
	Agarose		
<b>Microbienne ou animale</b>	Dextran	Caséines	
	Chitosan	Protéines de lactosérum	
	Gomme gellane	Collagène. Gélatine.	
	Gomme xanthane	Albumines	

Parmi tous les matériaux, les plus largement utilisés en micro-encapsulation dans le domaine agro-alimentaire sont :

### VIII.1. Polysaccharides

Les hydrocolloïdes de type polysaccharidique ont démontré leur efficacité dans le domaine de la microencapsulation, en particulier dans les procédés de séchage par atomisation des principes actifs (O'zğür et Mustafa, 2005 ; Madene, 2006).

Parmi les polysaccharides les plus utilisés dans l'industrie agroalimentaire, on retrouve l'amidon, les maltodextrines, la gomme arabique, le chitosane et la pectine. Ces matériaux présentent de nombreux avantages : une grande diversité, une bonne capacité de fixation des principes actifs, une faible viscosité même à haute concentration, une bonne solubilité dans l'eau et un coût relativement bas. Ils peuvent jouer un double rôle : servir de matrice d'encapsulation et agir comme agents stabilisants d'émulsions pour d'autres matériaux d'enrobage (Nesterenko, 2012).

#### a. Polysaccharides d'origine végétale

##### ▪ Amidon

L'amidon et ses dérivés (amidon modifié, cyclodextrines) sont largement utilisés dans le secteur agroalimentaire pour la protection et la rétention des composés volatils. Ils peuvent être employés à la fois comme matériaux d'encapsulation et comme agents stabilisants d'émulsion (Kerhaili, 2005 ; Shaikh et *al.*, 2006 ; Murúa-Pagola et *al.*, 2009).

De nombreuses recherches ont été menées pour améliorer les propriétés technologiques et fonctionnelles des amidons natifs. Ainsi, de nouveaux amidons ont été développés par modifications physiques ou chimiques telles que la réticulation, la stabilisation ou encore la pré-gélatinisation (Boutboul et *al.*, 2002).

##### ▪ Maltodextrines

Issues de l'hydrolyse acide ou enzymatique de l'amidon, les maltodextrines se distinguent par leur valeur en dextrose équivalent (DE), indicateur du degré d'hydrolyse des polymères d'amidon (Madene, 2006).

Selon Apintanapong et Noomhorm (2003), les maltodextrines offrent un bon compromis entre efficacité technologique et coût. Elles se caractérisent par une saveur douce, une faible viscosité même à forte teneur en matière sèche, et sont disponibles avec différentes masses molaires. Toutefois, leurs principales limites résident dans leur faible pouvoir émulsifiant et leur capacité limitée à conserver les composés volatils (Reineccius, 1991).

##### ▪ Gomme arabique

La gomme arabique est largement utilisée dans l'industrie agroalimentaire, notamment pour l'encapsulation des arômes. Elle est issue de l'exsudat de sève obtenu par incision du tronc ou des branches de certaines espèces d'Acacia, principalement Acacia senegal.

Elle se distingue par sa bonne solubilité, sa faible viscosité, ses propriétés émulsifiantes et sa capacité à stabiliser les composés volatils, ce qui la rend compatible avec la majorité des

techniques d'encapsulation. Toutefois, son coût élevé par rapport à la maltodextrine et la fluctuation de sa disponibilité limitent son usage industriel.

Pour surmonter cette contrainte, la gomme arabique est souvent combinée à la maltodextrine. De nombreuses études ont démontré l'efficacité de ce mélange dans la protection et la rétention des principes actifs encapsulés (Kenyon, 1995 ; Shiga et *al.*, 2001 ; Madene, 2006).

- **Pectine**

La pectine est un polysaccharide naturel extrait de différentes sources végétales telles que les pépins de tomates, les écorces d'agrumes, les pulpes de pommes ou encore les betteraves (Ridley et *al.*, 2001). Elle est constituée principalement d'une chaîne d'acides pectique et pectinique. Ce polymère est naturellement présent dans la paroi cellulaire des plantes, où il assure l'adhésion entre les cellules (Field, 2011).

D'après Oliveira et *al.* (2007), l'encapsulation de *Lactobacillus acidophilus* dans un lit fluidisé à base de pectine a permis de maintenir la viabilité des probiotiques jusqu'à 90 jours à 7 °C. Par ailleurs, plusieurs travaux (Cucheval, 2009 ; Marcela et *al.*, 2012 ; Benyahia et *al.*, 2016) ont mis en évidence le potentiel du complexe pectine-caséine comme biopolymère d'encapsulation. Ce complexe, biodégradable et sûr pour l'usage alimentaire, est formé par des interactions ioniques entre la pectine (chargée négativement à pH élevé) et la caséine (chargée positivement à un pH inférieur à son point isoélectrique).

## **b. Polysaccharides marins**

- **Alginate**

Les alginates, extraits principalement d'algues brunes, sont couramment utilisés comme agents épaississants, gélifiants, émulsifiants et stabilisants dans de nombreux produits industriels, notamment les gelées alimentaires ou les desserts lactés.

Ils sont également reconnus pour leur rôle de matrice dans l'encapsulation de principes actifs fragiles, tels que les médicaments, enzymes, microorganismes ou cellules (Draget et *al.*, 2011 ; Goh et *al.*, 2012).

Selon Krasaekoopt et *al.*, (2004) et Cheow et *al.*, (2013), l'encapsulation de probiotiques dans des billes d'alginate améliore significativement leur viabilité. De plus, elle permet une libération contrôlée de composés bioactifs, tels que les polyphénols comme la curcumine (Song et *al.*, 2012).

Généralement, les alginates sont associés à des ions calcium ou à d'autres biopolymères comme le chitosane, permettant la formation de matrices mixtes plus résistantes (Krasaekoopt et *al.*, 2006 ; Lopez et *al.*, 2013).

### c. Polysaccharides d'origine animale

#### ▪ Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire, souple, et structuré de manière similaire à la cellulose. Il est obtenu par N-déacétylation de la chitine, un polymère naturel abondant que l'on retrouve principalement dans les carapaces de crustacés comme les crabes et les crevettes (Muzzarelli, 2013).

Grâce à sa capacité à interagir avec divers composés et à former des gels, le chitosane est couramment utilisé comme matériau d'encapsulation permettant un relargage contrôlé des substances bioactives (Rinaudo, 2006 ; Pillai et *al.*, 2009).

Plusieurs études ont démontré ses atouts dans l'amélioration de la solubilité de composés lipophiles comme la lutéine (Hong et *al.*, 2016), ou encore dans la protection contre l'oxydation des antioxydants présents dans le thé vert (Sabaghi et *al.*, 2015) ou des catéchines extraites du Gambier (Kailaku et *al.*, 2014).

Le chitosane peut également être combiné à d'autres biopolymères pour améliorer l'efficacité des matrices d'encapsulation. Des associations efficaces ont été observées avec :

- Des polysaccharides comme l'alginate (Krasaekoopt et *al.*, 2006 ; Zou et *al.*, 2011) et l'amidon (Khosravi et *al.*, 2014),
- Ou des protéines, notamment les protéines sériques telles que la  $\beta$ -lactoglobuline (Ha et *al.*, 2013) ou les caséines sous forme de caséinate (Anal et *al.*, 2008).

Ces combinaisons permettent la formation de matrices d'encapsulation mixtes, plus performantes et adaptées à une large gamme d'applications dans les domaines alimentaire, pharmaceutique et nutraceutique.

## VIII.2. Protéines

Les protéines animales, telles que la caséine, ont été largement étudiées et ont démontré leur efficacité, notamment en raison de leur meilleure solubilité à un large éventail de pH comparativement aux protéines végétales. De plus, leur flexibilité les rend capables de se diffuser plus rapidement à l'interface avec la matière active, ce qui contribue à une meilleure stabilisation (Can Karaca *et al.*, 2015). Bien que les protéines animales possèdent des qualités nutritionnelles supérieures, les protéines végétales peuvent constituer une alternative viable. Elles présentent plusieurs avantages, tels que leur coût réduit, l'absence de risques sanitaires et leur disponibilité en grandes quantités (Renard et Reddy, 2007 ; Vandamme *et al.*, 2007).

### a) Protéines végétales

- **Protéines de soja**

Les protéines de soja sont actuellement l'une des protéines végétales les plus étudiées, principalement parce qu'elles sont extraites d'une ressource abondante, peu coûteuse et renouvelable, et qu'elles contiennent une quantité importante de protéines (35 à 45 %) (Pastor-Cavada *et al.*, 2010 ; Huang *et al.*, 2012). Ces protéines sont principalement constituées de glycidine et de conglycine, et une fois isolées et purifiées, elles présentent une relative hydrophilie, ainsi que des propriétés gélifiantes, émulsifiantes et tensioactives, idéales pour la microencapsulation. Cela a été démontré par de nombreuses études, qui montrent la capacité des isolats protéiques de soja à encapsuler une grande variété de matières actives (Nesterenko *et al.*, 2013 ; Sharif *et al.*, 2017). Ces protéines sont aujourd'hui considérées comme l'une des meilleures alternatives aux protéines laitières dans ce domaine (Tang et Li, 2013). Les isolats protéiques de soja (ISP) sont utilisés pour l'encapsulation de substances actives hydrophobes comme les huiles, les phospholipides, le tocophérol, et la propolis (Nori *et al.*, 2011 ; Nesterenko *et al.*, 2014 ; Liu *et al.*, 2014 ; Tambade *et al.*, 2020), ainsi que pour des actifs hydrophiles comme les hydrolysats de caséine ou l'acide ascorbique (Mendanha *et al.*, 2009 ; Nesterenko *et al.*, 2014).

- **Protéines de pois**

Les extraits de protéines de pois sont reconnus pour leurs propriétés gélifiantes et interfaciales (Akintayo *et al.*, 1999 ; Raymundo *et al.*, 2005), ainsi que pour leur faible caractère allergène comparé à d'autres sources de protéines végétales (Ducel *et al.*, 2004).

Cependant, dans le domaine de la microencapsulation, les protéines de pois ont d'abord été utilisées principalement en combinaison avec différents polysaccharides tels que la maltodextrine, l'amidon ou la pectine. Ce n'est que récemment qu'elles sont considérées comme un matériau d'enrobage unique. La méthode d'atomisation est généralement utilisée pour ces protéines (Tamm *et al.*, 2016).

- **Protéines de lentille et pois chiche**

Les isolats de protéines de lentille et de pois chiche ont montré leur efficacité comme matériau d'enrobage pour l'encapsulation, en raison de leurs propriétés tensioactives et émulsifiantes (Can Karaca *et al.*, 2011 ; Joshi *et al.*, 2012). Avramenko et Karaca (Karaca *et al.*, 2013 ; Avramenko *et al.*, 2016) ont encapsulé de l'huile de lin à l'aide de protéines de lentille et de pois chiche, combinées à des maltodextrines, l'un par gélification à froid (Avramenko *et al.*, 2016) et l'autre par atomisation (Karaca *et al.*, 2013). Les rendements d'encapsulation obtenus sont très satisfaisants, atteignant environ 60 % par gélification à froid et plus de 80 % par atomisation. Quel que soit le procédé, l'encapsulation avec des isolats protéiques a permis de protéger l'huile contre l'oxydation lors du stockage à température ambiante.

- **Protéines de maïs**

La teneur en protéines des grains de maïs varie entre 6 et 12 %, et les deux principales fractions protéiques sont la zéine et la glutéline. La zéine, une protéine de réserve appartenant aux prolamines spécifiques aux céréales, est largement utilisée dans l'industrie alimentaire en raison de ses propriétés antimicrobiennes et gélifiantes (Shukla et Cheryan, 2001). Plusieurs études (Xue *et al.*, 2013 ; Xu et Zhang, 2014 ; Cheng et Jones, 2017) ont démontré l'intérêt de la zéine comme matériau d'enrobage, en particulier dans les applications alimentaires.

- **Protéines de blé et d'orge**

Le blé et l'orge contiennent tous deux du gluten, un mélange protéique obtenu à partir de la farine après extraction de l'amidon. Le gluten de blé est composé principalement de la gliadine et de la gluténine, tandis que le gluten d'orge est constitué de glutéline et d'hordéine (Bietz, 1970 ; Wang *et al.*, 2011). Ces deux types de gluten possèdent d'excellentes propriétés gélifiantes, émulsifiantes et filmogènes (Sun *et al.*, 2009), ce qui en fait des matériaux de choix pour la microencapsulation. La gliadine et, plus généralement, le gluten de blé a été étudiés dans le domaine de la microencapsulation depuis plusieurs années, d'abord en combinaison avec des

polysaccharides (Ducel et *al.*, 2004 ; Ducel et *al.*, 2005), puis plus récemment en tant que matériau d'enrobage unique (Liao et *al.*, 2012), tout comme le gluten d'orge (Wang et *al.*, 2011).

- **Protéines de tournesol**

Dans le domaine de la micro encapsulation, les isolats protéiques de tournesol ont montré des performances intéressantes, notamment pour l'encapsulation de principes actifs hydrophobes par atomisation. Des taux d'encapsulation élevés ont été obtenus, avec une efficacité supérieure à celle des protéines de soja. Toutefois, en raison de la difficulté à trouver des isolats protéiques commerciaux, ces protéines ne sont pas encore largement utilisées dans le secteur alimentaire (Nesterenko et *al.*, 2013 ; Nesterenko et *al.*, 2014).

- **Protéines de colza**

Le tourteau de colza, un sous-produit de l'extraction des huiles végétales, contient une fraction protéique composée principalement de globulines et d'albumines (Chabanon et *al.*, 2007). Ces protéines ont montré d'excellentes propriétés fonctionnelles, notamment émulsifiantes, gélifiantes et filmogènes (Dong et *al.*, 2011 ; Rodrigues et *al.*, 2012). Wang et *al.*, (2015) ont démontré que ces isolats protéiques pouvaient être utilisés comme matériau d'enrobage pour la fabrication de microparticules de peptides par atomisation, avec des rendements satisfaisants et des taux d'encapsulation variant entre 87 et 95 %. Les protéines de colza représentent ainsi un matériau d'enrobage efficace et peu coûteux pour des applications en micro encapsulation, notamment dans le domaine alimentaire.

## **b) Protéines animale**

Les protéines animales sont bien établies dans l'industrie alimentaire. Parmi les protéines couramment utilisées, on trouve l'albumine de sérum bovin, les protéines d'œufs, le collagène, la gélatine, la caséine et les protéines de lactosérum (Davidov-Pardo et *al.*, 2015). Cependant, ces protéines présentent certains inconvénients, tels que :

- Leur coût plus élevé par rapport aux protéines végétales ;
- Un risque de contamination, notamment des maladies comme l'encéphalopathie spongiforme bovine ;

- Des restrictions d'utilisation alimentaires (régimes végétariens) et culturelles. C'est pourquoi l'intérêt pour les protéines végétales comme matériau d'enrobage en microencapsulation a considérablement augmenté (Davidov-Pardo et al., 2015).

- **Gélatine**

La gélatine est obtenue par hydrolyse partielle du collagène contenu dans les os et la peau des animaux (Johnston-Banks, 1990). Elle est classée parmi les additifs alimentaires en tant que stabilisant, gélifiant, émulsifiant, épaississant et support d'additifs (FAO et OMS, 1995), et est utilisée pour stabiliser les mousses dans les produits laitiers (Duquenne et al., 2016). Selon une étude de Thompson (2003), l'encapsulation de la curcumine par la gélatine permet de préserver son activité antioxydante et d'augmenter sa concentration dans l'eau, ainsi que son activité antimicrobienne contre *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *S. aureus* et *E. coli*.

- **Caséines**

Les caséines, en particulier la caséine  $\alpha_1$ , présentent une forte teneur en proline, ce qui leur confère un caractère hydrophobe marqué. Cette propriété favorise leur auto-assemblage et leur permet d'interagir efficacement avec des composés bioactifs hydrophobes comme la curcumine, renforçant ainsi la stabilité de ce polyphénol (Sneharani et al., 2009). Par ailleurs, cette interaction contribue à protéger les bioactifs thermosensibles contre les températures élevées (Yong et al., 2010). La caséine  $\alpha_1$  peut également stabiliser d'autres polyphénols, tels que la génistéine de soja et le resvératrol (Bourassa et al., 2013).

La caséine  $\beta$ , quant à elle, contient deux résidus de tryptophane qui facilitent les interactions hydrophobes avec divers bioactifs, en particulier les polyphénols. Elle a démontré une meilleure capacité de stabilisation de la curcumine, du resvératrol et de la génistéine de soja comparée à la caséine  $\alpha_1$  (Bourassa et al., 2013). D'après Forrest et al. (2005), la caséine  $\beta$  peut également interagir avec la vitamine D via des interactions hydrophobes.

Les caséinates, dérivés de la solubilisation des caséines dans des milieux basiques, font également l'objet de nombreuses études. Ils peuvent interagir avec la vitamine D (Semo et al., 2007) et sont largement utilisés comme agents d'encapsulation et de stabilisation dans les émulsions directes (Day et al., 2007 ; Nielsen et al., 2009). Leur efficacité a été démontrée pour protéger l'huile de poisson contre l'oxydation (Nielsen et al., 2009 ; Kosaraju et al., 2009). Par ailleurs, en se liant aux oligosaccharides par conjugaison, les caséinates forment une matrice efficace pour l'encapsulation de probiotiques tels que *Bifidobacterium* et *Lactobacillus casei*, assurant leur protection contre la digestion gastrique et permettant leur libération ciblée au niveau intestinal (Crittenden et al., 2006 ; Nag et al., 2011).

- **Protéines sériques**

La  $\beta$ -lactoglobuline est largement reconnue comme une matrice efficace pour l'encapsulation de composés bioactifs hydrophobes, tels que les arômes, les vitamines, les acides gras (Loch et *al.*, 2013), ainsi que certains polyphénols comme les catéchines (Zorilla et *al.*, 2011). Selon Liang et *al.* (2010), elle permet également l'encapsulation de l'acide folique, en réduisant sa photo-dégradation. Elle améliore par ailleurs la photo-stabilité et la solubilité de composés sensibles tels que le resvératrol (Liang et *al.*, 2008) et l' $\alpha$ -tocophérol (Liang et *al.*, 2011 ; Relkin et *al.*, 2012).

L' $\alpha$ -lactalbumine, autre protéine sérique d'intérêt, a également été identifiée comme une bonne matrice pour l'encapsulation de bioactifs. Elle interagit notamment avec des composés lipophiles comme l'acide palmitique et le rétinol (Considine et *al.*, 2014). Son hydrolyse enzymatique permet la formation de nanotubes auto-assemblés, plus rigides que la protéine native, et résistants aux procédés thermiques tels que la pasteurisation et la lyophilisation (Graveland-Bikker et *al.*, 2006).

Les concentrés protéiques de lactosérum (WPC) sont couramment utilisés dans l'industrie alimentaire pour l'encapsulation. Ils améliorent, par exemple, la stabilité de l' $\alpha$ -tocophérol au cours du stockage (Relkin et *al.*, 2012). Les WPC sont aussi capables d'encapsuler des huiles essentielles comme celles d'origan, ainsi que des arômes provenant de la citronnelle, de la marjolaine (Baranauskienė et *al.*, 2006), ou encore d'arômes acides comme celui du sumac (Bayram et *al.*, 2008). Grâce à leur aptitude à former des hydrogels, ils peuvent encapsuler des molécules hydrophobes telles que la caféine, en la protégeant des effets du séchage et de la lyophilisation (Gunasekaran et *al.*, 2006). L'encapsulation du  $\beta$ -carotène dans les WPC permet également d'en améliorer la stabilité face à l'oxydation (López-Rubio et *al.*, 2012).

Les isolats de protéines de lactosérum (WPI) représentent quant à eux des matrices d'encapsulation particulièrement performantes dans le domaine laitier. Ils permettent notamment de stabiliser et de retenir efficacement les arômes volatils, comme l'hexanoate d'éthyle (Giroux et *al.*, 2011). De plus, ils protègent les lipides contre l'oxydation, tels que les huiles d'orange (Kim et *al.*, 1996), de lin (Partanen et *al.*, 2008), d'avocat (Bae et *al.*, 2008), de gingembre (Toure, 2007), ou encore l'huile de pépins de grenade (Comunian et *al.*, 2020). L'encapsulation de la curcumine via les WPI, grâce à des interactions hydrophobes, améliore sa stabilité et préserve son activité antioxydante face aux procédés de séchage (Liu et *al.*, 2016).

### VIII.3. Lipides

Une grande variété de lipides, tels que les graisses, les huiles, les glycérides, les phospholipides, les glycolipides et les cires, peuvent être utilisés comme matériaux d'enrobage dans les procédés de micro encapsulation (Eldem et *al.*, 1991 ; Muller et *al.*, 2002). Les lipides tels que les triglycérides, les caroténoïdes et les phytostérols sont capables de former une barrière protectrice autour des molécules bioactives lipophiles. Cette barrière permet non seulement de préserver les composés sensibles de l'humidité, mais aussi de faciliter leur transport dans un milieu aqueux (McClements et *al.*, 2007).

Certains lipides amphiphiles, comme les glycérides, les phospholipides et les glycolipides, présentent en outre la capacité de stabiliser les émulsions. Ils peuvent induire l'auto-assemblage moléculaire en structures supramoléculaires, ce qui renforce leur utilité dans l'encapsulation de composés bioactifs (Augustin et *al.*, 2009).

### VIII.4. Levures

L'utilisation des levures comme matrices d'encapsulation a été explorée dès les années 1970, avec une première étude réalisée par Shank (1976) sur leur application potentielle pour encapsuler des composés lipophiles. Depuis, de nombreuses recherches ont démontré la capacité des levures à stabiliser les molécules bioactives durant le stockage, même sous des conditions défavorables telles qu'une forte humidité ou des températures élevées (Bishop et *al.*, 1998 ; Pedrini et *al.*, 2014).

Parmi les espèces utilisées, *Saccharomyces cerevisiae* est la plus couramment employée dans le domaine alimentaire. Sa structure cellulaire permet l'encapsulation efficace de biomolécules (Pham-Hoang et *al.*, 2013). Le processus implique généralement une autolyse préalable des cellules pour les vider de leur contenu, avant l'introduction des composés bioactifs (Bishop et *al.*, 1998).

Par ailleurs, plusieurs études (Bishop et *al.*, 1998 ; Shi et *al.*, 2007 ; Shi et *al.*, 2008) ont mis en évidence l'efficacité de cette matrice dans l'encapsulation d'antioxydants hydrophiles, d'acides chlorogéniques et de resvératrol, contribuant ainsi à améliorer leur stabilité face aux conditions extrêmes de température et de pression.

Plus récemment, Fábio et *al.* (2019) ont montré que la curcumine encapsulée dans *Saccharomyces cerevisiae* conservait plus de 80 % de son activité antioxydante après un traitement thermique à 150 °C, et plus de 70 % après 50 jours d'exposition à une lumière artificielle.

## IX. Technique d'encapsulation des probiotiques

Face aux conditions environnementales défavorables, de nombreuses stratégies ont été explorées pour améliorer la viabilité des probiotiques dans les matrices alimentaires ainsi que leur survie tout au long du transit gastro-intestinal. Cependant, les résultats obtenus jusqu'à présent sont restés limités (Gardiner et *al.*, 2002).

Parmi les approches les plus prometteuses, la technique d'encapsulation suscite actuellement un vif intérêt. Elle permet d'augmenter la résistance des bactéries probiotiques, tant dans les aliments vecteurs que dans le système digestif humain (Afzaal et *al.*, 2019).

Ce procédé repose sur l'immobilisation des cellules probiotiques dans une matrice polymérique, formant ainsi une barrière protectrice contre les facteurs environnementaux néfastes. Cette barrière est conçue de manière à ne pas altérer les fonctions physiologiques des bactéries vivantes (Chang, 1999).

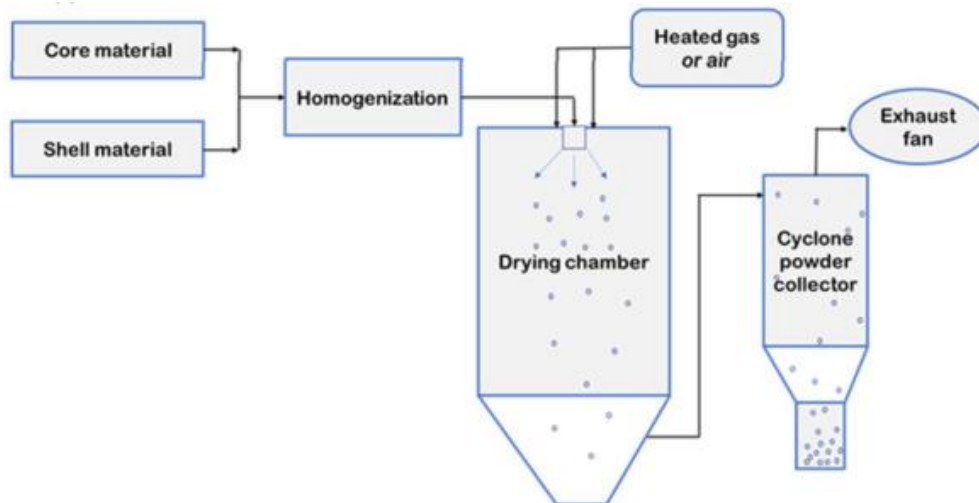
Pour qu'une encapsulation soit jugée efficace, elle doit répondre à plusieurs critères essentiels. Il est notamment nécessaire de prendre en compte le type de souche bactérienne, les conditions de vie et de croissance, la nature et la taille du support, le choix du matériau d'enrobage, la stabilité de la matrice, la cinétique de transfert de masse, ainsi que le mécanisme de libération ciblée au sein de l'organisme.

### IX.1. Techniques les plus importantes utilisées pour l'encapsulation des cellules probiotiques

#### a. Séchage par pulvérisation

Le séchage par pulvérisation (ou atomisation) constitue l'une des techniques les plus couramment utilisées pour l'encapsulation des probiotiques à l'échelle industrielle. Dans ce procédé, les cellules bactériennes sont d'abord dispersées dans une solution contenant le matériau d'enrobage, formant une émulsion ou une suspension homogène. Cette dispersion est ensuite pulvérisée à l'aide d'un atomiseur à l'intérieur d'une chambre chauffée, où elle entre en contact avec un flux d'air chaud. Ce contact provoque une évaporation instantanée de l'eau, conduisant à la formation de microcapsules sèches contenant les bactéries.

L'efficacité de l'encapsulation ainsi que la taille des particules obtenues dépendent de plusieurs paramètres. Ces derniers incluent les conditions de séchage (type d'atomiseur, débit de pulvérisation, humidité relative dans la chambre, températures d'entrée et de sortie), ainsi que les caractéristiques physico-chimiques de la dispersion initiale (nature et concentration des probiotiques et du matériau de paroi, viscosité de la solution, etc.) (Jafari et *al.*, 2008).



**Figure 19** : Schéma représentant la méthode de séchage par pulvérisation (Ozdal et *al.*, 2020).

### b. Refroidissement par pulvérisation

Le refroidissement par pulvérisation, également appelé congélation par pulvérisation, est une technique semblable au séchage par pulvérisation, à la différence près que l'atomisation de la dispersion contenant l'ingrédient bioactif et le matériau de support s'effectue dans une chambre à air froid ou dans de l'azote liquide (Ilic et *al.*, 2009). L'utilisation de températures très basses permet de solidifier rapidement les gouttelettes, formant ainsi des particules encapsulées par congélation. Cette méthode est économiquement avantageuse et facilement transposable à l'échelle industrielle. Toutefois, comparée au séchage par pulvérisation, elle présente une efficacité d'encapsulation généralement plus faible.

### c. L'émulsification

L'émulsification est une technique d'encapsulation à basse température, particulièrement adaptée à la co-encapsulation de probiotiques. Cette méthode, relativement simple à mettre en œuvre, permet d'améliorer significativement le taux de survie des bactéries encapsulées. Elle repose sur la formation d'une émulsion de type eau-dans-huile (W/O), dans laquelle les cellules probiotiques sont dispersées dans la phase aqueuse, puis stabilisées dans une matrice polymérique.

L'un des principaux inconvénients de cette technique réside dans la variabilité des tailles et des formes des microcapsules obtenues. Toutefois, cette hétérogénéité peut être contrôlée en ajustant des paramètres tels que le rapport eau/huile et la vitesse d'agitation (Kailasapathy, 2009).

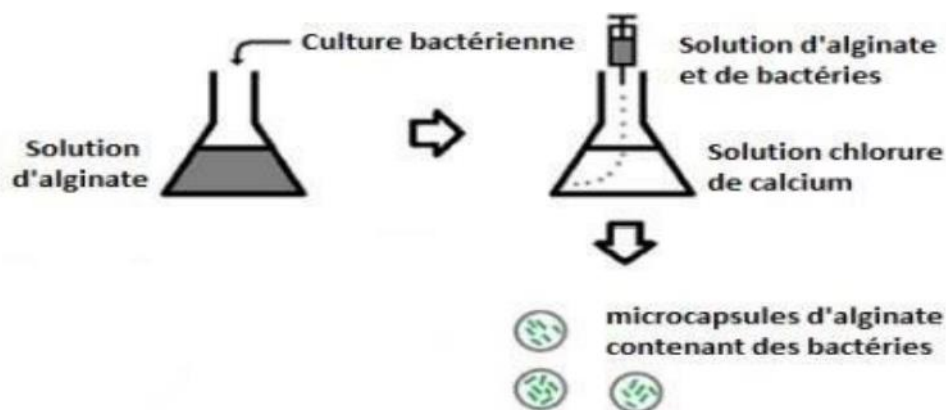
Trois principales variantes de la technique d'émulsification sont utilisées pour l'encapsulation des probiotiques (Burgain et *al.*, 2011) :

- ✓ L'émulsification suivie de la **gélification ionique** ;
- ✓ L'émulsification couplée à une **gélification enzymatique** ;
- ✓ L'émulsification suivie d'une **polymérisation interfaciale**.

#### d. Extrusion

L'extrusion est une méthode d'encapsulation simple, économique et réalisée dans des conditions douces, ce qui la rend particulièrement adaptée à l'encapsulation des cellules probiotiques. Elle repose sur la formation de gouttelettes contenant les probiotiques, qui sont extrudées à travers une buse dans un bain de gélification (souvent une solution de calcium dans le cas de l'alginate), où elles forment des microbilles sphériques.

Bien que cette technique offre une bonne viabilité cellulaire et une excellente protection des probiotiques contre les conditions environnementales défavorables, son principal inconvénient réside dans sa faible productivité. En effet, le processus de formation des microbilles est relativement lent, ce qui limite son application pour la production à grande échelle (Burgain et *al.*, 2011).

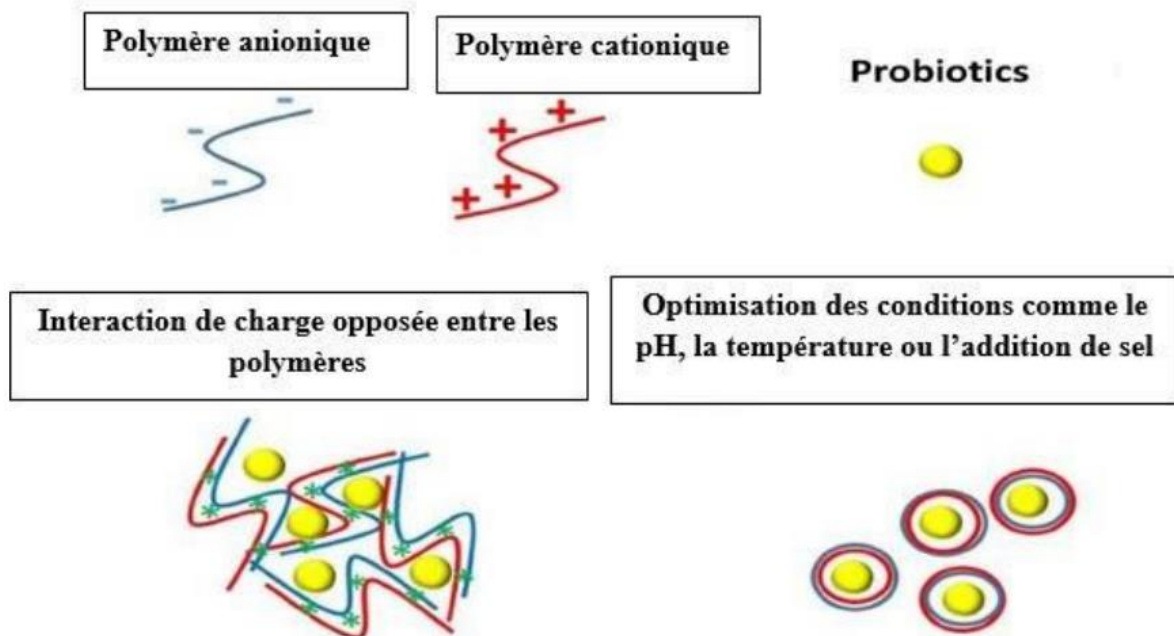


**Figure 20** : Schéma représentant la technique d'extrusion (Cook et *al.*, 2012)

## IX.2. Technique de coacervation dans l'encapsulation des probiotiques

La coacervation est une technique d'encapsulation reposant sur les interactions électrostatiques entre des biopolymères portant des charges opposées. Selon Ghasmi et *al.*, (2017), ce procédé consiste à induire une désolvation partielle ou totale d'un ou de plusieurs polymères présents en solution, en modifiant les propriétés du solvant ou la charge des polymères.

Plusieurs paramètres peuvent être ajustés pour influencer la solubilité et favoriser la formation de coacervats : le pH, la concentration en polymères, la force ionique, la température ou encore l'ajout d'un non-solvant (Giraud, 2002). Cette technique permet de former une matrice polymérique autour des probiotiques, les protégeant ainsi des agressions environnementales et améliorant leur stabilité.



**Figure 21** : Schéma représentatif de la coacervation complexe des probiotiques (Ghasmi et *al.*, 2017)

Ce phénomène entraîne la séparation du système en deux phases distinctes :

- Une phase dense en coacervats, riche en polymères,
- Et une phase surnageante, majoritairement composée de solvant.

Les coacervats se déposent autour de l'ingrédient actif, formant ainsi une couche protectrice continue qui agit comme une barrière contre les facteurs environnementaux (Burgain et *al.*, 2016).

Il existe deux principaux types de coacervation :

- **La coacervation simple** : elle repose sur l'interaction électrostatique entre un composé actif chargé et un biopolymère de charge opposée.
- **La coacervation complexe** : elle implique l'interaction de deux biopolymères de charges opposées, utilisés comme matériaux de support, autour des composés bioactifs (Rashidinejadetal.,2020).

## ***Chapitre III : Matériels & méthodes***

L'étude des bactéries lactiques d'intérêt probiotique nécessite la mise en œuvre de méthodes rigoureuses afin de garantir la validité des résultats obtenus. Ces micro-organismes, largement utilisés dans les domaines agroalimentaire et biomédical, sont évalués selon plusieurs critères technologiques et fonctionnels, tels que leur capacité d'adhésion, leur résistance à des conditions environnementales stressantes, ou encore leur stabilité au cours du stockage.

Dans ce contexte, ce chapitre décrit l'ensemble des moyens matériels et des protocoles expérimentaux adoptés pour l'isolement, l'identification, l'évaluation des caractéristiques probiotiques et la formulation des souches bactériennes sélectionnées. Une attention particulière a été accordée à la normalisation des conditions expérimentales, afin d'assurer la reproductibilité et la précision des résultats.

### I. Présentation du lieu et durée de travail

Le présent travail a été réalisé au sein du laboratoire de biologie moléculaire de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, situé sur le site ITA. Les différentes étapes expérimentales, allant de la préparation des milieux à l'encapsulation des bactéries lactiques, ont été effectuées sur une période de cinq mois, entre février et juin 2024.

### II. Objectif du travail

Ce travail vise à encapsuler des souches de bactéries lactiques afin d'évaluer leur viabilité, leur stabilité, ainsi que certaines de leurs propriétés probiotiques, en utilisant des techniques appropriées de culture, de caractérisation et d'encapsulation.

### III. Les bactéries lactiques

**Tableau 10** : Les souches lactiques utilisées

Abréviation	Nom de la souche	Code de la souche
<b>LGG</b>	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	/
<b>DC01</b>	<i>Levilactobacillus brevis</i>	PP709510
<b>DC04</b>	<i>Lactiplantibacillus plantarum subsp</i>	OP003879
<b>TF03</b>	<i>Levilactobacillus brevis</i>	OR856558

HM7	<i>Levilactobacillus brevis</i> strain	CP010525
KL14	<i>Levilactobacillus brevis</i> strain	/

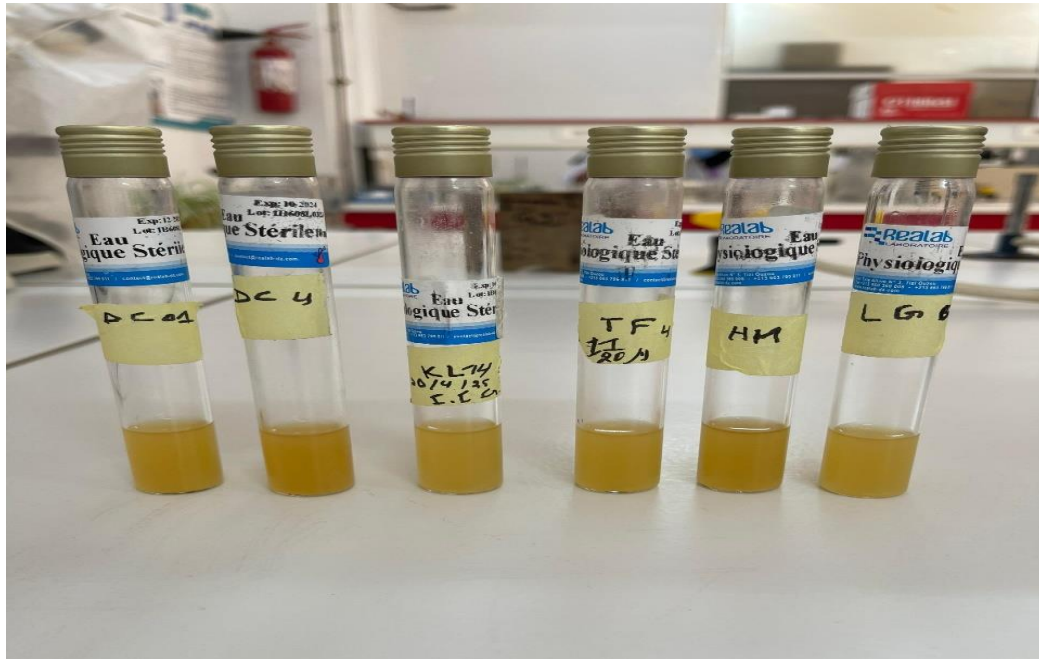


Figure 22 : Les souches bactériennes utilisées

#### IV. Matériels de laboratoire et milieux de culture

##### ➤ Matériels utilisés

##### 1. Matériels de base et équipements spécifiques

- **Anse de platine** : utilisée pour l'ensemencement et le transfert aseptique des cultures bactériennes.
- **Autoclave** : permet la stérilisation du matériel et des milieux à l'aide de chaleur humide sous pression.
- **Bain-marie** : utilisé pour maintenir certaines solutions à température constante, en surfusion.
- **Bec Bunsen** : génère une flamme bleue créant une zone stérile circulaire de 15 à 20 cm pour les manipulations aseptiques.
- **Pailasse de laboratoire** : surface de travail facile à désinfecter, utilisée pour les opérations microbiologiques.
- **Réfrigérateur** : destiné à la conservation des souches, milieux de culture et échantillons à basse température.
- **Étuve** : utilisée pour l'incubation des cultures à température contrôlée (ex. : 37 °C).

- **pH-mètre** : permet la mesure précise du pH des milieux et solutions.
- **Plaque chauffante** : sert à chauffer ou maintenir à température constante certaines préparations.
- **Spectrophotomètre** : mesure la densité optique (DO), utilisée pour estimer la concentration cellulaire.
- **Vortex** : utilisé pour homogénéiser rapidement les échantillons.
- **Balance de précision** : pour peser avec exactitude les composants des milieux de culture ou réactifs.
- **Centrifugeuse** : permet de récolter les cellules ou de séparer les phases par sédimentation.

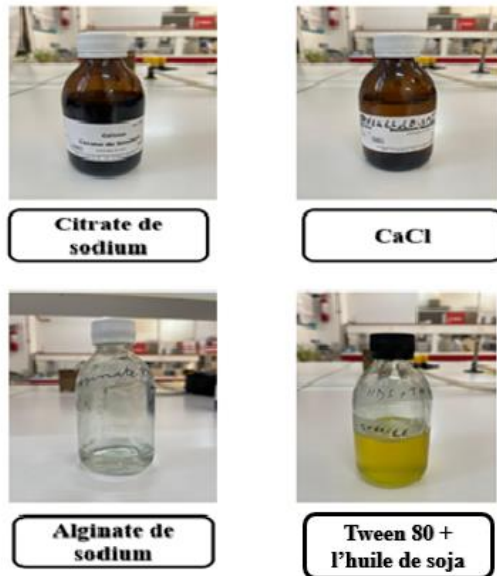
## 2. Verrerie et consommables de laboratoire

- **Béchers** : de différentes capacités (20 ml, 80 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml) pour la préparation et le mélange des solutions.
- **Boîtes de Pétri** : en plastique, utilisées pour les cultures sur gélose.
- **Erlenmeyers** : pour les cultures liquides ou le mélange de solutions.
- **Flacons en verre** (180 ml) : pour la conservation de solutions ou de cultures.
- **Flacons Schott** (250 ml) : résistants à la chaleur, pour les préparations stériles ou stockages.
- **Éprouvettes graduées** : (10 ml, 50 ml, 100 ml) pour la mesure des volumes.
- **Pipettes graduées** : (1 ml, 5 ml, 10 ml, etc.) pour les transferts précis de liquides.
- **Pipettes Pasteur** : pour les petits volumes et manipulations délicates.
- **Embouts pour micropipettes** : compatibles avec différentes capacités.
- **Tubes à essai** : pour les cultures, réactions ou centrifugations.
- **Tubes Eppendorf** : pour les petites quantités, centrifugation ou stockage.
- **Seringues** : (5 ml, 10 ml) utilisées pour les prélèvements ou injections de solutions.
- **Entonnoir** : pour faciliter les transferts de liquides ou de poudres dans les récipients étroits.

### ➤ Les milieux de cultures utilisés

- Bouillon MRS (De Man, Rogosa et Sharpe)
- Gélose MRS (De Man, Rogosa et Sharpe)
- Bouillon TSB (Tryptic Soy Broth)
- Gélose TSB (Tryptic Soy Broth)

- **Les produits tampons**
  - PBS (Tampon Phosphate Saline)
  - Eau physiologique 0,9 % NaCl
- **Les produits chimiques et autre**



**Figure 23 :** Les produits chimiques utilisés



**Figure 24 :** L'huile de soja

- **Les colorants**

- Violet de gentiane
- Lugol
- Safranine
- Alcool

## V. Méthodes d'analyses

### V.1. Revivification des souches

- Les souches bactériennes (LGG, DC01, DC04, TF03, HM, KL14), initialement conservées sur gélose inclinée à 4 °C, sont réactivées par ensemencement dans un bouillon MRS, suivi d'une incubation à 37 °C pendant 24 heures.
- Une fois la turbidité observée, indiquant une croissance bactérienne, une boucle d'inoculum est prélevée et ensemencée sur des boîtes de gélose MRS.
- Ces boîtes sont ensuite incubées à 37 °C durant 24 heures.
- Après développement des colonies, les boîtes sont conservées au réfrigérateur à 4 °C en attendant leur utilisation pour les différentes analyses.

## V.2. Vérification de la pureté des souches

### V.2.1. Observation microscopique

Les colonies obtenues sont observées au microscope optique afin d'évaluer leur morphologie (forme, disposition, taille), permettant ainsi de confirmer l'uniformité des souches isolées.

### V.2.2. Test de la catalase

- Ce test permet de vérifier l'absence de l'enzyme catalase, caractéristique des bactéries lactiques, qui sont catalase-négatives.
- Une colonie est prélevée et déposée sur une lame propre.
- Une goutte de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est ensuite ajoutée.
- L'absence de formation de bulles (absence d'effervescence) confirme une réaction négative, donc l'absence de l'enzyme catalase, ce qui soutient l'appartenance des souches au groupe des bactéries lactiques.

### V.2.3. Coloration de Gram

La coloration de Gram est réalisée afin de distinguer les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif, selon la structure de leur paroi cellulaire.

#### a) Étapes

- Une goutte d'eau stérile est déposée au centre d'une lame propre.
- Une colonie de chaque souche est prélevée, puis homogénéisée dans la goutte d'eau et étalée sur la surface de la lame pour former un frottis.
- Le frottis est fixé par un passage rapide à la flamme d'un bec Bunsen.
- La lame est placée sur un support adapté à la coloration.

#### b) Coloration

- La lame est recouverte de violet de gentiane pendant 1 minute, puis rincée à l'eau pour éliminer l'excès de colorant.
- Elle est ensuite recouverte de lugol (mordant) pendant 1 minute, puis rincée de nouveau à l'eau.
- Une décoloration rapide est réalisée avec une solution alcool/acétone pendant 10 secondes.
- Après rinçage, la lame est colorée avec de la safranine pendant 1 minute.
- Un dernier rinçage est effectué pour éliminer le colorant, puis la lame est laissée à sécher à l'air libre ou délicatement avec du papier absorbant.

**c) Observation**

L'examen microscopique est réalisé à l'objectif  $\times 100$  à immersion. Les bactéries à Gram positif apparaissent violettes, tandis que celles à Gram négatif apparaissent roses.

**V.3. Préparation de la suspension bactérienne**

- Pour chaque expérience, les colonies des souches KL14, TF03, DC01, DC04, LGG et HM, préalablement conservées, sont réensemencées dans du bouillon MRS et incubées à 37 °C pendant 18 heures afin d'obtenir une culture fraîche et active.
- Les cultures obtenues sont ensuite centrifugées deux fois à 6000 tours/min pendant 15 minutes à 4 °C, après resuspension dans une solution tampon PBS (phosphate-buffered saline) pour éliminer les résidus de milieu.



**Figure 25 :** Centrifugeuse à 6000 tours/min à 4°C

- La densité optique (DO) de la suspension est ajustée à 0,5 à 600 nm, à l'aide de dilutions successives dans l'eau physiologique, afin de normaliser la concentration en cellules pour les étapes suivantes.

À partir de la suspension bactérienne préparée, une série de tests a été menée afin d'évaluer certaines propriétés fonctionnelles des souches étudiées, notamment leur capacité d'auto-agrégation, leur sensibilité à l'autolyse et leur affinité aux solvants (test MATS) :

### V.3.1. Test d'auto-agrégation

Le test d'auto-agrégation permet d'évaluer la capacité des bactéries à s'agréger entre elles lorsqu'elles sont en suspension aqueuse. Cette propriété est considérée comme un indicateur clé de leur aptitude à coloniser la muqueuse intestinale, car une forte auto-agrégation peut favoriser l'adhésion aux cellules épithéliales et l'exclusion compétitive des pathogènes. Cette méthode repose généralement sur une mesure spectrophotométrique de la diminution de la turbidité au fil du temps. Elle est fréquemment utilisée dans la sélection de souches probiotiques prometteuses (Jang *et al.*, 2021).

➤ **Protocole :**

- Centrifuger les souches bactériennes à 6000g pendant 15 minutes à 4 °C.
- Laver le culot deux fois à l'aide d'une solution tampon PBS.
- Remettre les bactéries en suspension dans le PBS jusqu'à obtenir une densité optique (DO) de 0,5 à 600 nm.
- Incuber la suspension à température ambiante sans agitation.
- Mesurer l'absorbance à 600 nm à temps initial (0 h) et après 24 heures d'incubation.



**Figure 26 :** Préparation du matériel pour le test d'auto-agrégation bactérienne

**Calcul du pourcentage d'auto-agrégation :**

Le pourcentage d'auto-agrégation est déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Auto - agrégation} = \left( \frac{A_0 - A_t}{A_0} \right) \times 100$$

$A_0$  = Absorbance mesurée à t= 0 heure (valeur initiale)

$A_t$  = Absorbance mesurée après incubation pendant t heures (ici, 24 h)

**V.3.2. Activités autolytique (selon Bazezgar et al., 2021)**

L'activité autolytique reflète la capacité des bactéries à se lyser spontanément en absence d'agents externes. Cette propriété est associée à la libération de composants intracellulaires pouvant jouer un rôle dans les interactions hôte-probiotique, notamment par la libération de peptides bioactifs ou de substances immunomodulatrices (Bazezgar et al., 2021).

**➤ Protocole :**

- Centrifuger les souches bactériennes à 6000g pendant 15 minutes à 4 °C.
- Laver deux fois les culots cellulaires avec du tampon PBS.
- Incuber la suspension à température ambiante pendant 4 heures.
- Mesurer la densité optique à 600 nm avant et après incubation.

**Calcul de l'activité autolytique (%) :**

$$\% \text{ Autolyse} = \left( \frac{A_0 - A_t}{A_0} \right) \times 100$$

$A_0$  = Absorbance mesurée à t= 0 heure (valeur initiale)

$A_t$  = Absorbance mesurée après incubation pendant t heures (ici, 4 h)

### V.3.3. Test MATS (Microbial Adhesion To Solvents)

Le test MATS (Microbial Adhesion To Solvents) est une méthode couramment utilisée pour caractériser les propriétés de surface des bactéries, telles que l'hydrophobicité et les interactions acide/base de Lewis, en évaluant leur affinité pour différents solvants organiques. Cette technique repose sur le principe que l'adhésion bactérienne est influencée par des interactions physico-chimiques à l'interface cellule/solvant. Le protocole, dérivé des travaux initiaux de Van der Mei et Busscher, a été optimisé au fil du temps pour améliorer la reproductibilité et la sensibilité des mesures. Des études récentes ont confirmé la pertinence de cette méthode pour prédire l'adhésion des souches probiotiques aux cellules épithéliales intestinales, ce qui en fait un outil précieux en microbiologie appliquée (Chaalel et *al.*, 2022).

#### ➤ Protocole :

- Laver les souches bactériennes par centrifugation à  $6000 \times g$  pendant 15 minutes à 4 °C.
- Remettre les bactéries en suspension dans du PBS pour ajuster la DO à 0,5 (600 nm).
- Mélanger 1 ml de suspension bactérienne avec 0,5 ml de solvant organique (chloroforme et acétate d'éthyle).
- Vortexer vigoureusement pendant 2 minutes.
- Incuber le mélange à 37 °C pendant 2 heures pour permettre la séparation des phases.
- Mesurer la densité optique (DO) de la phase aqueuse à 600 nm.

#### Calcul de l'adhésion aux solvants (%) :

$$\%Hydrophobicité = \left( \frac{A_0 - A_t}{A_0} \right) \times 100$$

$A_0$  = DO de la suspension bactérienne avant contact avec le solvant

$A_t$  = DO de la phase aqueuse après incubation avec le solvant

## VI. Méthode d'extrusion

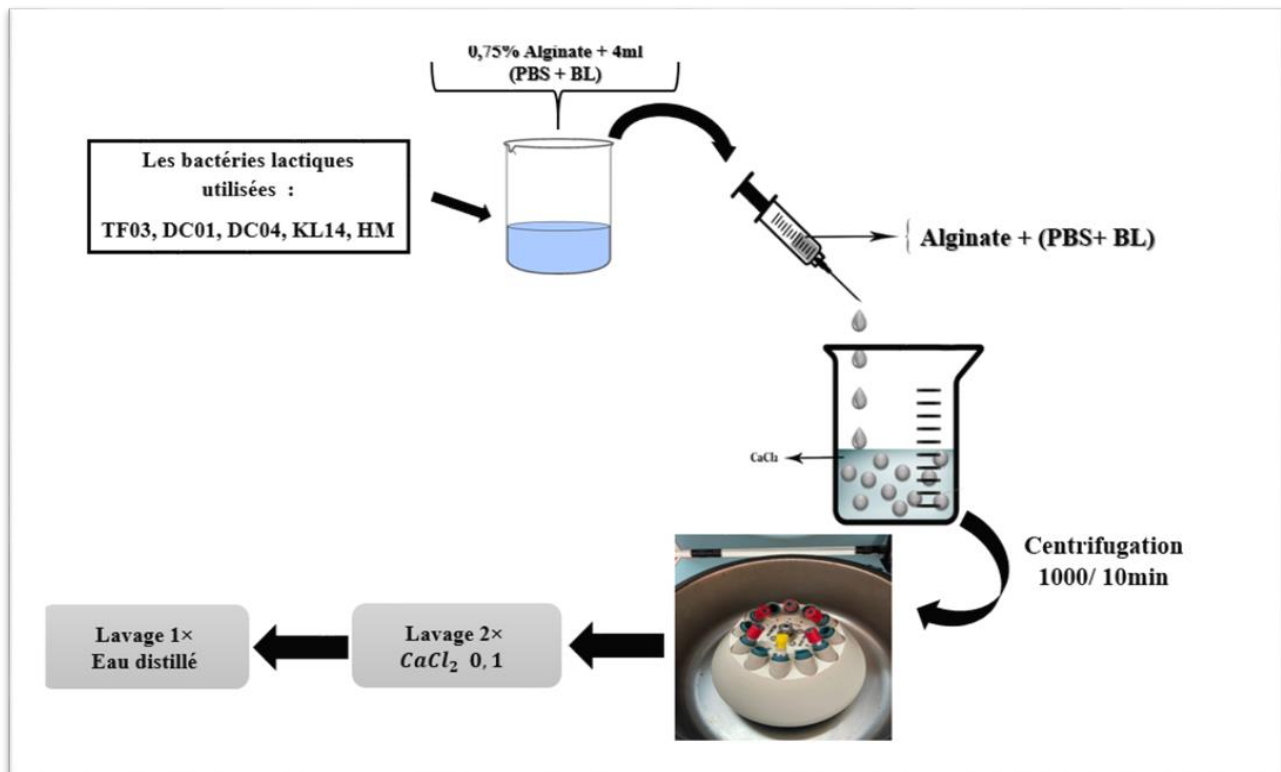
La méthode d'extrusion est une technique simple, douce et efficace, très utilisée pour encapsuler des probiotiques. Elle consiste à faire tomber goutte-à-goutte une solution d'alginate contenant les cellules bactériennes dans une solution de  $\text{CaCl}_2$ , où la gélification ionique se produit instantanément. Le contact entre les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et les groupements carboxyles de l'alginate forme un gel tridimensionnel (réseau de type "egg-box"), piégeant les bactéries à l'intérieur de capsules sphériques ou ellipsoïdales.

Cette méthode permet d'obtenir des capsules plus grosses (généralement  $> 300 \mu\text{m}$ ), mais elle présente l'avantage de ne nécessiter aucun solvant organique, ni d'agent tensioactif. Elle est donc particulièrement adaptée aux applications alimentaires et pharmaceutiques, où la biocompatibilité et la non-toxicité sont primordiales. De plus, elle assure une bonne viabilité cellulaire grâce à des conditions douces de traitement (Anal & Singh, 2007)

➤ **Protocole**

- Tous les matériaux utilisés sont préalablement stérilisés par autoclavage à  $115^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes.
- La souche bactérienne est cultivée puis ajustée à une densité optique (DO) de 0,5, ce qui correspond à une concentration estimée à  $10^6$  UFC/ml.
- La suspension bactérienne est mélangée avec du tampon PBS, puis incorporée à une solution d'alginate de sodium (à une concentration 0,75 %) selon un ratio de 1:4 (bactéries : alginate). Le mélange est homogénéisé de façon à garantir une répartition uniforme des cellules.
- À l'aide d'une seringue stérile, le mélange est extrudé goutte-à-goutte dans 100 ml de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) froid (concentration 0,1), sous agitation douce, afin de former les capsules.
- Les capsules sont laissées à se former pendant 20 minutes pour permettre une gélification complète.
- Après formation, les capsules sont récupérées par centrifugation à 1000 rpm pendant 10 minutes à  $4^\circ\text{C}$ .
- Elles sont ensuite lavées à deux reprises avec une solution stérile de chlorure de calcium, suivies d'une centrifugation à 1000 rpm pendant 10 minutes, puis rincées une dernière fois avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer les excédents de réactifs et d'alginate non réticulé.
- Les capsules sont filtrées à l'aide de papier filtre Whatman n°1.
- Enfin, les capsules obtenues sont stockées dans de l'eau physiologique à température ambiante.

**NB** : Parmi les concentrations testées pour l'alginate (0,75 %, 2 % et 4 %), la concentration de 0,75 % a donné les meilleurs résultats en termes de formation de capsules homogènes et stables. De même, pour le chlorure de calcium (0,1 M et 0,2 M), la concentration de 0,1 M s'est avérée la plus efficace pour une gélification optimale sans altération de la structure des capsules.



**Figure 27** : Etape de l'encapsulation par extrusion

## VII. Méthode d'émulsion

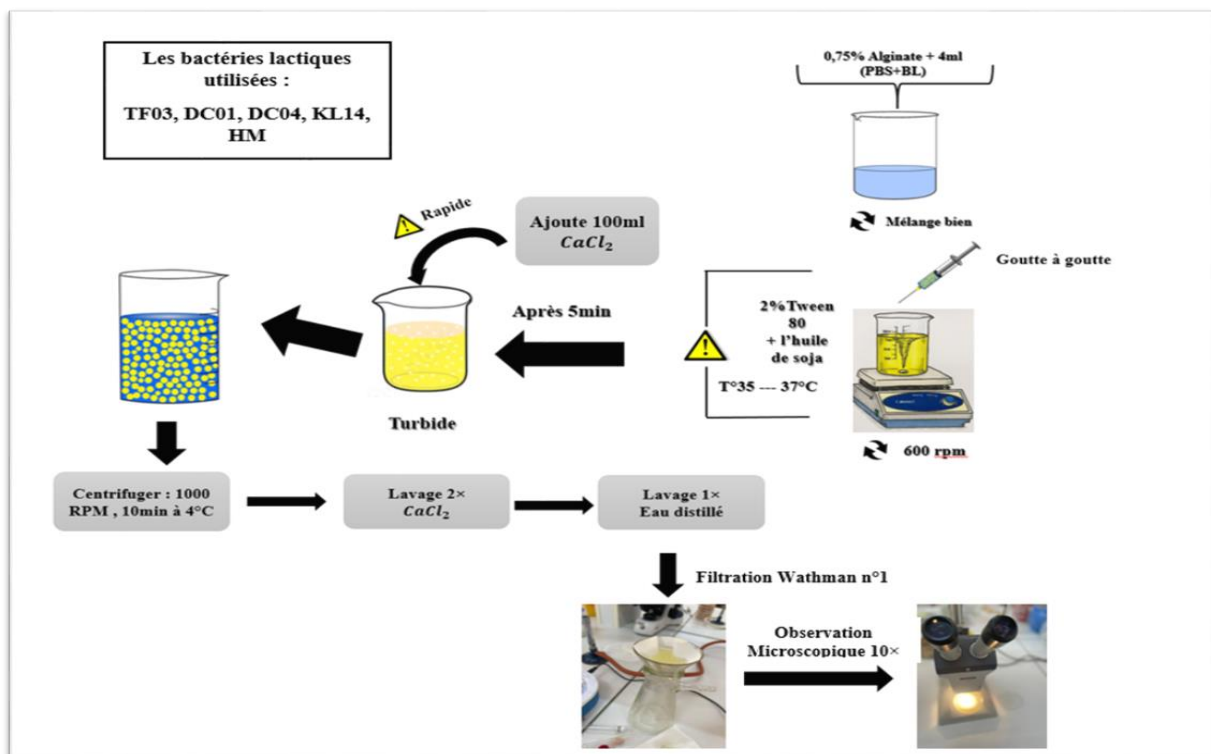
La méthode d'émulsion est une technique d'encapsulation largement utilisée pour immobiliser des micro-organismes, notamment des souches probiotiques. Elle repose sur la création d'une émulsion eau-dans-huile (W/O) dans laquelle une solution aqueuse contenant l'alginate et les bactéries est dispersée dans une phase huileuse sous agitation mécanique. La solution de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) est ensuite ajoutée afin d'induire la gélification ionique de l'alginate dans les microgouttelettes, formant ainsi des microcapsules.

Ce procédé est particulièrement adapté pour obtenir des capsules de petite taille (< 100 µm) et est utilisé lorsque la protection contre l'humidité ou les conditions gastriques est recherchée. Cependant, cette méthode nécessite généralement des agents tensioactifs pour stabiliser l'émulsion et présente certaines limitations, notamment en termes de diffusion des ions gélifiants à travers la phase huileuse et de récupération des capsules (Krasaekoopt et *al.*, 2004)

➤ **Protocole :**

- Préparer 100 ml d'huile végétale (3 modèles du l'huile de soja, olive et table) dans un bécher stérile.
- Introduire goutte à goutte le mélange alginate–bactéries dans l'huile.
- Agiter à 600 rpm pendant 5 minutes pour obtenir une émulsion stable.
- Ajouter lentement 100 ml de  $\text{CaCl}_2$  (0,1 M) à l'émulsion.
- Laisser reposer 20 minutes pour permettre la gélification.
- Centrifuger à 1000 rpm pendant 10 minutes pour récupérer les capsules.
- Observer la stabilité des capsules (certaines peuvent se désintégrer).
- Laver deux fois avec  $\text{CaCl}_2$  0,1 M.
- Rincer une fois avec de l'eau distillée stérile.
- Filtrer avec un papier Whatman n°1.
- Conserver les capsules dans de l'eau physiologique

**NB :** Des essais ont été menés en prolongeant le temps de repos dans la solution de  $\text{CaCl}_2$  à 20, 30 et 60 minutes. Aucune amélioration n'a été observée. Au contraire, un temps excessif entraînait la dégradation des capsules, qui devenaient instables, se désagrégeaient



**Figure 28 :** Etape de l'encapsulation par émulsion dans l'huile

## VIII. Évaluation de la viabilité des capsules

### 1. Test d'efficacité des capsules (Jour 0)

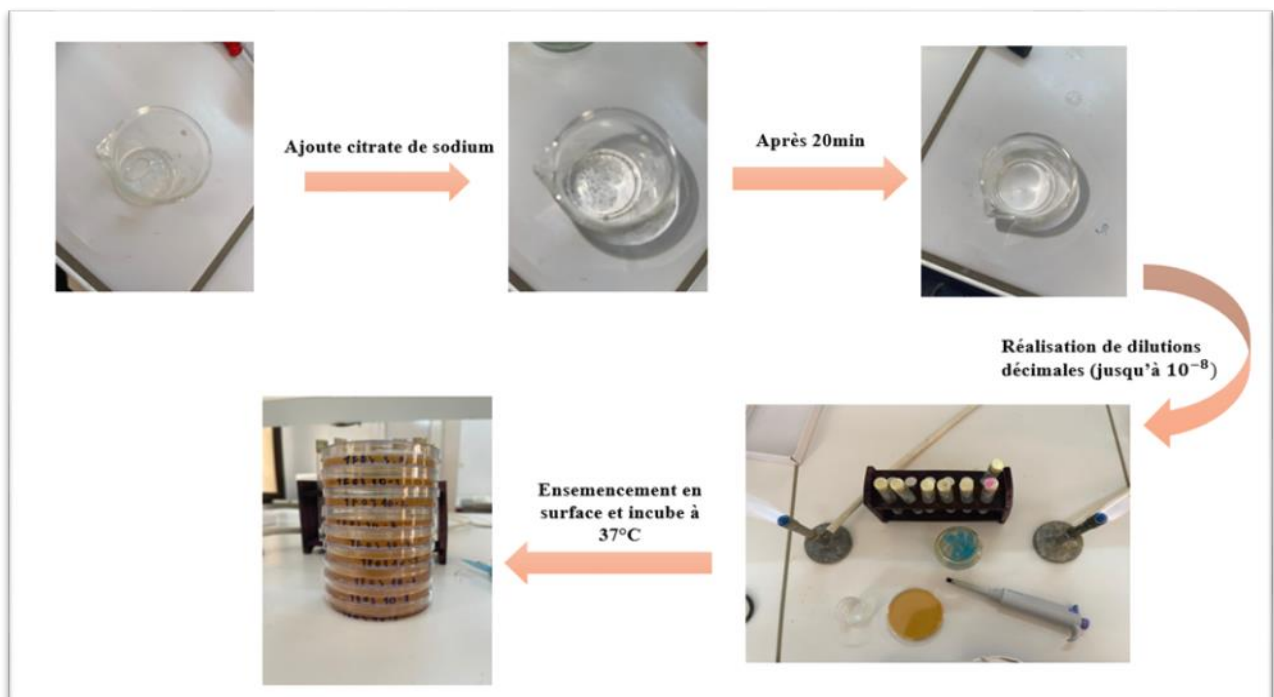
Pour vérifier la libération et la viabilité des bactéries juste après encapsulation.

- Dissolution des capsules dans une solution de citrate de sodium.
- Réalisation de dilutions décimales successives dans le milieu MRS (jusqu'à  $10^{-8}$ ).
- Ensemencement en surface :
  - Prélever 0,1 ml de chaque dilution.
  - Étaler à la surface de boîtes contenant un milieu MRS à l'aide d'un râteau stérile.
- Incubation des boîtes à  $37^{\circ}\text{C}$
- Lecture des résultats après 48 heures (dénombrement des colonies exprimé en UFC/ml).

### 2. Test après une semaine de stockage

Pour évaluer la stabilité et la survie des bactéries encapsulées après une semaine.

- Stockage des capsules dans les conditions définies à  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Durée : 7 jours.
- Reprise du même protocole qu'au jour 0



**Figure 29** : Méthode du test d'efficacité des capsules (le premier jour et après une semaine)

**Formule de dénombrement :**

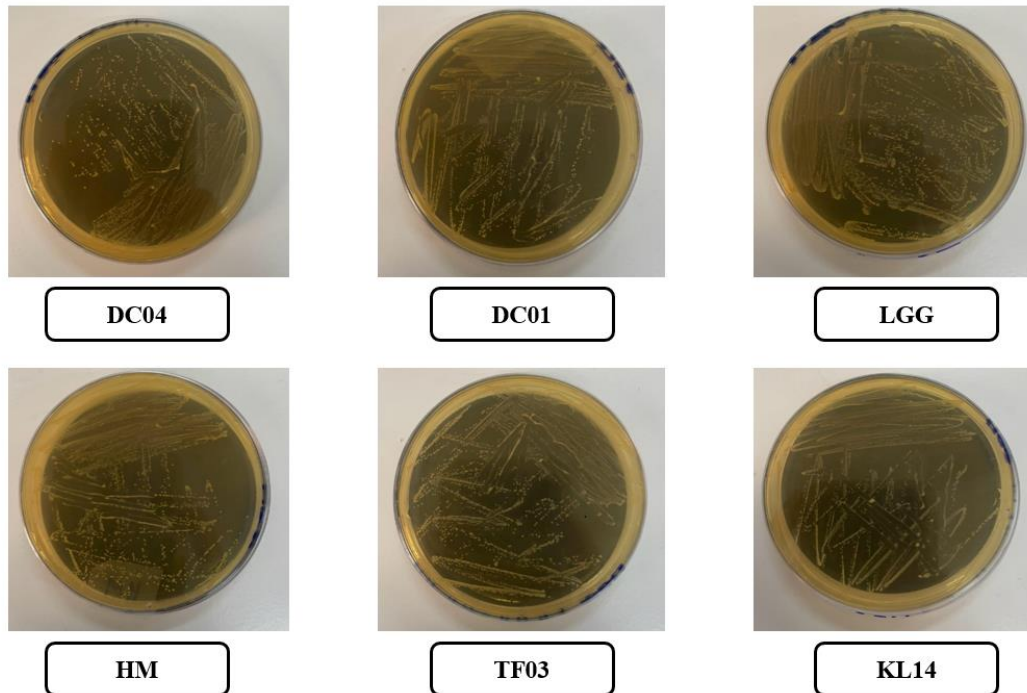
$$UFC/ml = \frac{\text{Nombre moyen de colonies comptées} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{Volumeensemencé (en ml)}}$$

## ***Chapitre IV : Résultats & Discussion***

## I. Résultats

### I.1. Résultats de la revivification des souches bactériennes

La figure n° 30 ci-dessous présentent les résultats de la revivification des différentes souches bactériennes sur milieu MRS après leur phase de conservation



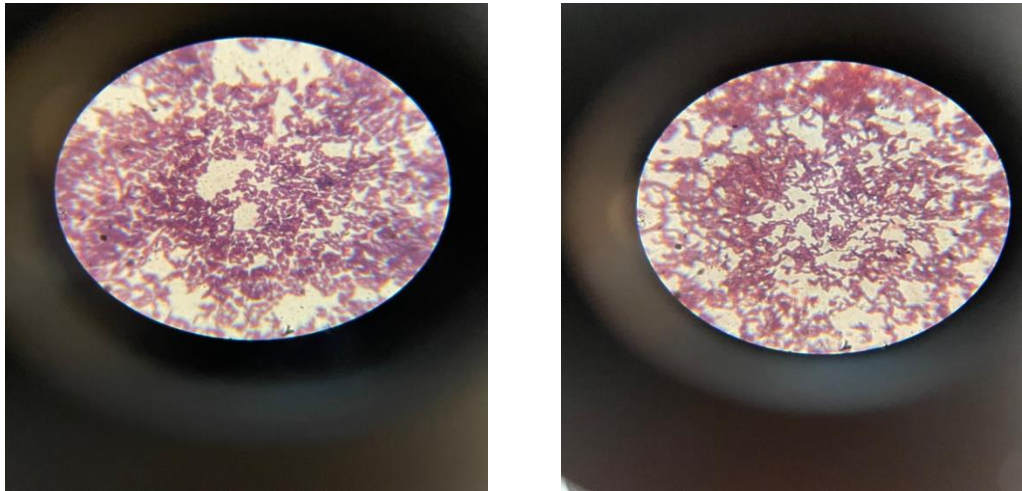
**Figure 30 :** Résultats de la revivification des souches bactériennes sur gélose MRS

Les six boîtes de Pétri illustrent la croissance bactérienne après la revivification des souches probiotiques DC04, DC01, LGG, HM, TF03 et KL14 sur milieu MRS. Toutes les souches présentent une croissance visible sous forme de colonies bien distinctes, confirmant leur viabilité après la phase de conservation. Ces résultats indiquent une réactivation réussie des souches.

### I.2. Résultats de la vérification de la pureté des souches

#### I.2.1. Résultats d'observation microscopique

L'observations microscopiques a été réalisée afin de vérifier la pureté morphologique des souches bactériennes revivifiées, en analysant leur forme, leur disposition et l'absence de contamination apparente .



**Figure 31 :** Observation microscopique des souches bactériennes colorées au Gram

La figure montre des bactéries à Gram positif, colorées en violet, de forme bacillaire et disposées en amas ou en chaînes courtes. L'absence de structures étrangères suggère une bonne pureté des cultures. Ces observations confirment que les souches revivifiées présentent une morphologie homogène, caractéristique des bactéries lactiques probiotiques.

### I.2.2. Résultats du test catalase

Le test à la catalase a été réalisé afin de vérifier l'absence d'activité catalasique chez les souches bactériennes, ce qui est caractéristique des bactéries lactiques anaérobies.

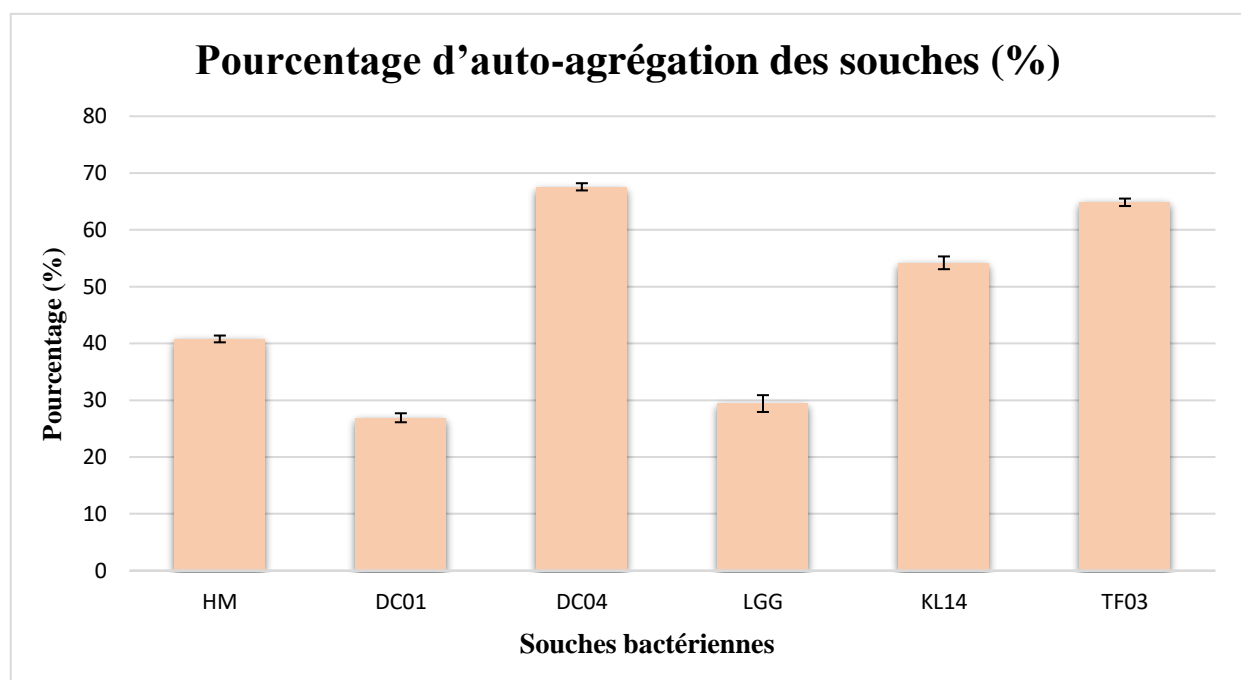


**Figure 32 :** Résultats du test catalase des souches bactériennes (HM, DC01, DC04, LGG, KL14 et TF03)

L'absence de formation de bulles à la surface des lames après l'ajout de  $H_2O_2$  indique que toutes les souches testées sont catalase-négatives. Ce résultat est conforme aux caractéristiques des bactéries lactiques, qui ne possèdent généralement pas l'enzyme catalase, ce qui confirme la pureté et l'identité des souches isolées.

### I.3. Résultat du test d'auto agrégation

Le pourcentage d'auto-agrégation des différentes souches bactériennes est présenté dans la figure suivante :

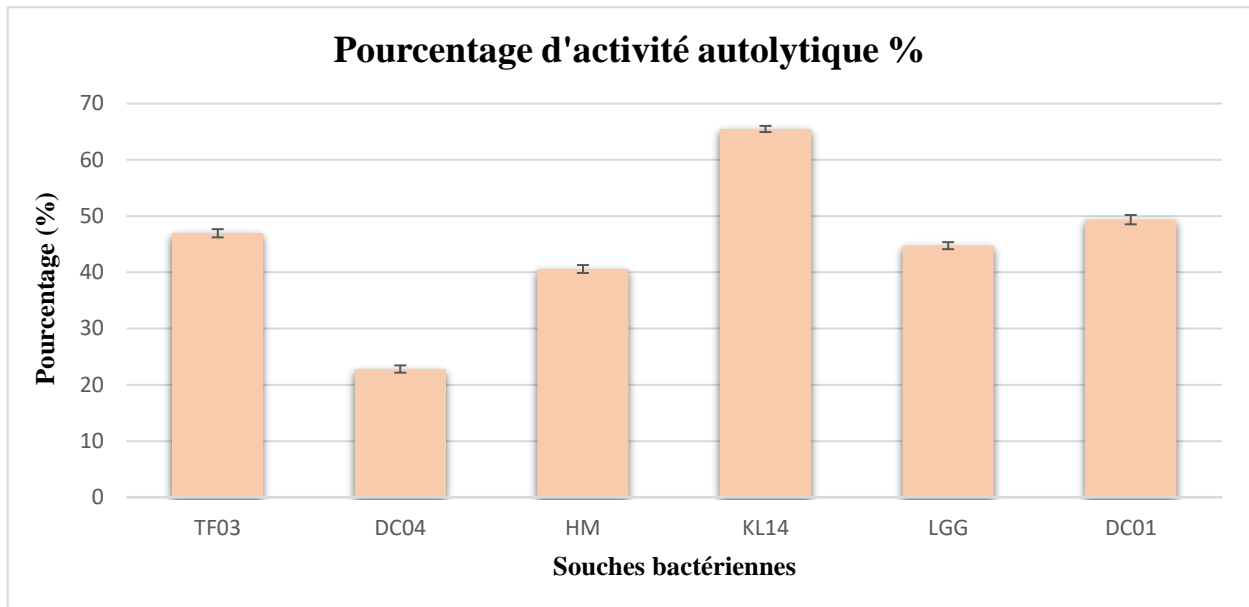


**Figure 33 :** Pourcentage d'auto-agrégation des différentes souches bactériennes testées

Le graphique présente les pourcentages d'auto-agrégation des six souches bactériennes. La souche DC04 montre la plus forte capacité d'auto-agrégation avec un taux avoisinant 68 %, suivie par TF03 ( $\approx 64$  %) et KL14 ( $\approx 54$  %), ce qui suggère un fort potentiel d'adhésion cellulaire, caractéristique importante pour les probiotiques. À l'inverse, les souches DC01 et LGG présentent les plus faibles pourcentages ( $\approx 27$  %), traduisant une capacité d'agrégation plus faible. Ces différences pourraient être liées à la nature de la surface cellulaire et à la composition en exo polysaccharides de chaque souche.

#### I.4. Résultat d'activité autolytique

La figure suivante illustre le pourcentage d'activité autolytique de différentes souches bactériennes sélectionnées :

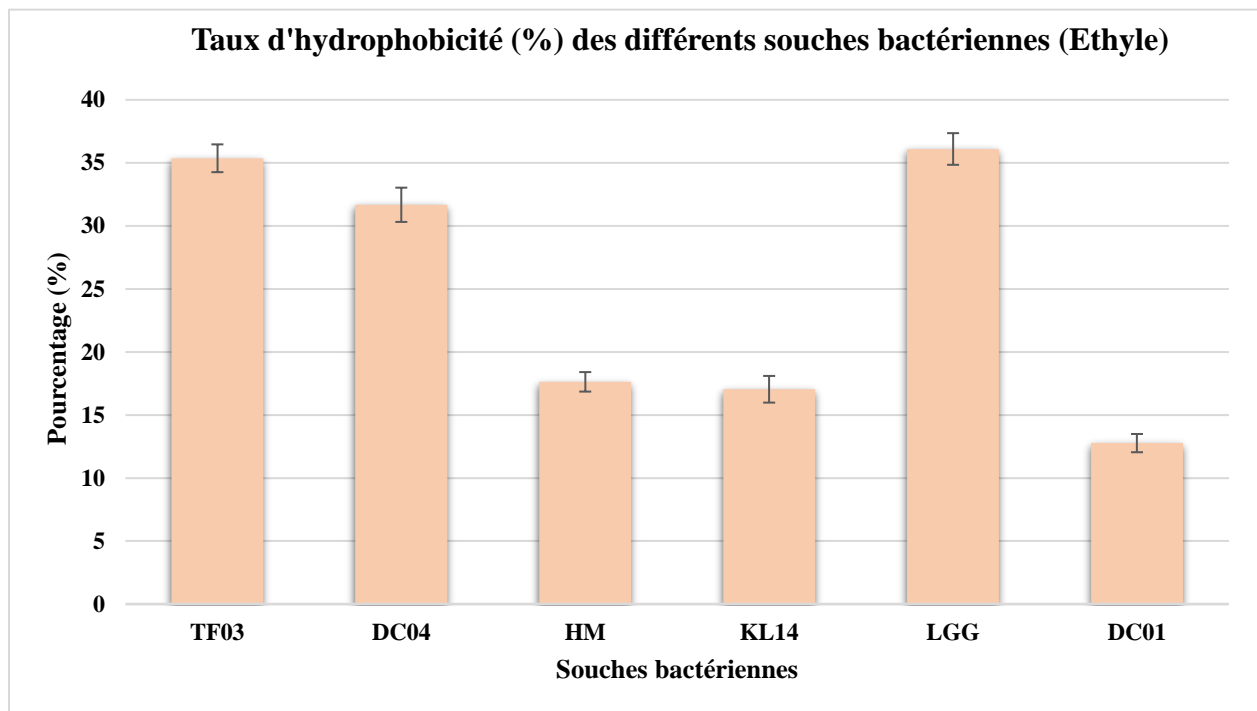


**Figure 34 :** Pourcentage d'activité autolytique (%) des souches bactériennes

La souche KL14 présente l'activité autolytique la plus élevée (environ 66 %), ce qui reflète une capacité importante à se lyser spontanément, favorisant la libération de composés intracellulaires bénéfiques. À l'inverse, DC04 montre la plus faible activité autolytique (~24 %). Les autres souches (TF03, HM, LGG, DC01) présentent des taux intermédiaires variant entre 40 % et 50 %. Une activité autolytique modérée à élevée peut renforcer le potentiel probiotique en facilitant l'interaction avec l'hôte et l'environnement intestinal.

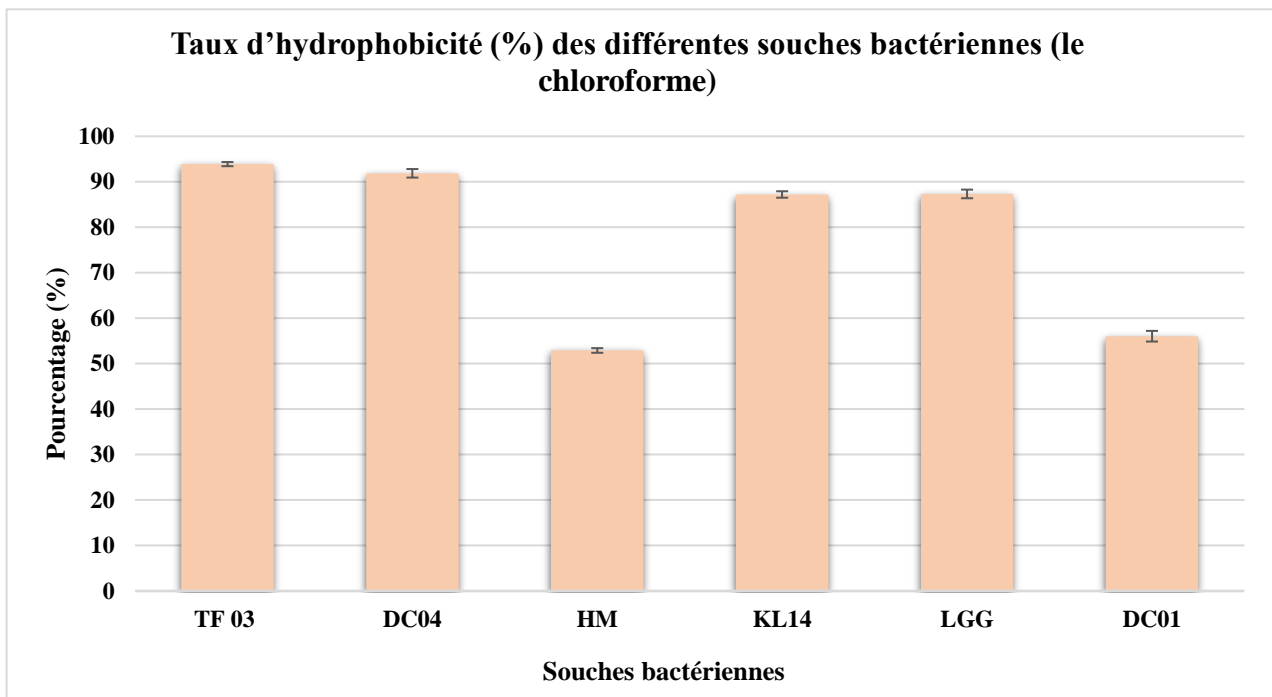
### I.5. Résultat test MATS

Comparaison de l'hydrophobicité des différentes souches bactériennes selon le solvant utilisé : chloroforme (solvant acide) et acétate d'éthyle (solvant basique) :



**Figure 35 :** Taux d'hydrophobicité (%) des différentes souches bactériennes en présence d'acétate d'éthyle

L'acétate d'éthyle étant un solvant basique, permet d'évaluer les caractères acides des surfaces bactériennes (donneurs de protons). Les résultats montrent encore une dominance des souches TF03, LGG, et DC04 avec des taux d'adhésion élevés, ce qui indique une certaine richesse en groupes acides à leur surface. Les faibles taux observés pour DC01, HM et KL14 traduisent une surface plus basique ou neutre. Ces résultats confirment la diversité de propriétés de surface entre les souches, ce qui peut impacter leur comportement probiotique.



**Figure 36 :** Taux d'hydrophobicité (%) des différentes souches bactériennes en présence de chloroforme

Le chloroforme, un solvant acide, permet d'évaluer la surface électronique des bactéries (accepteur d'électrons). Les souches TF03, LGG et DC04 montrent un taux d'adhésion élevé, traduisant une capacité importante à interagir avec des solvants acides, donc une surface potentiellement basique (donneur d'électrons). À l'opposé, les souches DC01, HM et KL14 ont un taux d'adhésion plus faible, suggérant une surface plus acide ou neutre. Cela peut influencer leur capacité d'interaction avec les cellules hôtes ou la muqueuse intestinale.

### **I.6. Interprétation des tests fonctionnels liés au potentiel probiotique**

Dans le cadre de l'évaluation du potentiel probiotique des différentes souches bactériennes étudiées, trois tests fonctionnels ont été réalisés : l'auto-agrégation, l'hydrophobicité (via le test MATS avec deux solvants distincts), et l'activité autolytique. Ces tests permettent de prédire la capacité des souches à adhérer à l'épithélium intestinal, à persister dans l'environnement gastro-intestinal, et à interagir positivement avec l'hôte.

### ✓ Auto-agrégation

Le test d'auto-agrégation évalue la capacité des bactéries à s'agglomérer entre elles, favorisant la colonisation du tractus gastro-intestinal et la formation de biofilms protecteurs. Les résultats obtenus montrent que les souches DC04, TF03, KL14 et HM présentent un fort pouvoir d'auto-agrégation, avec des taux dépassant 50 %, ce qui suggère une bonne capacité d'implantation intestinale et d'inhibition de l'adhésion des pathogènes. En revanche, les souches DC01 et LGG ont affiché des taux plus faibles (< 30 %), indiquant une cohésion intercellulaire plus faible et donc un potentiel d'adhésion limité.

### ✓ Hydrophobicité

L'hydrophobicité de surface, mesurée par le test MATS avec le chloroforme (solvant acide) et l'acétate d'éthyle (solvant basique), est un indicateur important de la capacité d'adhésion aux cellules intestinales.

Avec le chloroforme, les souches TF03 et LGG ont montré les taux d'hydrophobicité les plus élevés (~36 %), suivies par DC04 (~32 %), tandis que DC01 et KL14 présentaient des valeurs plus faibles (~13 % et ~17 %, respectivement).

Avec l'acétate d'éthyle, les tendances sont similaires mais légèrement atténuées : TF03, DC04 et LGG conservent des niveaux relativement élevés (>30 %), tandis que DC01, KL14 et HM se situent autour de 13 % à 18 %.

Ces résultats indiquent que TF03, DC04 et LGG possèdent une affinité importante avec les surfaces hydrophobes, ce qui peut favoriser leur interaction avec les muqueuses intestinales. À l'inverse, les souches DC01, KL14 et HM montrent une capacité d'adhésion plus faible dans ces conditions.

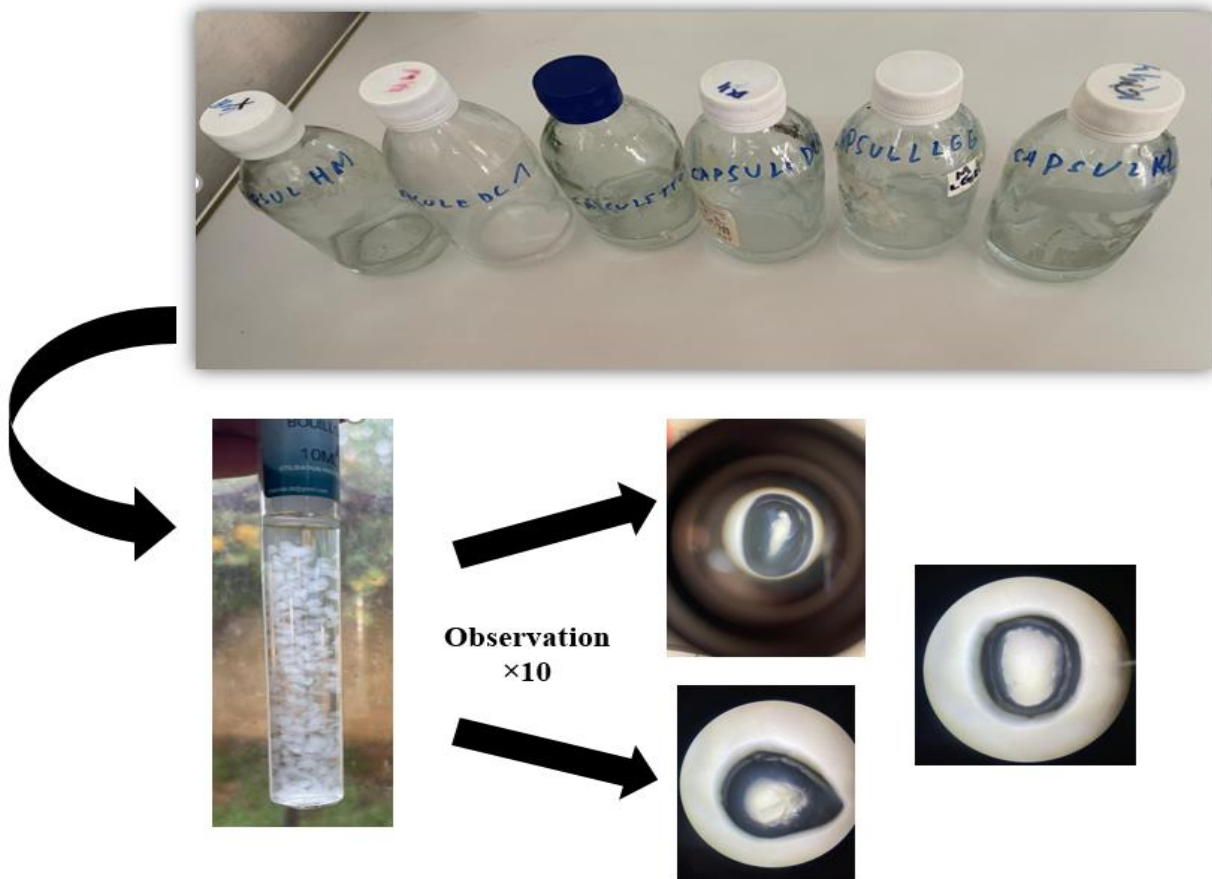
### ✓ Activité autolytique

L'activité autolytique mesure la capacité des bactéries à se lyser, libérant ainsi des composés bioactifs bénéfiques pour l'hôte. Parmi les souches testées, KL14 présente l'activité la plus élevée (~65 %), suivie de DC01, TF03, LGG et HM avec des niveaux intermédiaires (entre 40 % et 50 %). La souche DC04, en revanche, montre une activité autolytique faible (< 25 %), limitant son potentiel de libération de métabolites fonctionnels.

En résumé, les souches TF03 et KL14 se distinguent par de bonnes performances globales sur les trois tests, suggérant un potentiel probiotique élevé. DC04 montre une bonne hydrophobicité et une excellente auto-agrégation, bien que son activité autolytique soit faible. Les souches HM et DC01, quant à elles, affichent des résultats plus modestes, notamment en hydrophobicité, ce qui pourrait limiter leur efficacité probiotique.

### I.7. Résultat de la méthode d'extrusion

Observation des capsules de bactéries lactiques encapsulées (KL14, DC01, LGG, DC04, HM, TF03) dans des flacons distincts, obtenues par la méthode d'extrusion. Les microcapsules formées ont ensuite été observées au microscope optique à un grossissement  $\times 10$  afin d'évaluer leur forme, leur uniformité et leur intégrité :

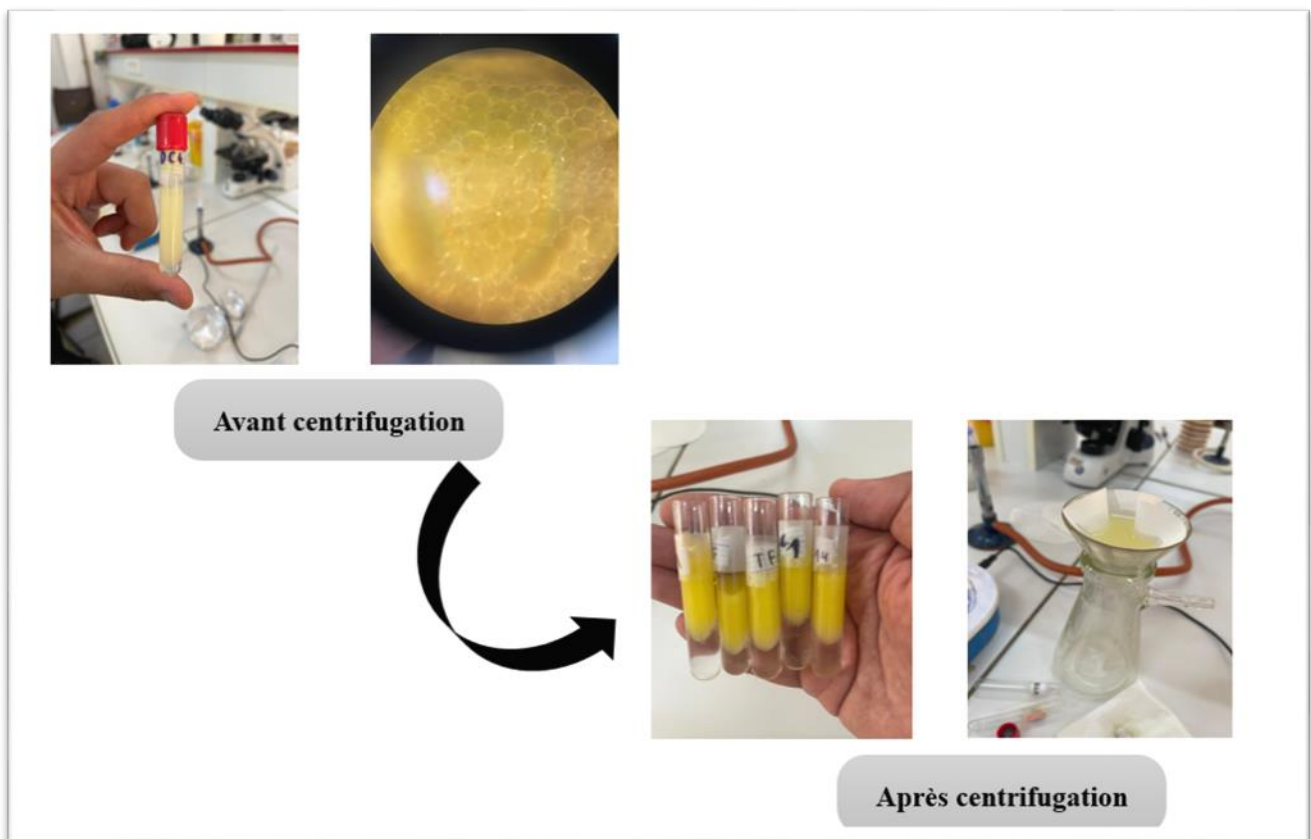


**Figure 37 :** Préparation et observation des capsules obtenues par la méthode d'extrusion pour différentes souches de bactéries lactiques

Les capsules obtenues présentent une morphologie sphérique régulière avec une paroi bien définie, témoignant d'une bonne efficacité de la méthode d'extrusion appliquée. L'observation au microscope révèle une structure homogène sans déformation apparente, ce qui suggère une encapsulation réussie et une compatibilité des souches bactériennes avec les matériaux utilisés. Ces résultats confirment la stabilité physique des capsules nécessaires à la protection des bactéries lactiques.

### I.8. Résultat de la méthode d'émulsion

Évolution des capsules de bactéries lactiques (souches TF03, LGG, KL14, DC01, DC04, HM) obtenues par la méthode d'émulsion :



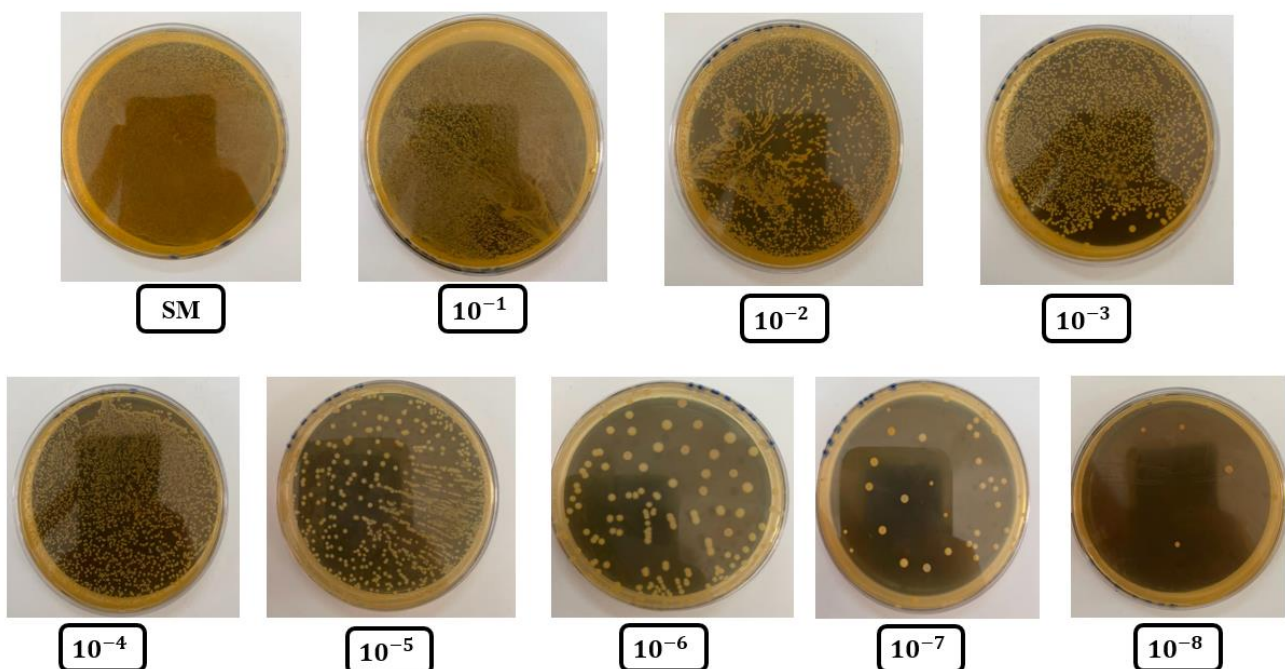
**Figure 38 :** Etat des capsules obtenues par la méthode d'émulsion avant et après centrifugation

La méthode d'émulsion a permis d'obtenir initialement des capsules de forme régulière. Toutefois, après centrifugation, une désintégration partielle a été observée, avec une tendance des capsules à se déformer et à adhérer au papier filtre Whatman n°1, traduisant une faible stabilité mécanique de ces microcapsules. Ce comportement indique une limitation de la méthode d'émulsion dans le maintien de l'intégrité des capsules après traitement.

## I.9. Résultat de l'évaluation de la viabilité des capsules

### I.9.1. Résultats du dénombrement avant stockage

Les figures ci-dessous illustrent les boîtes de Pétri obtenues après incubation de différentes dilutions de la suspension issue des capsules :



**Figure 39** : Les boîtes de Pétri après incubation le premier jour, juste après encapsulation

Le dénombrement des bactéries viables libérées à partir des capsules a été réalisé par ensemencement en surface, à partir de dilutions successives dans le milieu MRS. La solution mère à dilution  $10^{-5}$  a été jugée non dénombrable en raison d'un nombre excessif de colonies. En revanche, les dilutions  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$  ont permis d'obtenir respectivement 137, 37 et 5 colonies.

Le calcul de la concentration bactérienne (UFC/ml), basé sur les dilutions comprises entre 30 et 300 colonies ( $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ ), a donné les résultats suivants :

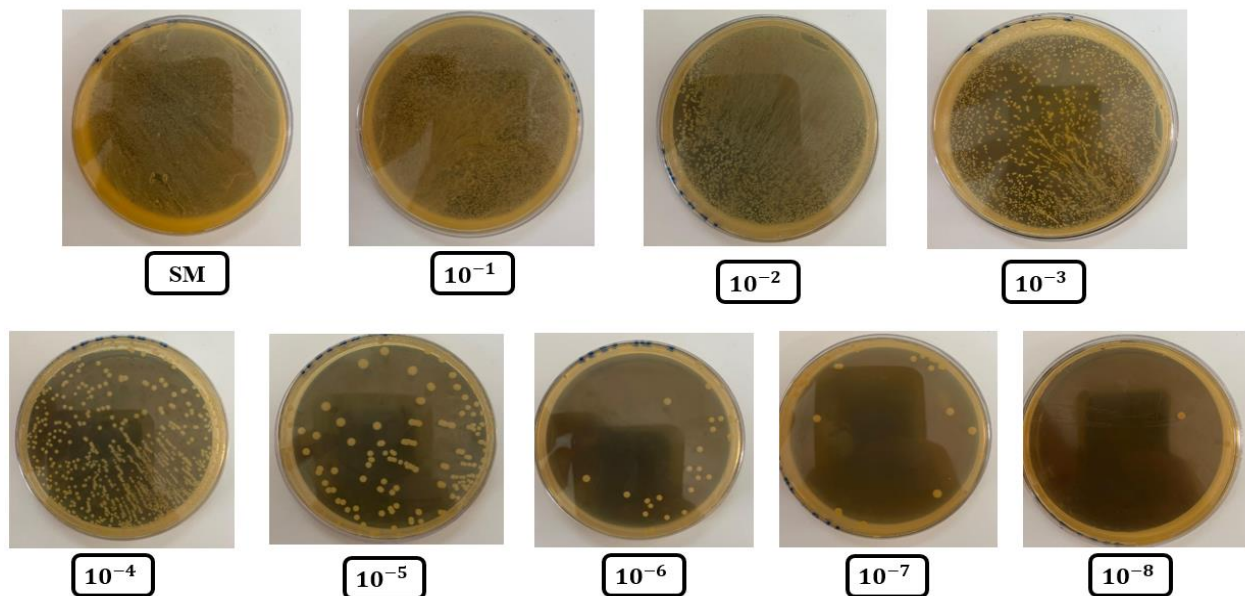
- À  $10^{-6}$  :  $1,37 \times 10^9$  UFC/ml
- À  $10^{-7}$  :  $3,70 \times 10^9$  UFC/ml

$$\text{Moyenne UFC/ml} = \frac{1,37 \times 10^9 + 3,7 \times 10^9}{2} = 2,535 \text{ UFC/ml}$$

La moyenne des deux valeurs a été retenue pour estimer la concentration bactérienne finale, soit  $2,54 \times 10^9$  UFC/ml. Ce résultat indique une bonne viabilité des souches juste après encapsulation, témoignant de l'efficacité du procédé.

### I.9.2. Résultat du dénombrement après une semaine du stockage

Après une semaine de stockage des capsules, le même protocole de dénombrement a été appliqué afin d'évaluer la stabilité et la viabilité des bactéries encapsulées :



**Figure 40 :** Boîtes de Pétri après incubation, une semaine après stockage

Après une semaine de conservation des capsules, le protocole de dénombrement a été répété afin d'évaluer l'évolution de la viabilité des bactéries encapsulées. Les résultats obtenus montrent que la dilution  $10^{-5}$  présentait 138 colonies, tandis que les dilutions  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$  ont donné respectivement 27, 22 et 2 colonies. La dilution SM à  $10^{-4}$  était également dénombrable mais hors de la plage optimale ( $>300$  colonies), et les dilutions supérieures présentaient un nombre de colonies inférieur au seuil de précision (moins de 30 colonies).

Le calcul de la concentration bactérienne a été réalisé sur la dilution  $10^{-5}$ , seule dilution comprise dans l'intervalle optimal (30–300 colonies). La concentration en bactéries viables a ainsi été estimée à  $1,38 \times 10^8$  UFC/ml, selon la formule suivante :

$$UFC/ml = \frac{138 \times 10^{-5}}{0,1}$$

### I.9.3. Comparaison entre les résultats avant et après stockage

La comparaison des concentrations bactériennes viables montre une diminution de la charge microbienne après une semaine de stockage. En effet, la concentration initiale, mesurée juste après encapsulation, était de  $2,54 \times 10^9$  UFC/ml, tandis qu'après une semaine, elle est descendue à  $1,38 \times 10^8$  UFC/ml. Cette réduction, bien que significative, reste modérée et indique que les capsules conservent une bonne capacité de protection des bactéries contre les conditions de stockage. Ainsi, le procédé d'encapsulation utilisé permet de maintenir la viabilité des souches encapsulées sur une période minimale d'une semaine, ce qui est un critère favorable dans le cadre du développement de compléments alimentaires fonctionnels à base de probiotiques.

## II. Discussion

La présente étude a été menée afin d'évaluer et de comparer deux méthodes d'encapsulation – l'extrusion et l'émulsion – pour la formulation d'un complément alimentaire fonctionnel à base de souches probiotiques. L'objectif principal était de déterminer quelle méthode permettait de mieux préserver la viabilité bactérienne et de garantir une stabilité optimale des capsules, tout en conservant les propriétés probiotiques des souches sélectionnées. Les résultats expérimentaux obtenus ont mis en évidence des différences nettes entre les deux techniques, aussi bien au niveau de la morphologie des capsules que de leur performance en termes de protection cellulaire.

La méthode d'extrusion a permis d'obtenir des capsules sphériques, homogènes, bien formées, avec une texture plus résistante. Ces capsules étaient faciles à séparer du milieu et à manipuler, ce qui constitue un atout majeur pour un usage pratique. En revanche, la méthode d'émulsion a généré des capsules de forme irrégulière, souvent fragiles, et dont la récupération s'est avérée difficile après centrifugation. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que, dans la méthode d'émulsion, la diffusion du chlorure de calcium dans la phase huileuse est limitée, ce qui compromet la réticulation

homogène de l'alginate. Ce constat rejoint les observations faites dans plusieurs travaux antérieurs, notamment ceux de Benabdelouahed (2021), Khaldi et al. (2020), et Bougherara (2019), qui ont rapporté que l'extrusion permet une meilleure formation de la membrane protectrice autour des cellules bactériennes, grâce à un contact direct et immédiat entre l'alginate et l'agent gélifiant.

En ce qui concerne la viabilité des bactéries, les résultats ont montré que l'extrusion permettait de maintenir une densité microbienne élevée après encapsulation ( $2,54 \times 10^9$  UFC/ml) et une bonne viabilité après une semaine de stockage ( $1,38 \times 10^8$  UFC/ml), ce qui indique une capacité de protection prolongée des cellules. À l'opposé, la méthode d'émulsion a entraîné une perte importante de viabilité, dès le début, et encore plus marquée après stockage. Ces observations confirment l'efficacité de la méthode d'extrusion, même dans des conditions de laboratoire limitées, et s'accordent parfaitement avec les résultats de plusieurs études scientifiques. En particulier, l'étude de Trabelsi et al. (2013) a montré que l'encapsulation par alginate enrobé de chitosane permettait de conserver jusqu'à 96 % de la viabilité des probiotiques dans des conditions gastriques et intestinales simulées. Bien que notre protocole n'intègre pas de couche supplémentaire de chitosane, nos résultats obtenus uniquement avec de l'alginate révèlent déjà une très bonne protection. De même, l'étude de Etchepare et al. (2015) confirme que l'alginate de sodium est un matériau biocompatible capable de préserver l'intégrité des bactéries face à des conditions environnementales défavorables. Par ailleurs, les résultats obtenus sont également en accord avec l'étude de Tan et al. (2023), qui a démontré que l'alginate permettait d'assurer la viabilité des souches dans des environnements acides et pendant le stockage à basse température, ce qui correspond aux conditions simulées dans notre expérience. Enfin, l'analyse de Han et al. (2022) souligne que l'alginate constitue un polymère de choix pour la microencapsulation des probiotiques, en garantissant leur survie dans le tractus digestif et durant la conservation, ce que nos résultats viennent confirmer.

En complément de l'évaluation de la viabilité, plusieurs tests fonctionnels ont été réalisés pour caractériser le potentiel probiotique des souches utilisées. Le test d'auto-agrégation a révélé que certaines souches comme DC04, KL14 et TF03 présentaient un fort pouvoir d'agrégation ( $> 60\%$ ), ce qui indique une bonne capacité d'adhésion aux cellules intestinales. Cette propriété est essentielle pour assurer la colonisation durable du microbiote intestinal et empêcher l'adhésion de bactéries pathogènes. Les résultats obtenus sont en adéquation avec les données de la littérature, notamment avec les travaux d'Otles (2013), qui ont établi un lien direct entre l'auto-agrégation et l'aptitude probiotique.

Par ailleurs, le test d'activité autolytique a montré que la souche KL14 possédait une autolyse particulièrement marquée, ce qui peut être considéré comme un avantage : cette autolyse favorise la libération de composés bioactifs intracellulaires bénéfiques (enzymes, peptides antimicrobiens, etc.) qui renforcent les effets fonctionnels des probiotiques même après la lyse cellulaire. Enfin, les résultats des tests d'hydrophobicité ont révélé que certaines souches, notamment TF03, LGG et DC04, affichaient une forte affinité avec les solvants organiques, ce qui reflète une bonne aptitude à adhérer aux membranes épithéliales. Cette propriété renforce leur capacité à se fixer à la muqueuse intestinale et à exercer un effet bénéfique local. Ces caractéristiques sont cruciales dans la formulation d'un complément alimentaire efficace. Les conclusions de l'étude de Han et *al.* (2022) viennent appuyer nos résultats, en précisant que l'alginate n'altère pas les propriétés d'adhésion des bactéries encapsulées.

En résumé, l'ensemble des résultats expérimentaux, qu'il s'agisse de l'observation morphologique des capsules, de la mesure de la viabilité bactérienne ou des tests fonctionnels, indiquent que la méthode d'extrusion est plus adaptée que l'émulsion dans le contexte de ce travail. Elle offre une meilleure protection physique et biologique des souches, tout en permettant de préserver les propriétés probiotiques essentielles. Ces résultats, largement confirmés par la littérature scientifique, suggèrent que l'alginate de sodium, utilisé seul, constitue un support d'encapsulation simple, économique et efficace pour la production de compléments alimentaires probiotiques dans un cadre universitaire.

## *Conclusion générale & Perspective*

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'efficacité de deux techniques d'encapsulation -l'émulsion et l'extrusion - pour protéger des souches probiotiques en vue de leur intégration dans un complément alimentaire fonctionnel. L'intérêt croissant pour les probiotiques, en raison de leurs bienfaits avérés sur la santé humaine, notamment en matière de régulation de la flore intestinale et de renforcement du système immunitaire, justifie pleinement l'exploration de techniques innovantes permettant d'en assurer la stabilité et la viabilité.

Les résultats obtenus ont clairement montré la supériorité de la méthode d'extrusion. Contrairement à la méthode d'émulsion, qui a conduit à des capsules instables, irrégulières et fragiles, la technique d'extrusion a permis d'obtenir des microcapsules homogènes, sphériques, mécaniquement stables et reproductibles. Les tests de viabilité ont confirmé la capacité des capsules obtenues par extrusion à maintenir un nombre élevé de cellules viables, même après une période de conservation. Ces résultats confirment donc la pertinence de cette méthode dans une perspective d'application industrielle.

En outre, l'application expérimentale des capsules obtenues chez des poulets de chair (broilers) a permis d'observer une réponse biologique encourageante, suggérant que l'administration de probiotiques encapsulés peut favoriser la santé intestinale et améliorer les performances zootechniques. Ces observations s'accordent avec plusieurs études antérieures ayant mis en évidence l'intérêt de l'encapsulation pour améliorer la résistance des probiotiques aux conditions du tractus digestif.

#### ❖ **Perspectives**

Pour les perspectives futures, plusieurs axes d'approfondissement peuvent être envisagés :

- ✓ **Optimisation des paramètres d'encapsulation** : bien que la méthode d'extrusion ait donné de bons résultats, un ajustement plus fin des concentrations en alginate, de la taille des capsules et du temps de réticulation pourrait encore améliorer la stabilité et la libération ciblée des probiotiques.
- ✓ **Test de nouvelles matrices polymériques** : l'alginate, bien que largement utilisé, pourrait être associé à d'autres polymères naturels (pectine, chitosane, amidon) pour améliorer les propriétés mécaniques et la résistance aux conditions gastro-intestinales.

- ✓ **Études in vivo approfondies** : des essais cliniques sur l'homme ou des essais prolongés sur animaux d'élevage permettront de confirmer les effets bénéfiques à long terme des probiotiques encapsulés.
- ✓ **Développement industriel** : l'extension de cette méthode à une échelle industrielle nécessite une étude de faisabilité économique, ainsi qu'une validation réglementaire du produit final comme complément alimentaire.

En définitive, cette étude contribue à renforcer l'intérêt scientifique et technologique pour les probiotiques encapsulés, ouvrant la voie à des applications concrètes dans les secteurs de la nutrition, de la santé animale et humaine, et de l'agroalimentaire fonctionnel.

## *Références bibliographiques*

1. Alginate encapsulation improves probiotics survival in carbonated sodas and beers (PLoS ONE, 2023) *L'encapsulation dans l'alginate améliore la viabilité des probiotiques dans des conditions acides et lors du stockage réfrigéré.*
2. 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.
3. Anses. (2012). *Les apports nutritionnels conseillés pour la population française*. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
4. Anses. (2021). *Les lipides dans l'alimentation : rôles et recommandations*. Dossier scientifique en nutrition humaine.
5. Bazezgar, S., Noghabi, K. A., Moniri, R., & Gharavi, S. (2021). Selection of probiotic bacteria with high autolytic and anti-biofilm activity against *Streptococcus mutans*. *Microbial Pathogenesis*, 155, 104902
6. Benabdelouahed, N. (2021). *Étude de l'encapsulation de souches probiotiques : comparaison entre les méthodes d'émulsion et d'extrusion*. Mémoire de Master, Université de Béjaïa.
7. Benabdelouahed, N. (2021). *Étude de l'encapsulation de souches probiotiques : comparaison entre les méthodes d'émulsion et d'extrusion*. Mémoire de Master, Université de Béjaïa.
8. Bernier, J. (2010). *Les probiotiques et la santé digestive*. Éditions Médicales.
9. Bird, C.L. (2003). Zinc fingers in gene regulation. *Journal of Molecular Biology*, 320(2), 245–258.
10. Bougherara, H. (2019). *Encapsulation de bactéries probiotiques par alginate : comparaison entre la méthode d'extrusion et la méthode d'émulsion*. Mémoire de Master, Université Ferhat Abbas Sétif 1.
11. Bouriche, H. (2019). *Les acides gras essentiels : sources, rôles et usages en supplémentation*. Revue Nutrition & Santé.
12. Bruno, F. (2012). *Sélection et évaluation des souches probiotiques : critères de choix*. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 47(3), 121–127.
13. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467–483.
14. Castelli, M. (2020). *Les protéines dans l'alimentation humaine : digestibilité et biodisponibilité*. *Nutrition Clinique*, 28(1), 17–25.

15. Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226, 1065–1073.
16. DGCCRF (2023). *Les compléments alimentaires : cadre réglementaire et typologie*. Disponible sur : [www.economie.gouv.fr/dgccrf](http://www.economie.gouv.fr/dgccrf)
17. DGCCRF. (2023). *Compléments alimentaires : encadrement, contrôles et bonnes pratiques*. Ministère de l'Économie.
18. Djellid, H. (2020). *Effets de la supplémentation en probiotiques encapsulés sur la croissance et la santé intestinale des poulets de chair*. Mémoire de Master, École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, Algérie.
19. Djellid, Y. (2020). *Effet de probiotiques encapsulés sur la croissance et la santé intestinale des poulets de chair*. Mémoire de Master, Université de Constantine.
20. Dubois, L. (2022). *Les compléments alimentaires fonctionnels : état des lieux et perspectives*. Revue de Médecine Fonctionnelle.
21. Dubois, M. (2022). « Compléments alimentaires fonctionnels : enjeux et perspectives ». Revue de Nutrition et Bien-être, 18(2), 95-104
22. El Kssimi, A. (2021). *Micronutriments et santé : rôles et supplémentation*. *Journal Marocain de Nutrition*, 15(2), 51–60.
23. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved... (PubMed, 2013) *Encapsulation improved survival of L. plantarum under artificial gastric and intestinal conditions, with up to 96 % viability when chitosan-coated*.
24. Farkas, K. (2019). *La consommation des protéines en poudre : enjeux nutritionnels et métaboliques*. *Cahiers du Sportif*, 42(6), 44–49.
25. Fibigr J., Šatínský D., Solich P. (2018). Tendances actuelles de l'analyse et du contrôle qualité des compléments alimentaires à base d'extraits de plantes. *Anal. Chim. Acta*. 2018; 1036:1–15
26. Fibigr, J., Šatínský, D., & Havlíková, L. (2018). Risk assessment of herbal food supplements: a review. *Food & Chemical Toxicology*, 121, 232–240.
27. Fuller, R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut Microbes*, 2(1), 58–65.
28. Ganguly, N. K., Bhattacharya, S. K., & Sesikeran, B. (2011). Guidelines for evaluation of probiotics in food. *Indian Journal of Medical Research*, 134, 22–25.
29. Ghasmi, M., Ghasemi, Y., Moradi, H. R., Yousefi, G., & Mobasher, M. (2017). Coacervation complex for probiotic encapsulation. *Food Research International*, 95, 69–75.
30. Giraud, S. (2002). *Encapsulation des composés volatils : techniques et applications*. Lavoisier.

31. Goh, C.H., Heng, P.W.S., & Chan, L.W. (2012). Alginates as a matrix for microencapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 1–12.
32. Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), 330–347.
33. Graveland-Bikker, J.F., & de Kruif, C.G. (2006). Self-assembled protein nanotubes. *PNAS*, 103(44), 15800–15805.
34. Gupta, P. K., Hung, C. T., Perrier, D. G., & Cohen, S. (2001). Controlled-release delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 75(1–2), 1–14.
35. Ha, H. K., Kim, H. S., Lee, W. J., Kim, J. H., & Lee, S. J. (2013).  $\beta$ -lactoglobulin–chitosan complex nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(33), 8014–8021.
36. Hanumantharaju, K. N., Nanje Gowda, N. A., Gurikar, C., & Vandana, H. B. (2021). *Overview on application of encapsulation technologies for active food ingredients*. November 2021.
37. Hanumantharaju, N., Nanje Gowda, N. A., Gurikar, C., & Vandana, H. B. (2021). Encapsulation techniques and their application. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 34–42.
38. Heinzen, C. (2002). Microencapsulation in food industry. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 13(2), 29–33.
39. Hij Machinery. (2019). *Soft capsule manufacturing in nutraceuticals*. [Site industriel].
40. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B. ... & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: 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.
41. Hong, S. H., Lee, S. H., Lee, M. Y., & Lee, S. Y. (2016). Chitosan nanocarriers for lutein delivery. *Food Chemistry*, 211, 1–8.
42. Huang, X., Li, R., Xia, N., & Chen, L. (2012). Soy protein-based delivery systems. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 89–98.
43. Ilic, I., Govedarica, B., Dreu, R., Srcic, S., & Parojcic, J. (2009). Spray chilling technique. *Journal of Microencapsulation*, 26(4), 307–317.
44. Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Encapsulation efficiency of food bioactives. *Drying Technology*, 26(7), 816–835.
45. Jeong, S. H., Jang, D. J., Kim, J. H., Jin, S. G., & Kim, D. D. (2003). Microsphere formation for hydrophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 259(1–2), 79–91.

46. Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J. F., & Kasapis, S. (2012). Pea protein-based microcapsules. *Food Research International*, 47(1), 130–136.
47. Kailaku, S. I., Hermanto, S., Nurhidayat, N., & Rianingsih, L. (2014). Encapsulation of green tea extract using chitosan. *International Food Research Journal*, 21(1), 399–405.
48. Kailasapathy, K. (2009). Encapsulation of probiotic bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1), 48–61.
49. Karaca, A. C., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2013). Lentil and chickpea proteins for encapsulating flaxseed oil. *Food Research International*, 52(2), 437–444.
50. Karleskind, A., Bricout, J., & Fouret, G. (2013). Compléments alimentaires : composition, usage et réglementation. *Revue Française de Nutrition*, 67(3), 115–123.
51. Karleskind, A., Bricout, J., & Fouret, G. (2013). *Les compléments alimentaires : composition, efficacité, innocuité*. Paris : Lavoisier - Tec & Doc.
52. Kenyon, B. (1995). Gum Arabic–maltodextrin blends. *Journal of Food Technology*, 40(6), 45–52.
53. Kerdudo, A. (2014). *Encapsulation des actifs cosmétiques : intérêt et techniques*. Université d'Angers.
54. Kerhaili, R. (2005). *Les amidons modifiés dans l'encapsulation alimentaire*. *Revue des Industries Alimentaires*, 122(4), 35–40.
55. Khaldi, K., Boutaleb, C., & Hadjadj, L. (2020). *Encapsulation de Lactobacillus acidophilus par la technique d'extrusion : étude de la viabilité et des propriétés physico-chimiques des microcapsules*. *Revue des Bioressources*, 10(2), 45–53.
56. Khalfaoui, H. (2018). *Besoins nutritionnels selon les âges et les états physiologiques*. *Annales de Médecine*, 42(4), 297–305.
57. Khosravi, M., Yousefi, G., Shakeri, A., & Ehsani, A. (2014). Starch–chitosan nanoparticles for controlled release. *Carbohydrate Polymers*, 102, 932–940.
58. Kim, E. K., Lee, S. J., Kim, J. Y., & Park, J. H. (1996). Encapsulation of orange oil with WPI. *Journal of Food Science*, 61(3), 559–563.
59. Kodama, K., Inoue, S., & Matsumoto, M. (2004). Functional properties of dietary supplements. *Journal of Clinical Nutrition*, 78(2), 324–330.
60. Kodama, K., Inoue, S., & Matsumoto, M. (2004). *Nutraceuticals and functional foods: Their role in improving health and preventing disease*. Tokyo: International Life Sciences Institute (ILSI)

61. Koh, J., Lim, J. Y., Lee, Y., & Kim, K. H. (2022). A comprehensive overview of microencapsulation technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 280–295.
62. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14(8), 737–743.
63. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on probiotic survival. *International Dairy Journal*, 14(8), 737–743.
64. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2006). Alginate–chitosan capsules for probiotics. *Journal of Microencapsulation*, 23(3), 302–310.
65. Lab-cmcpharma. (2024). *Fiche technique : comprimés nutraceutiques*. [Catalogue en ligne].
66. Lab-Eric Favre. (2024). *Catalogue des sirops et solutions buvables enrichies*. [Fournisseur].
67. Lab-new galencica. (2024). *Ampoules orales et nutraceutiques liquides*. [Catalogue].
68. Lab-pharmacieloreto. (2024). *Formats galéniques : présentation des sticks et packings unidose*. [Fiche produit].
69. Lab-phytoceutic. (2024). *Gélules végétales gastro-résistantes*. [Notice].
70. Lafaurie. (2021). *Compte-gouttes et solutions orales dans les compléments alimentaires*. [Documentation technique].
71. Liang, L., Tajmir-Riahi, H.A., & Subirade, M. (2008–2011). Multiple studies on  $\beta$ -lactoglobulin–bioactive interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56–59.
72. Lilly, D.M., & Stillwell, R.H. (1956). Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 123(3197), 747–748.
73. Liu, J., Ru, Q., & Ding, Y. (2014). Soy proteins for hydrophobic compound encapsulation. *Food Hydrocolloids*, 38, 342–350.
74. Liu, Y., Ying, D., Sun, D., & Sanguansri, L. (2016). Encapsulation of curcumin by WPI. *Food Chemistry*, 199, 709–715.
75. Loch, J. I., Bonczar, G., & Wzorek, A. (2013).  $\beta$ -lactoglobulin as a nano-carrier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4225–4233.
76. Lopez, C. A., Vázquez, M., & Pilosof, A. M. R. (2013). Mixed alginate matrices. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 1201–1209.
77. Ma, M., Jin, Y., & Tang, Q. (2014). Encapsulation materials for food bioactives. *Trends in Food Science & Technology*, 35(2), 144–155.
78. Madene, A. (2006). Encapsulation of food ingredients. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(1), 1–21.

79. Manna, M., Han, G., Seo, Y.S., & Park, J. (2021). The role of lactic acid bacteria fermentation in food safety. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1–13.
80. Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., & Huis in 't Veld, J. H. J. (2003). Survival of probiotic strains in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 17(7), 101–110.
81. Masson, L. (2009). *Équilibre nutritionnel et prévention des maladies chroniques. Cahiers de Santé Publique*, 6(1), 15–22.
82. McClements, D. J., Decker, E. A., Weiss, J., & Kamal-Eldin, A. (2007). Delivery systems for functional food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611–649.
83. Microencapsulating Alginate-Based Polymers for Probiotics Delivery... (PMC, 2022) *L'alginate est un polymère de choix pour la microencapsulation des probiotiques, avec des taux de survie élevés dans le tractus digestif et lors du stockage.*
84. Microencapsulation of probiotics using sodium alginate (SciELO, 2015) *L'alginate de sodium est reconnu pour sa biocompatibilité et sa capacité à protéger les probiotiques contre les conditions environnementales adverses.*
85. Muzzarelli, R.A.A. (2013). Chitosan in food and pharmaceuticals. *Marine Drugs*, 11(3), 615–651.
86. Nazeri, S., Ebrahimnezhad, Y., Javadzadeh, Y., & Hamishehkar, H. (2009). Classification of food supplements based on function. *Journal of Functional Foods*, 2(4), 245–252.
87. Nelson, G. (2002). Microencapsulation in textiles. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1-2), 55–62.
88. Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2012–2014). Multiple publications on plant proteins for encapsulation. *Food Hydrocolloids*, 27–40.
89. Ninane, N., Chevalier, I., Dubois, E., & Leroy, F. (2009). Histoire et définition des probiotiques. *Revue de Biotechnologie Appliquée*, 13(2), 78–83.
90. O'zgül, O., & Mustafa, O. (2005). Maltodextrin-based encapsulants. *Food Engineering Reviews*, 3(3), 157–165.
91. Oliveira, A., Coelho, M., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2007). Pectin-based encapsulation of probiotics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 269–274.
92. Otlés, S. (2013). *Probiotics and Functional Foods*. CRC Press.
93. Parker, R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29, 4–8.

94. Pastor-Cavada, E., et al. (2010). Soy proteins as functional materials. *Food Chemistry*, 122(1), 145–153.
95. Pedrini, P., Leuenberger, M., Thöny-Meyer, L., & Meile, L. (2014). Encapsulation of antioxidants in yeast. *Food Chemistry*, 156, 375–382.
96. Pejcz, E. (2024). *Les facteurs influents sur l'efficacité des probiotiques tout au long de la chaîne de production*. *Revue Européenne de Biotechnologie Alimentaire*, 19(1), 112–119.
97. Pham-Hoang, B.N., et al. (2013). Yeast-derived microcapsules for active delivery. *Journal of Microencapsulation*, 30(4), 316–324.
98. Pisani, M., Fanni, A., & Farris, G. A. (2006). SEM analysis of microcapsules. *Micron*, 37(6), 566–572.
99. Poe, S.L. (2000). *Immobilisation cellulaire : principes et applications*. Éditions Universitaires.
100. Rashidinejad, A., Bahrami, A., Rehman, A., & Jafari, S. M. (2020). Coacervation in food-grade delivery systems. *Food Hydrocolloids*, 98, 105303.
101. Reineccius, G.A. (1991). Flavor encapsulation techniques. *Food Reviews International*, 7(1), 147–176.
102. Renard, D., & Reddy, R. (2007). Biopolymères pour l'encapsulation. *Revue de Chimie Alimentaire*, 84(1), 42–48.
103. Rezgui, A., Toumi, A., & Bouricha, S. (2021). Probiotic encapsulation improves gut microbiota and reduces inflammation in Wistar rats. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(6), 1823–1831
104. Richard, J. (2000). *Encapsulation et libération contrôlée*. Dunod.
105. Rodrigues, M. I., Grosso, C. R. F., & Hubinger, M. D. (2012). Rapeseed proteins in delivery systems. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 282–289.
106. Sabaghi, M., Yousefi, G., Mahoonak, A. S., & Ghorbani, M. (2015). Chitosan-based encapsulation of tea antioxidants. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 261–267.
107. Sato K.; Kodama K.; Sengoku S. (1969). Caractéristiques de l'entreprise et adoption de bonnes pratiques de fabrication pour les compléments alimentaires au Japon. *Int. J. Environ. Rés. Santé publique*
108. Sato, K., Inoue, H., & Nakamura, Y. (1969). Microbial safety of herbal supplements. *Journal of Food Protection*, 32(8), 1085–1090.
109. Sébastien, G., Alliot, J., & Lemoine, M. (2013). Probiotiques et microbiote intestinal. *Revue Médicale Suisse*, 9(393), 1086–1091.

110. Shaikh, J., Bhosale, R., Singhal, R. S., & Paradkar, A. (2006). Starch derivatives for flavor encapsulation. *Food Chemistry*, 102(4), 1263–1270
111. Shank, J.L. (1976). Encapsulation by yeast. *Applied Microbiology*, 32(3), 412–418.
112. Sharif, H. R., Williams, P. A., Sharif, M. K., Abbas, S., & Majeed, H. (2017). Recent advances in protein-based encapsulants. *Food Hydrocolloids*, 64, 229–243.
113. Shi, L. E., Li, Z. H., Zheng, W., Zhang, T. T., & Yu, W. W. (2007, 2008). Yeast cell wall as encapsulant. *Food Chemistry*, 104(2), 733–739.
114. Shiga, H., Yoshii, H., & Furuta, T. (2001). Protection of volatiles with gum–maltodextrin blends. *Journal of Food Engineering*, 47(2), 89–93.
115. Sneharani, A. H., Karakkat, J. V., Singh, S. A., & Rao, A. G. A. (2009). Casein–curcumin interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9544–9550.
116. Song, X., Zhao, Y., Hou, S., Xu, F., & Zhao, R. (2012). Alginate encapsulation for curcumin delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 8(4), 610–617.
117. Specos, M. M., García, J. J., Tornesello, J., Marino, P., & Vecchione, C. (2010). Cotton fabrics with citronella microcapsules. *Parasitology Research*, 106(4), 861–865.
118. Stevanović, M., & Uskoković, D. (2007). Encapsulation of vitamin C. *International Journal of Pharmaceutics*, 345(1–2), 109–117.
119. Tambade, S. A., Shaikh, M., Gade, A. K., & Rai, M. (2020). Encapsulation of propolis in soy isolates. *Food Chemistry*, 310, 125910.
120. Tamer, C.E. (2016). Encapsulation strategies in green chemistry. *Trends in Food Science & Technology*, 53, 98–107.
121. Tamm, F., Lesmes, U., Schmitt, C., & Weiss, J. (2016). Pea protein–pectin conjugates for spray drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(4), 878–888.
122. Tang, C.H., & Li, X.R. (2013). Microencapsulation using soy protein. *Trends in Food Science & Technology*, 29(2), 108–119.
123. Théo, M. (2017). *Les protéines dans la nutrition sportive*. *Revue Sport & Santé*, 25(1), 38–42.
124. Valette, B. (2015). *Supplémentation en vitamines et minéraux : intérêt et précautions*. *Cahiers de Biologie Clinique*, 59(2), 123–130.
125. Van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (1995). Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Advances in Dental Research*, 9(1), 24–31.

126. Vandamme, T. F., Brobeck, L., & Maincent, P. (2007). Nanoparticules et microencapsulation. *Revue de Pharmacie Galénique*, 61(3), 189–202.
127. Varela-Pérez, R., García, A. M., Martínez, M. A., & Fernández, R. (2022). Fermentation lactique et applications industrielles des bactéries lactiques. *Microorganisms*, 10(3), 589.
128. Wee, Y.J., Kim, J.N., & Ryu, H.W. (2006). Fermentative production of lactic acid. *Biotechnology Letters*, 28(6), 451–456.
129. Whelehan, M., Marison, I. W., & Walker, G. M. (2011). Microparticle technology for drug delivery. *Drug Delivery and Translational Research*, 1(1), 3–13.
130. Yang, L., Chu, J. S., Fix, J. A., & Huang, L. (2001). Microspheres for drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research*, 57(4), 622–631.
131. Yong, Y. H., Moorthy, I. G., Choo, W. S., & Yusof, Y. A. (2010). Thermal stability of curcumin in protein matrices. *Food Chemistry*, 120(3), 744–751.
132. Zou, Q., Zhao, Y., & Wang, P. (2011). Chitosan–alginate beads for probiotics. *Journal of Food Engineering*, 105(3), 466–472.

#### Site web

1. <http://e-biblio.univ-mosta.dz/bitstream/handle/123456789/1224/CD40.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
2. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0283745>
3. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9144165/>
4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23817092/>
5. <https://www.cofpack.com/>
6. <https://www.fit-zone.net/>
7. <https://www.laprovence.com/>
8. <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/9/2215>
9. <https://www.nutricia.fr/>
10. <https://www.scielo.br/j/cr/a/bs7XDdXw86mFr7FgbrwkFRm/>
11. <https://www.sciopen.com/article/10.26599/FSAP.2024.9240090>

# *Annexes*

## Les compositions des milieux de culture

### Milieu gélose MRS (Man Rogosa et Sharpe)

Les composants	Quantité en gramme
Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	2 g
Mg SO <sub>4</sub>	0,25 g
Mn SO <sub>4</sub>	0,058 g
Tween 80	1,0 ml
pH	6,5

### Bouillon phosphate saline PBS

Les composants	Quantité en gramme
NaCl	8 g
Kcl	0,20 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,44 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,24 g
Eau distillée	1000 ml