

■  
■  
■  
■  
**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

# Thèse

## Thèse

*Présentée par*

**Gildas Komenan GBASSI**

*Pour obtenir le grade de*

**Docteur de l'Université de Strasbourg**

*Discipline : Chimie*

## **Aspects physicochimiques de l'encapsulation et de la désencapsulation des probiotiques**

Soutenue publiquement le 30 novembre 2010 devant la commission d'examen:

Pr. Eric Marchioni  
Pr. Thierry Vandamme  
Pr. Remi Saurel  
Pr. Samir Benayache  
Dr. Philippe Andre  
Dr. Dalal Aoude-Werner

Directeur de thèse  
Directeur de thèse  
Rapporteur externe  
Rapporteur externe  
Examineur  
Examineur

Ce travail de thèse a été réalisé conjointement au Laboratoire de Chimie Analytique des Molécules Bioactives (UMR 7178) et au Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives (UMR 7199). Ce travail a donné lieu à 2 publications dans des revues spécialisées à comité de lecture, ainsi qu'à 3 communications sous forme de posters aux congrès internationaux organisés par le groupe de recherche sur la bioencapsulation (éditions 2007, 2008 et 2009). Les références complètes de ces publications et communications sont détaillées en annexe de ce manuscrit.

## Remerciements

Mes premiers remerciements vont à l'endroit de mes deux encadreurs, les professeurs Eric Marchioni et Thierry Vandamme, qui m'ont accueilli dans leurs laboratoires respectifs, et m'ont exprimé leur confiance en me permettant d'effectuer ce travail de thèse. Vous m'avez aidé durant ces années de thèse à développer une rigueur scientifique et un esprit critique. Je garderai un souvenir de mon passage ici, qui j'en suis convaincu, me sera d'une utilité tout au long de ma carrière professionnelle.

Je suis très sensible à l'honneur que me font les professeurs Remi Saurel (Université de Bourgogne, Dijon, France) et Samir Benayache (Université Mentouri, Constantine, Algérie) en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont à l'endroit du Dr Philippe Andre, qui de façon spontanée, s'est prêté à certaines de mes questions sur la microbiologie, et qui a accepté volontiers de siéger dans ce jury de thèse, ainsi qu'au Dr Dalal Aoude-Werner qui a également accepté de siéger dans ce jury.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers monsieur Denis HEISLER, directeur de l'Ecole Doctorale des Sciences Chimiques de Strasbourg, pour m'avoir mis en contact avec de nombreux directeurs de laboratoire, dans ma recherche initiale d'un laboratoire d'accueil.

J'exprime ma reconnaissance au Dr Saïd Ennahar pour avoir accepté de se joindre à ce travail. Merci d'avoir pris le temps de porter un jugement sur l'ensemble de la production scientifique issue de ce travail (résumé de congrès, proposition d'articles, mémoire de thèse).

Ma reconnaissance va également à l'endroit du Pr Jean Yves PABST (Doyen de la faculté de pharmacie de Strasbourg) pour ses conseils, son soutien et ses encouragements continus.

Un grand merci aux personnes ci-dessous : Dr Béatrice Heurtault (UMR 7199, Faculté de Pharmacie), Dr Nadia Messadeq (Service de microscopie électronique, IGBMC), Dr Clarisse Maechling (UMR 7081, Faculté de Pharmacie), Dr Bruno Kieffer (UMR 7104, ESBS), Cyril Antheaume (Service Commun d'Analyse, Faculté de Pharmacie) pour m'avoir aidé à

## Remerciements

comprendre le bien fondé et la pertinence des techniques de caractérisation des interactions moléculaires.

Merci au personnel enseignant de mes laboratoires d'accueil avec qui j'ai eu à échanger dans le cadre de mon travail (Martine pour les questions de statistique, Françoise pour la détermination de la teneur en azote totale des protéines, Nicolas tout récemment sur les techniques d'émulsion).

Merci à tous les doctorants que j'ai côtoyés au cours de cette thèse, des anciennes (Amandine, Diane et Esther) pour m'avoir aidé à m'intégrer, à ceux de ma promotion (Julie, Pierre, Mustafa), et à ceux qui seront encore là pour quelques années (Carole, Céline, Elie, Erwan, Etienne, Li, Omar, Zhou).

La vie se déroulant également en dehors du laboratoire, merci à tous les amis des Doctoriales<sup>®</sup> d'Alsace 2007, du Nouveau Chapitre de la Thèse (ABG 2009), et à tous ceux qui ont contribué à rendre mon séjour à Strasbourg agréable.

Enfin, un merci spécial à ma mère, mon épouse et mes enfants qui n'ont cessé de me soutenir, et à ma famille plus élargie, même si la distance a fait que je n'ai pu vous voir fréquemment. Je terminerai par remercier mes responsables de l'UFR des sciences pharmaceutiques de l'université de Cocody (Côte d'Ivoire), notamment les professeurs Yolou Seri (Directeur du Laboratoire de Chimie générale et minérale) et Malan Anglade (ancien Doyen de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques), pour avoir autorisé ma si longue absence, malgré mes charges d'enseignement.

## Liste des abréviations

<b>°C :</b>	Degré Celsius
<b>% :</b>	Pourcentage
<b>ADN :</b>	Acide Desoxyribonucléique
<b>AFSSA :</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
<b>AG :</b>	Acide Galacturonique
<b>ARN :</b>	Acide Ribonucléique
<b>ARNr :</b>	ARN ribosomal
<b>ATCC :</b>	American Type Culture Collection
<b>CCRC :</b>	Culture Collection and Research Center
<b>CIP :</b>	Collection de l'Institut Pasteur
<b>cm :</b>	Centimètre
<b>DM :</b>	Degré de Methylation
<b>DSMZ :</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<b>EDTA:</b>	Ethylene Diamine Tetra Acetic
<b>EFSA:</b>	European Food Safety Authority
<b>FAO :</b>	Food and Agriculture Organization (United Nations)
<b>GRAS:</b>	Generally Recognized As Safe
<b>g :</b>	Gramme
<b>g/L :</b>	Gramme par Litre
<b>h :</b>	Heure
<b>ISO :</b>	International Standard Organization
<b>JOCE :</b>	Journal Officiel de la Communauté Européenne
<b>JOUE :</b>	Journal Officiel de l'Union Européenne
<b>KDa :</b>	Kilodalton
<b>LDL :</b>	Low Density Lipoprotein
<b>log<sub>10</sub> :</b>	Logarithme Décimal
<b>M :</b>	Molarité ou concentration molaire
<b>MM :</b>	Masse Moléculaire
<b>MSDA :</b>	Manuel Suisse des Denrées Alimentaires
<b>m/v :</b>	Masse sur Volume
<b>MEB :</b>	Microscope Electronique à Balayage
<b>min :</b>	Minute
<b>mL :</b>	Millilitre
<b>mm :</b>	Millimètre
<b>MRS :</b>	de Man, Rogosa et Sharp
<b>mV :</b>	Millivolt
<b>NCIMB :</b>	National Collection of Industrial and Marine Bacteria
<b>NCYS :</b>	National Collection of Yeast Cultures
<b>nm :</b>	Nanomètre
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PAGE :</b>	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<b>PBS :</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>pH :</b>	Potentiel Hydrogène
<b>SDS :</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>UFC :</b>	Unité Formant une Colonie
<b>UFC/g :</b>	UFC par Gramme
<b>UFC/mL :</b>	UFC par Millilitre
<b>µL :</b>	Microlitre
<b>V :</b>	Volt

## Liste des figures

- Figure 1.** Schéma de l'appareil digestif de l'homme.
- Figure 2.** Schéma des compartiments de l'appareil digestif de l'homme et leurs microflore.
- Figure 3.** Classification des différentes allégations.
- Figure 4.** Schéma du positionnement des aliments fonctionnels.
- Figure 5.** Procédé d'encapsulation des bactéries par les techniques d'extrusion et d'émulsification.
- Figure 6.** Monomères et séquences de la chaîne d'alginate.
- Figure 7.** Principales étapes de la gélification des alginates.
- Figure 8.** Structure de l'acide galacturonique des pectines.
- Figure 9.** Structure et différents types de carraghénanes.
- Figure 10.** Mécanisme de gélification des kappa et iota carraghénanes.
- Figure 11.** Structure tridimensionnelle d'un monomère de bêta-lactoglobuline.
- Figure 12.** Schéma du procédé d'encapsulation des souches de *L. plantarum*
- Figure 13.** Influence du pH sur le potentiel zêta des dispersions aqueuses de biopolymères.
- Figure 14.** Influence du pH sur l'absorbance des dispersions aqueuses de biopolymères.
- Figure 15.** Représentation graphique de la taille particulaire de dispersions aqueuses d'alginate et de protéines de lactosérum.
- Figure 16.** Images macroscopiques de billes fraîchement élaborées.
- Figure 17.** Images de microscopie électronique à balayage de billes lyophilisées.
- Figure 18.** Profil électrophorétique d'un échantillon de protéines de lactosérum incubé pendant 4 heures dans un liquide acide artificiel.
- Figure 19.** Profil électrophorétique d'un échantillon de bêta-lactoglobuline incubé pendant 4 heures en présence d'enzymes et de sels biliaires.
- Figure 20.** Morphologie des billes d'alginate.
- Figure 21.** Vue interne des billes d'alginate non imprégnées et imprégnées.
- Figure 22.** Vue externe des billes d'alginate non imprégnées et imprégnées.
- Figure 23.** Spectres infra rouge des billes d'alginate de calcium lyophilisées
- Figure 24.** Dispositif expérimental de simulation gastro-intestinale.
- Figure 25.** Effets du pH sur la survie des bactéries encapsulées.
- Figure 26.** Effets du pH, des enzymes et sels biliaires sur la survie des bactéries encapsulées.
- Figure 27.** Influence de la matrice alimentaire sur la survie de *L. plantarum* 299v encapsulée.

## Liste des tableaux

**Tableau 1.** Principaux milieux artificiels utilisés pour la simulation du liquide gastrique.

**Tableau 2.** Principaux milieux artificiels utilisés pour la simulation du liquide intestinal

**Tableau 3.** Principaux microorganismes considérés comme probiotiques.

**Tableau 4.** Principales allégations attribuées à *L. plantarum* 299v après des études *in vivo* chez l'homme.

**Tableau 5.** Synthèse des avis rendus par l'AFSSA depuis 2002 sur les dossiers scientifiques portant sur des produits probiotiques à usage humain.

**Tableau 6.** Principales sources de polymères naturels.

**Tableau 7.** Composition en protéines de lactosérum du lait bovin.

**Tableau 8.** Influence de l'acidité du liquide gastrique sur la survie des souches libres de probiotiques.

**Tableau 9.** Conditions expérimentales utilisées pour l'élaboration des billes de biopolymères.

**Tableau 10.** Tolérance à l'acidité (pH 1,8) des souches non encapsulées de *L. plantarum*.

**Tableau 11.** Tolérance à l'acidité (pH 3) des souches non encapsulées de *L. plantarum*.

**Tableau 12.** Evaluation de la taille particulaire de dispersions aqueuses diluées d'alginate de sodium et de protéines de lactosérum.

**Tableau 13.** Conditions expérimentales dans le modèle gastro-intestinal.

**Tableau 14.** Concentrations résiduelles de *L. plantarum* dans les billes non imprégnées (pH 1,8)

**Tableau 15.** Concentrations résiduelles de *L. plantarum* dans les billes non imprégnées (pH 3)

**Tableau 16.** Concentrations résiduelles de *L. plantarum* dans les billes imprégnées (pH 1,8)

**Tableau 17.** Concentrations résiduelles de *L. plantarum* dans les billes imprégnées (pH 3)

**Tableau 18.** Vérification de la viabilité des bactéries après incubation des billes durant 2 h

**Tableau 19.** Vérification de la viabilité des bactéries après incubation des billes durant 2,25 h

# **TABLE DES MATIÈRES**

AVANT-PROPOS	2
Remerciements	3
Liste des abréviations	5
Liste des figures	6
Liste des tableaux	7
INTRODUCTION GÉNÉRALE	9
CHAPITRE 1: CONTEXTE DE L'ÉTUDE	13
1. Physiologie de l'appareil digestif humain	14
2. Microflore intestinale et probiotiques	29
3. Méthodologie de l'encapsulation des probiotiques	47
CHAPITRE 2: ENCAPSULATION DES PROBIOTIQUES	65
1. INTRODUCTION	66
2. MATÉRIELS ET METHODES	67
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	85
4. CONCLUSION	106
CHAPITRE 3: DÉSENCAPSULATION ET DEVENIR DES PROBIOTIQUES	107
1. INTRODUCTION	108
2. MATÉRIELS ET METHODES	109
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	118
4. CONCLUSION	132
CONCLUSION GÉNÉRALE	133
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	138
ANNEXES (Liste des communications et publications scientifiques)	158
RÉSUMÉ COURT (versions française et anglaise)	160

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

## Introduction générale

Les études réalisées ces dernières années dans le domaine de l'encapsulation ont porté sur de nombreux ingrédients bioactifs de natures diverses (vitamines, enzymes, principes actifs médicamenteux, cellules dérivées du foie ou du pancréas, probiotiques etc). Toutefois, peu d'études ont été consacrées à la protection des probiotiques par encapsulation, à la stabilité des systèmes de protection mis en œuvre, et à la libération des probiotiques encapsulés dans un modèle simulant le système digestif (Chandramouli *et al.*, 2004; Picot et Lacroix, 2004; Madureira *et al.*, 2005; Mainville *et al.*, 2005). L'utilisation de l'encapsulation comme moyen de protection des probiotiques dans les aliments, ainsi que l'évaluation de la stabilité de ces probiotiques au sein de la matrice alimentaire, ont fait l'objet de peu d'études (Sultana *et al.*, 2000; Sun et Griffiths, 2000; Picot et Lacroix, 2004; Michida *et al.*, 2006; Nebesny *et al.*, 2007).

La tolérance des probiotiques (à l'état non encapsulé) aux conditions environnementales (pH acide, température, enzymes, sels biliaires etc) a été largement décrite dans la littérature (Sultana *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2002; Lian *et al.*, 2003; Krasaekoopt *et al.*, 2004 ; de Giulio *et al.*, 2005; Saarela *et al.*, 2006; Ding et Shah, 2007; Champagne et Gardner, 2008). Bien que les techniques d'encapsulation soient des procédés de longue date, le besoin de comprendre le processus de désencapsulation (libération) des probiotiques encapsulés demeure un challenge. Rares sont les études qui ont été consacrées aux aspects physicochimiques de cette désencapsulation.

L'engouement suscité par l'encapsulation des probiotiques date des années 1980. En effet, les premiers travaux publiés ont porté sur les ferments lactiques du yaourt, à savoir *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Ces espèces lactiques ont été piégées dans des hydrogels d'alginate de calcium (Prevost *et al.*, 1985). D'autres espèces de ferments lactiques ont aussi été piégées dans des hydrogels d'alginate de calcium (Prevost et Divies, 1987; Steenson *et al.*, 1987; Audet *et al.*, 1991). D'autres encore l'ont été dans des hydrogels à base d'un mélange de carraghénane et de gomme caroube (Audet *et al.*, 1988).

A partir des années 1990 sont apparues de nouvelles formes galéniques capables d'immobiliser les ferments lactiques. Ce sont notamment les billes (Divies *et al.*, 1990; Lacroix *et al.*, 1990; Kearney *et al.*, 1990; Champagne *et al.*, 1992a) et les capsules (Yoshioka *et al.*, 1990; Cheong *et al.*, 1993; Yoo *et al.*, 1996). Le cœur d'une capsule est un liquide enveloppé d'une membrane de biopolymère. D'après Yoo *et al.* (1996), la croissance des

## Introduction générale

cellules est beaucoup plus importante dans les capsules. Toutefois, ces capsules demeurent instables après la production d'acide lactique par les cellules au cours de la fermentation. La mise au point des capsules fait appel aux techniques d'émulsification (Arnaud *et al.*, 1992; Poncelet *et al.*, 1999). L'ajout de tensioactifs est fortement conseillé pour stabiliser l'émulsion en formation (Sheu *et al.*, 1993; Yoo *et al.*, 1996; Keব্য *et al.*, 1998). Parfois, des solvants organiques (glutaraldéhyde, hexaméthylène-1-6 diisocyanate, toluène 2-4 diisocyanate) ont été utilisés au cours de l'émulsification comme agents de réticulation (Groboillot *et al.*, 1993; Hyndman *et al.*, 1993).

A l'opposé des capsules se trouvent les billes qui sont formées d'une matrice (Totosaus *et al.*, 2002). La stabilité de la matrice dépend des caractéristiques physicochimiques du biopolymère (composition chimique, masse moléculaire etc). Elle dépend aussi du type d'interactions (interactions électrostatique, hydrophobe, covalente etc) que peut établir le biopolymère dans des conditions de température, de pH, de force ionique ou de salinité du milieu (Totosaus *et al.*, 2002; Draget *et al.*, 2009). L'apparition dans les années 1990 d'une génération de bioréacteurs, équipés de multiples aiguilles, a permis de produire à l'échelle industrielle des billes de kappa-carraghénane (Hunik *et Tramper*, 1993) et d'alginate (Seifert *et Philips*, 1997a ; Brandenberger *et Widmer*, 1998).

Certains de ces bioréacteurs ont produit des billes de 800 µm de diamètre (Seifert *et Philips*, 1997a). D'autres par contre ont produit des billes d'environ 470 µm de diamètre, avec une capacité de production de 50 billes par seconde (de Vos *et al.*, 1997). Brandenberger *et Widmer* (1998) ont proposé un bioréacteur capable de générer des billes d'un diamètre moyen de 340 µm, pour un traitement de 5 litres de suspension par heure. En général, ces bioréacteurs affichent les paramètres rhéologiques et viscoélastiques de la suspension, permettent une stérilisation interne des aiguilles par une vapeur à 120°C, procèdent à l'enrobage des billes après leur formation. L'absence de contamination croisée est aussi un des avantages majeurs de la plupart de ces bioréacteurs. Malgré la performance de ces derniers, leur coût élevé limite leur utilisation dans les laboratoires universitaires.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'encapsuler des probiotiques, afin de les protéger, mais surtout, de déterminer les conditions de leur libération dans des situations expérimentales bien déterminées. Les travaux expérimentaux de cette thèse sont exposés dans les chapitres 2 et 3 de ce manuscrit. Le chapitre 2 traite de l'encapsulation des probiotiques.

## Introduction générale

Ce chapitre se focalise sur les conditions de fabrication des billes à base de biopolymère, de même que sur les conditions de leur optimisation. Des paramètres physicochimiques (charge électrique, turbidité, taille particulaire, pH) des biopolymères en suspension ont été déterminés. Ce chapitre se termine par un examen macroscopique et microscopique des billes fabriquées. Le chapitre 3 s'est intéressé au pouvoir de protection des billes fabriquées. Le niveau de protection des probiotiques immobilisés dans les billes a été évalué. L'incubation des billes dans des milieux artificiels simulant des conditions gastrique et/ou intestinale a été réalisée. Le pouvoir de protection des billes a aussi été évalué au sein d'un environnement simulant une matrice alimentaire. Enfin, un modèle expérimental du tractus gastro-intestinal artificiel a permis de déterminer les conditions de libération des probiotiques encapsulés.

Toutefois, un chapitre 1 bibliographique dénommé "Contexte de l'étude" a passé en revue les principales fonctions de l'appareil digestif qu'il convient de rappeler, étant donné que la sphère digestive est le lieu de prédilection des probiotiques. Les milieux artificiels simulant l'appareil digestif, ainsi que la microflore intestinale dont est issue une bonne partie des probiotiques, ont également été abordés. L'intérêt de la protection des probiotiques par encapsulation, de même que les méthodes et matériaux d'encapsulation applicables aux probiotiques, viennent mettre un terme à ce chapitre.

# **CHAPÎTRE 1:**

# **CONTEXTE DE L'ÉTUDE**

## 1. Physiologie de l'appareil digestif humain

Tous les organismes vivants ont un appareil spécialisé dans la digestion et l'absorption des nutriments. Cet appareil diffère d'une espèce à une autre dans son anatomie et l'organisation de ses fonctions. C'est ainsi que chez l'homme, la fermentation des fibres a lieu dans le côlon (partie terminale du tube digestif faisant suite à l'intestin grêle) alors qu'elle a lieu chez les ruminants dans le rumen (partie située au début du tube digestif avant l'intestin grêle) (Cuillierier et Marteau, 2002). Une bonne connaissance de la physiologie de l'appareil digestif humain est indispensable si on désire utiliser des modèles *in vitro* pour simuler le système digestif. Chez l'homme, l'appareil digestif représenté à la figure 1, est composé du tube digestif et des glandes annexes. Ces dernières comprennent les glandes salivaires, le foie et le pancréas.

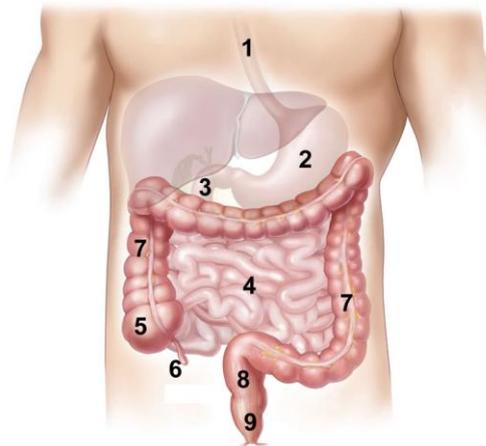


Figure 1. Schéma de l'appareil digestif de l'homme  
(d'après Cuillierier et Marteau, 2002)

- (1) Oesophage (2) Estomac (3) Duodénum
- (4) Jéjunum + Iléon (5) Caecum (6) appendice
- (7) Côlon (8) Rectum (9) Anus

La morphologie et la structure du tube digestif varient d'une personne à une autre en termes de dimension et de zone de surface d'absorption (Desesso et Jacobson, 2001). Le tube digestif permet l'absorption sélective de nutriments nécessaires au maintien d'un état nutritionnel adéquat (Cuillierier et Marteau, 2002). L'absorption n'est possible, en règle générale, que pour de petites molécules. Une digestion préalable des aliments est nécessaire pour les transformer en nutriments absorbables. La motricité permet de contrôler le temps de

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

résidence des aliments dans les différents compartiments du tube digestif (estomac, intestin grêle et côlon). Le tube digestif de l'homme assure plusieurs fonctions.

### 1.1. Fonction de digestion

La digestion est la dépolymérisation des molécules complexes ingérées, suivie de leur transformation en nutriments simples absorbables. Elle est facilitée par la mastication préalable et les mouvements de trituration et de brassage des aliments. Elle fait appel à des enzymes et à des sécrétions non enzymatiques qui maintiennent le chyme à l'état liquide. La salive est le premier lubrifiant des aliments. Elle contient l'amylase salivaire qui débute la digestion de certains aliments comme les amidons. La salive contient aussi une lipase dite linguale qui agit uniquement au niveau de la cavité buccale (Cook *et al.*, 1994), et qui hydrolyse une très faible quantité de triglycérides (moins de 2%) en acides gras libres (Armand, 2008). Dans l'estomac, les sécrétions gastriques sont le résultat de cellules spécialisées dans la production d'acide chlorhydrique.

Le pH acide de l'estomac participe à la dénaturation des constituants alimentaires (cas de certaines protéines comme l'albumine bovine sérique). D'autres cellules sécrètent la pepsine: une protéase dont l'activité est optimale à des pH compris entre 1,7 et 3,5 (Hersey, 1994; Tobey *et al.*, 2001). Il existe une lipase gastrique (Canaan *et al.*, 1999) qui hydrolyse 25 à 40% des triglycérides dans l'estomac (Armand, 2008), libérant des acides gras libres directement absorbés dans la muqueuse gastrique. Carriere *et al.* (2000) ont étudié les effets des lipases gastrique et intestinale chez des volontaires sains, après leur avoir fait absorber un repas lipidique solide et/ou liquide (repas principalement riche en triglycérides).

La recherche des produits du catabolisme des triglycérides (diglycérides, monoglycérides, acides gras libres) à la sortie de l'estomac et au niveau du duodénum a été le principal indicateur du degré de lipolyse. Les auteurs ont rapporté (en se référant aux masses moléculaires des composés détectés) la présence de triglycérides, de diglycérides, de monoglycérides et d'acides gras libres dans les liquides gastriques et duodénaux. Dans l'intestin, les enzymes pancréatiques sont nombreuses et de structures variées (Coan et Travis, 1972; Terata et Nakanuma, 1995; Rose *et al.*, 2003).

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

On distingue les enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidases etc), les enzymes lipolytiques (lipase, phospholipase etc), les enzymes glycolytiques (amylase) et les enzymes nucléolytiques (ribonucléase, DNase etc). La bile quant à elle est sécrétée par le foie, et est stockée dans la vésicule biliaire sous la forme d'acides biliaires (Hoffmann, 1994a). Déversés dans le duodénum, les acides biliaires sont présents dans les autres compartiments de l'intestin grêle, et en faible concentration dans le côlon (Hoffmann, 1994b). Les acides biliaires ont un rôle essentiel dans l'émulsification des graisses. L'émulsion qui en résulte est attaquée par les lipases pancréatiques. Ces dernières terminent la digestion des matières grasses, et conduisent à la formation d'acides gras libres, de monoglycérides et de lysophospholipides (Armand, 2008).

### 1.2. Fonction d'absorption

L'absorption est le processus qui permet le passage sélectif des nutriments dans la circulation sanguine. Elle a lieu pour l'essentiel dans l'intestin grêle. Les mécanismes d'absorption diffèrent selon les substances absorbées (Leverve, 1999). Dans le cas des protéines, leur digestion aboutit à la libération de peptides et d'acides aminés qui sont absorbés au niveau des entérocytes de l'intestin grêle, par un mécanisme actif impliquant un transporteur et un apport d'énergie. Le transporteur est différent selon qu'il s'agisse d'acides aminés neutres, acides ou basiques (Gardner, 1994). L'absorption des peptides est quantitativement très faible, mais reste possible (Gardner, 1994; Chabance *et al.*, 1998).

L'absorption des lipides fait intervenir des mécanismes complexes. Leur solubilisation sous la forme de micelles nécessite une quantité suffisante de sels biliaires dans la lumière intestinale. Les micelles se dissocient par la suite, facilitant le passage des constituants lipidiques dans la membrane des entérocytes, à l'exclusion des sels biliaires qui restent dans la lumière intestinale.

Dans l'entérocyte s'effectue la synthèse de triglycérides et d'apolipoprotéines. L'association de triglycérides, d'apolipoprotéines, de phospholipides et de cholestérol forme les chylomicrons (Tso, 1994). L'absorption des glucides comme le glucose, le galactose et le fructose se fait principalement au niveau du duodénum et du jéjunum (respectivement premier et deuxième compartiment de l'intestin grêle). Le glucose et le galactose sont absorbés selon

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

un mécanisme actif alors que l'absorption du fructose se fait par diffusion facilitée. Les glucides non absorbés arrivent dans le côlon où ils sont hydrolysés en sucres simples sous l'action de la microflore colique (Cummings, 1995). Au niveau des minéraux, l'absorption est fonction de la nature du minéral impliqué. L'exemple du fer montre que ce dernier est absorbé au niveau du duodénum et du jéjunum, selon un processus actif régulé en fonction de l'état des stocks de fer (Andrew, 1999). L'absorption du fer dépend de sa forme physicochimique. Le fer organique lié à l'hémoglobine est absorbé plus vite que le fer inorganique ferreux, ce dernier encore plus rapidement que le fer ferrique.

Les vitamines hydrosolubles sont absorbées dans le duodénum et le jéjunum à l'exception de la vitamine B<sub>12</sub>. Cette dernière est absorbée grâce à un récepteur spécifique présent dans l'iléon (troisième compartiment de l'intestin grêle). Les vitamines liposolubles (A, D, E, K) sont absorbées avec les lipides. Cette absorption dépend de la présence de sels biliaires et de la formation de micelles (Cuillierier et Marteau, 2002). L'eau et les électrolytes comme le Na<sup>+</sup> sont absorbés par voie essentiellement paracellulaire (par les pores des jonctions serrées) selon un gradient d'osmolarité. La perméabilité à l'eau varie selon les sites du tube digestif: elle est très faible dans l'estomac mais importante dans l'intestin grêle et le côlon (Cuillierier et Marteau, 2002).

### 1.3. Fonction de motricité

La motricité digestive permet le brassage du chyme, mais surtout, le contrôle du temps de résidence des aliments dans chaque compartiment du tube digestif. Au niveau du pharynx et de l'œsophage sont mis en œuvre différentes activités motrices. Ces activités, contrôlées par le système nerveux central, permettent d'acheminer rapidement les aliments dans l'estomac (Dent et Holloway, 1996). La fonction motrice de l'estomac se manifeste dans la digestion des aliments. L'estomac joue un rôle de réservoir et intervient dans le brassage et le broyage des aliments. La vidange gastrique dépend du volume de l'aliment présent et de sa composition. La vidange des liquides est plus rapide que celle des solides (Malmud et al., 1982). La régulation de la motricité et de la vidange gastrique est complexe (Cuillierier et Marteau, 2002). Les différentes activités motrices de l'estomac assurent le passage du contenu du bol alimentaire vers le duodénum.

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

L'intestin grêle facilite le mélange de l'aliment avec les sécrétions enzymatiques et biliaires, et favorise la progression de l'aliment vers le côlon (Bassotti *et al.*, 1999; Rao, 2009). Le côlon, dans les conditions physiologiques, remplit une triple fonction. La première est l'achèvement de l'absorption de l'eau, des électrolytes et des sels biliaires non absorbés dans l'intestin grêle. La seconde est la fermentation des résidus glucidiques, source de facteurs trophiques pour la muqueuse colique, et d'énergie pour l'organisme. La troisième est le stockage des résidus de la digestion (Ducrotte et Gourcerol, 2005).

L'activité motrice du côlon intervient dans la progression du contenu intestinal et dans la fonction de réservoir (Camilleri et Ford, 1998). La motricité colique varie au cours du nyctémère: elle est faible pendant le sommeil, elle augmente après les repas ou lors d'une activité physique. L'anus et le rectum ont pour fonction essentielle d'assurer la continence ou la défécation. Leur motricité et leur physiologie s'articulent autour d'un équilibre entre ces deux fonctions. Ces fonctions sont sous le contrôle de l'individu qui choisit de répondre ou non à ce besoin en fonction des conditions dans lesquelles il se trouve (Ducrotte et Gourcerol, 2005).

### 1.4. Fonction de barrière sélective

Le tube digestif est équipé de nombreux moyens de défense contre des microorganismes pathogènes (Marteau, 2000b). La motricité gastro-intestinale est un moyen de contrôle des populations bactériennes dans l'intestin. L'acidité de l'estomac est une barrière à la survie des microorganismes. Toutefois, certains microorganismes peuvent survivre durant la traversée de l'estomac, grâce à une capacité intrinsèque élevée de résistance à l'acidité, ou à la faveur d'une baisse de la sécrétion acide de l'hôte, ou bien à la protection conférée par certains aliments à pouvoir tampon élevé (Mahida *et al.*, 1997; Marteau, 2000b).

Les sécrétions acides, biliaires et enzymatiques ont des effets bactériostatiques voire bactéricides. Le mucus exerce des propriétés d'adhérence en mimant les récepteurs bactériens. La flore endogène s'oppose le plus souvent à la colonisation du tube digestif par des microorganismes étrangers. Ces différents moyens de défense constituent des barrières de protection. En cas de rupture de cette barrière, il est possible d'assister à une prolifération de microorganismes pathogènes dans le côlon, c'est le cas notamment de *Clostridium difficile* (Marteau, 2000c). D'autres moyens de défense existent et se rapportent à l'immunité digestive

(Mestecky, 1998). En effet, l'intestin est le premier organe immunitaire de l'organisme. Sa muqueuse renferme environ 60% des cellules immunitaires qui assurent deux types de réponse immunitaire. La réponse immunitaire à médiation cellulaire qui est assurée par les lymphocytes T de la muqueuse intestinale, et la réponse immunitaire à médiation humorale qui est assurée par des anticorps, principalement des immunoglobulines de type A (Mestecky, 1998; Cellier *et al.*, 2000).

### 1.5. Appareil digestif et milieux artificiels simulés

Dans la littérature scientifique, des modèles expérimentaux de simulation gastro-intestinale ont été décrits. Ces modèles évaluent la tolérance des microorganismes à l'acidité, à la bile et aux enzymes. On retrouve globalement deux types de modèles expérimentaux, mieux connus sous les appellations de "modèle conventionnel" et de "modèle dynamique". Le modèle dynamique diffère du conventionnel par son caractère semi-automatisé. Différentes approches de simulation ont été proposées. Le modèle conventionnel simule soit la partie gastrique du tube digestif, soit la partie intestinale.

De façon générale, le modèle conventionnel est constitué d'un réacteur contenant le liquide artificiel. Par contre, le modèle dynamique est constitué de plusieurs réacteurs. Le réacteur est le plus souvent un récipient en verre (bécher, erlenmeyer) ou non (tube Falcon, microplaque etc). A l'origine, le modèle dynamique était composé de cinq réacteurs interconnectés. Les réacteurs 1 et 2 ont respectivement simulé l'estomac et l'intestin grêle, alors que les réacteurs 3, 4 et 5 ont simulé les trois compartiments du côlon (côlon ascendant, côlon transverse et côlon descendant) (Molly *et al.*, 1993). Par la suite, le modèle est passé à quatre réacteurs qui ont simulé cette fois-ci l'estomac, et les trois compartiments de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) (Minekus *et al.*, 1995). Les modèles proposés par la suite sont passés à deux réacteurs, dont l'un a permis de simuler l'estomac et l'autre la partie supérieure de l'intestin grêle (Mainville *et al.*, 2005).

Le récent modèle proposé par Barmpalia-Davis *et al.*, (2008), plus élaboré dans son architecture, comprenait les éléments suivants: deux réacteurs d'une capacité de 500 mL, quatre pompes péristaltiques, deux pH-mètres et un bain-marie stabilisé à 37°C. Le réacteur 1 a simulé l'estomac, le réacteur 2 a simulé toute la partie intestinale. La pompe 1 a délivré un aliment liquide dans le réacteur 1 (estomac). La pompe 2 a transféré l'aliment liquide du

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

réacteur 1 vers le réacteur 2 (partie intestinale). La pompe 3 a délivré la bile dans le réacteur 2. La pompe 4 a aussi délivré des sécrétions pancréatiques dans le réacteur 2. Le pH-mètre 1 a contrôlé le pH du réacteur 1 et le pH-mètre 2 a contrôlé celui du réacteur 2. L'ensemble du dispositif a été couplé à un ordinateur central.

Un modèle dynamique de simulation exclusive des différents compartiments du côlon a été décrit dans la littérature (Macfarlane *et al.*, 1998; FSA, 2005). Quel que soit le type de modèle utilisé, celui-ci doit contenir un liquide de simulation gastro-intestinale. Les principaux liquides artificiels utilisés pour la simulation de la partie gastrique sont détaillés dans le [tableau 1](#).

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

Tableau 1. Composition des principaux milieux utilisés pour la simulation du liquide gastrique.

Nature et composition du milieu	pH	Concentration en pepsine (g/L)	Volume (mL)	Durée de l'exposition (min)	Références
Milieu à base de NaCl (2 g/L)	1,55	0	10	120	Krasaekoopt et al. (2004)
	1,55	0	10	180	Lee et Heo (2000)
	2	0	5	60	Annan et al. (2008)
	2 et 3	0	10	120	Hansen et al. (2002)
Milieu à base de NaCl (5 g/L)	2	3	10	60	Chen et al. (2006)
	2	3	2	180	Michida et al. (2006)
	2 et 3	3	10	240	Lian et al. (2003)
Milieu à base de NaCl (8,5 g/L)	2,5	3	np	90	de Giulio et al. (2005)
	1,5 ; 2 et 3	3	np	90	Izquierdo et al. (2008)
	2	0	30	120	Shima et al. (2006)
Milieu à base de NaCl (9 g/L)	1,8	3	10	120	Gbassi et al. (2009)
Milieu à base de HCl (3,65 g/L)	1,1	0	10	120	Graff et al. (2008)
	1,9	0,26	80	30	Picot et Lacroix (2004)
	1 et 2	0	np	120	Favaro-Trindade et Grosso (2002)
Milieu à base de MRS (55 g/L)	2	0	np	120	Ding et Shah (2007)
Milieu à base de peptone (7,5 g/L)	1 ; 2 et 3	0,3	10	20	FSA (2005)
Milieu à base de fromage (8,5 g/L)	2,5 et 3	0,016	np	120	Madureira et al. (2005)
	2 et 3	0	np	180	Vinderola et al. (2000)
Milieu contenant glucose (3,50 g/L) NaCl (2,05 g/L) KCl (0,37 g/L) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,60 g/L) CaCl <sub>2</sub> (0,11 g/L) bile de porc (0,05 g/L) et lysosyme (0,10 g/L)	2	0,013	np	90	Corcoran et al. (2005)
Milieu contenant lait écrémé (12 g/L) glucose (2 g/L) extraits de levures (1 g/L) et cystéine (0,05 g/L)	2 et 3	0	10	60	Chandramouli et al. (2004)
	2 et 3	0	10	180	Sultana et al. (2000)

(np) non précisé

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

A la lecture du [tableau 1](#), il est évident que les milieux proposés sont de nature et de composition variables. Ces milieux ont été utilisés pour étudier la tolérance des probiotiques à l'acidité. Une préférence pour le milieu NaCl a été constatée. Plus de la moitié des auteurs l'ont proposé. Il est à noter que les concentrations de 2 et 5 g/L de NaCl utilisées semblent insuffisantes pour maintenir l'isotonie du milieu. En effet, dans le contexte d'une cellule, le compartiment intracellulaire et le compartiment extracellulaire sont séparés par une membrane plasmique semi-perméable.

Pour les solutés qui ne peuvent traverser passivement la membrane plasmique, il s'applique alors le phénomène d'osmose. L'eau va diffuser vers le compartiment qui est le plus concentré pour diluer le soluté qui ne peut traverser la membrane plasmique, et remédier ainsi à la différence de concentration en solutés de part et d'autre de la membrane. Une solution isotonique par rapport au milieu intracellulaire contient une quantité de solutés dissous égale à celle du cytoplasme.

Dans les procédures microbiologiques nécessitant l'utilisation de diluant isotonique, le sérum physiologique à 0,9% (9 g/L de NaCl) est utilisé pour la suspension et/ou la dilution de microorganismes non exigeants. Il est également utilisé pour la préparation de suspension de cellules microbiennes, comme les suspensions de bactéries. Il a été recommandé par la société américaine de microbiologie dans les tests de tolérance aux substances antimicrobiennes ([Gerhardt, 1981](#); [Chapin et Lauderdale, 2003](#)). Les auteurs ont rapporté que le phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) peut être ajouté au milieu NaCl pour le tamponner. Dans ce cas, la concentration en NaCl doit être ramenée entre 8 et 8,5 g/L.

Le NaCl fournit un milieu isotonique qui maintient l'intégrité et la viabilité des cellules microbiennes. En outre, les phosphates garantissent une valeur de pH physiologique stable (entre 5,8 et 7,4) à cause de leur pouvoir tampon, ce qui participe au maintien de la viabilité des cellules. Cette stabilité du pH est perturbée dès lors que le milieu est acidifié, à des pH semblables à ceux rencontrés dans le liquide gastrique.

L'utilisation d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique en tant que milieu gastrique artificiel peut être préjudiciable à la survie des microorganismes, du fait d'un manque d'isotonie. Les milieux à base de MRS et de peptone, ainsi que les milieux contenant des ingrédients alimentaires (fromage, lait écrémé), au-delà des éléments nutritifs qu'ils peuvent

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

procurer à la cellule, peuvent se révéler instables en cas de modification du pH. C'est le cas de certaines protéines comme l'albumine bovine sérique qui est hydrolysée en milieu acide. Concernant le degré d'acidité des milieux proposés, il est à noter que les valeurs de pH varient entre 1 et 3. Cet intervalle de pH couvre les valeurs de pH généralement observées au niveau gastrique chez l'homme (Lubran, 1966).

Au cours d'une investigation clinique portant sur l'évaluation du degré d'acidité du liquide gastrique humain, Lubran (1966) a dosé par titrimétrie 177 échantillons de liquide gastrique, prélevés par intubation, chez des sujets sains. L'auteur a rapporté que les valeurs de pH obtenues étaient toutes inférieures à 3, et a mis en évidence trois valeurs fréquentes (pH à 1,02; 1,50 et 2,39). L'absence de données récentes sur les valeurs de pH du liquide gastrique témoigne de la complexité de la mesure de l'acidité gastrique chez l'homme (Lubran, 1966; Christiansen, 1967).

L'un des obstacles à la mesure de l'acidité gastrique demeure l'échantillonnage. En effet, la technique d'aspiration du liquide gastrique (par intubation) est une contrainte à la sélection de potentiels volontaires sains. Le second obstacle se rapporte au dosage de l'acidité du liquide gastrique et à l'interprétation des résultats de ce dosage. Le liquide gastrique est un mélange d'acide fort (acide chlorhydrique) et d'acides faibles (acides organiques comme l'acide citrique) (Lubran, 1966).

Le dosage de l'acide chlorhydrique, qui est un bon indicateur de l'acidité gastrique, reflète mieux la réalité lorsque le point final du dosage est fixé à pH 3,5 (Lubran, 1966; Christiansen, 1967) et non à pH 7 (Bock, 1962; Baron, 1963). Pour Pratha *et al.* (2001), la production inconstante d'acide chlorhydrique dans l'estomac ne permet pas de garantir un pH stable. L'instabilité du pH gastrique est également dû au volume de liquide gastrique qui n'est pas toujours constant à la sortie de l'estomac (Pratha *et al.*, 2001). En pratique, la mesure du pH demeure le procédé en vigueur pour déterminer le degré d'acidité d'un milieu gastrique artificiel.

Dans le [tableau 1](#), la pepsine a parfois été utilisée comme modèle d'enzyme gastrique. Des divergences ont été notées quant à la concentration de pepsine utilisée. Les données de la littérature sur la physiologie digestive mentionnent la présence de pepsine au niveau gastrique (Hersey, 1994; Tobey *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2007). Par contre, aucune information n'est à ce jour disponible sur la concentration exacte de cette enzyme au niveau gastrique. Cela

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

s'explique par le fait que la pepsine est sécrétée sous la forme de pepsinogène (forme inactive) qui est ensuite activée en pepsine en fonction du pH du milieu (Hersey, 1994). L'activité de la pepsine nécessite un  $\text{pH} < 5,6$ . Cette activité est optimale pour des valeurs de pH comprises entre 1,7 et 3,5 (Hersey, 1994; Tobey et al., 2001). Tout milieu gastrique artificiel doit donc inclure cette enzyme dans sa composition.

S'agissant du volume de liquide gastrique utilisé pour la simulation *in vitro*, de nombreux auteurs ont omis de le mentionner dans leurs publications (Vinderola et al., 2000; Favaro-Trindade et Grosso, 2002; Corcoran et al., 2005; Madureira et al., 2005; de Giulio et al., 2005; Ding et Shah, 2007; Izquierdo et al., 2008). Toutefois, un volume de 10 mL a été rapporté dans la plupart des études. Ce volume bien que trop faible pour représenter le liquide gastrique, peut cependant se justifier par des besoins d'économie en consommables (réactifs, enzymes etc) et de praticabilité lors des manipulations. Les données de la littérature sont quasi-inexistantes en ce qui concerne le volume d'un estomac rempli ou à jeun.

Enfin, pour ce qui est de la durée d'incubation dans les milieux artificiels, il a été observé des divergences. Une durée de 120 min a été notée dans 40% des cas. Des durées de 180 min (20% des cas) ou de 60 et 90 min (15% des cas) ont également été observées. Des durées de 20 min (FSA, 2005) ou de 30 min (Picot et Lacroix, 2004) sont trop faibles, largement en deçà de la durée du séjour de l'aliment dans l'estomac. A l'opposé, une durée de 240 min dans le milieu gastrique artificiel apparaît excessive (Lian et al., 2003). En effet, Malmud et al. (1982) au cours d'une étude clinique, ont montré qu'une durée de 120 min était nécessaire pour assurer la vidange gastrique de 60% d'un repas semi-solide, et de 90% d'un repas liquide. Graff et al. (2000) ont aussi montré qu'une durée moyenne de 120 min dans l'estomac était nécessaire pour assurer la vidange de la moitié de son contenu (aliment semi-solide). Une étude menée chez des sujets d'un plus jeune âge (5 à 10 ans) a conclu à une durée moyenne de 107 min pour assurer la vidange de la moitié du contenu de l'estomac de ces enfants, après absorption d'un repas semi-solide (Singh et al., 2006). Une durée d'incubation de 120 min est donc raisonnable pour le séjour des probiotiques dans un milieu gastrique artificiel.

Dans le [tableau 2](#) sont présentés les milieux artificiels utilisés pour la simulation de la partie intestinale. Les milieux contenant uniquement la bile en solution aqueuse n'ont pas été répertoriés dans ce tableau. En effet, la bile ne saurait représenter à elle seule le liquide

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

intestinal simulé. Dans l'intestin grêle se trouvent la bile et le suc pancréatique. Ce dernier contient des enzymes pancréatiques (Cuillierier et Marteau, 2002; Ouwehand et Vesterlund, 2003). Les études associant la présence de bile et d'au moins une enzyme pancréatique ont été privilégiées.

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

Tableau 2. Composition des principaux milieux utilisés pour la simulation du liquide intestinal.

Nature du milieu	pH	Concentration en bile (g/L)	Concentration en enzymes (g/L)		Volume (mL)	Durée de l'exposition (min)	Références
			Pancréatine	Trypsine			
Milieu à base de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2,84 g/L)	7,5	150	1,95	0	np	360	Picot et Lacroix (2004)
Milieu à base de PBS (1 mol/L)	8	1	1	0	np	120	FSA (2005)
Milieu à base de PBS (np)	7,4	2	1	0	np	180	Duc et <i>al.</i> (2004)
Milieu à base de NaCl (5 g/L)	8	45	1	0	np	180	Michida et <i>al.</i> (2006)
Milieu à base de NaHCO <sub>3</sub> (25,2 g/L)	6,5	40	3,5	0,1	np	240	Barmpalia-Davis et <i>al.</i> (2008)

np (non précisé), PBS (phosphate buffered saline) définit en réalité un milieu composé de plusieurs sels (Gerhardt, 1981; NCCLS, 2000; Chapin et Lauderdale, 2003).

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

A la lecture du tableau 2, on remarque que les milieux utilisés sont à base de sels de sodium (phosphate, chlorure et carbonate). Si le chlorure de sodium à 9 g/L a été recommandé par la société américaine de microbiologie pour son caractère isotonique (Gerhardt, 1981 ; Chapin et Lauderdale, 2003) et le phosphate conseillé pour son effet tampon, peu d'informations sont disponibles quant à l'utilisation du carbonate de sodium. Les sels de sodium ont été utilisés à des concentrations diverses (2,84 g/L pour le phosphate de sodium; 5 g/L pour le chlorure de sodium et 25,2 g/L pour le carbonate de sodium).

L'utilisation du phosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) à la concentration de 6,8 g/L a été mentionnée dans la littérature (Krasaekoopt et al., 2004). Le PBS utilisé à la concentration de 1 mol/L prête à confusion. Le terme PBS (*phosphate buffered saline*) désigne un milieu salin tamponné en phosphate. En réalité, c'est un milieu qui est composé principalement de NaCl auquel d'autres sels ont été ajoutés. On y retrouve du NaCl (8,5 g/L), du  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,1 g/L) et du  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,32 g/L) (Gerhardt, 1981). Parfois, il est composé de NaCl (8 g/L), de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1,44 g/L) et de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,24 g/L) (Chapin et Lauderdale, 2003). Il est parfois utilisé à tort pour désigner une solution aqueuse contenant exclusivement du chlorure de sodium (Shima et al., 2006). Dans bien des cas, la composition du PBS n'a pas été mentionnée (Duc et al., 2004; FSA, 2005). De plus, c'est un milieu dont les concentrations en sels peuvent être ajustées, ou complétées par d'autres sels, en fonction des besoins recherchés (NCCLS, 2000).

Les valeurs de pH utilisées par les différents auteurs sont comprises entre 6,5 et 8. Ces valeurs reflètent bien le pH habituellement retrouvé au niveau de l'intestin grêle (Vandamme et al., 2002). La durée d'incubation des probiotiques dans le liquide intestinal artificiel a été de 120, 180, 240 voire 360 min. L'absence de données scientifiques publiées sur la durée de transit dans l'intestin grêle peut expliquer les différences de durée d'incubation constatées. Toutefois, une étude clinique non confirmée, conduite par Graff et al. (2000), a montré qu'il faut en moyenne 4 h (240 min) pour qu'un aliment semi-solide et radiomarqué parcourt les différents compartiments de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon et caecum). Des études complémentaires menées avec plusieurs aliments (solide et liquide) sont nécessaires pour valider de telles informations.

Pour ce qui est de la concentration en bile et en enzymes, aucune donnée publiée à ce jour ne permet de préciser les teneurs exactes, ce qui peut expliquer les variations énormes constatées d'un auteur à un autre (1, 2, 40, 45 et 150 g/L dans le cas de la bile).

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

De nombreux auteurs se sont limités au test de tolérance à la bile pour présager du comportement des probiotiques dans l'intestin. Différents liquides biliaries (bile porcine, bile bovine, bile oxgall<sup>®</sup>, sels biliaries) ont été utilisés à diverses concentrations et durées d'incubation. Une très grande disparité tant des concentrations que des durées d'incubation a été notée: 3 g/L durant 2 h d'incubation (Madureira *et al.*, 2005), 5 et 10 g/L durant 3 h (Hansen *et al.*, 2002) ou 6 h (Hansen *et al.*, 2002; Chandramouli *et al.*, 2004), 6 g/L durant 2,5 h (Krasaekoopt *et al.*, 2004) ou 6 et 12 h (Lee et Heo, 2000), 6 et 20 g/L durant 4 h (Lian *et al.*, 2003), 10 et 20 g/L durant 3 h (Sultana *et al.*, 2000) et 30 g/L durant 4 et 8 h (Ding et Shah, 2007).

En se référant aux principales fonctions de l'appareil digestif humain décrit précédemment, il semble impossible de mimer les aspects mécaniques de la digestion (mouvements de broyage, de trituration et de péristaltisme etc). Par contre, la simulation des aspects physicochimiques de la digestion (pH, température, présence de bile et d'enzymes pancréatiques etc) apparaît être un moyen simple de reproduire de façon artificielle les conditions dans l'estomac ou dans l'intestin grêle. Les études résumées dans les tableaux 1 et 2 le montrent clairement. Ces études font également ressortir l'absence de protocole standard dans l'évaluation de la tolérance des probiotiques aux conditions gastrointestinales. La recherche d'un consensus dans la mise en place d'un protocole standard devra se faire dans le respect des conditions du tractus gastro-intestinal. La durée d'incubation, le choix des valeurs de pH, la présence d'enzymes gastrique et intestinale, la présence de bile sont des facteurs essentiels dont il faut tenir compte. Ces facteurs doivent refléter autant que possible la réalité chez l'homme.

## 2. Microflore intestinale et probiotiques

### 2.1. Composition et fonctions de la microflore intestinale

Les animaux ainsi que les êtres humains vivent en équilibre avec une flore microbienne extrêmement dense et variée qu'ils abritent pour l'essentiel dans la cavité de leur tube digestif. Cette flore représente un écosystème très complexe dont la composition est extrêmement stable chez un individu donné, mais très variable d'un individu à un autre, en fonction notamment des habitudes alimentaires (Tannock, 1999). Si l'on exclut la bouche, directement en contact avec le milieu extérieur, les populations bactériennes présentes dans le tube digestif augmentent progressivement de l'estomac jusqu'au côlon (figure 2).

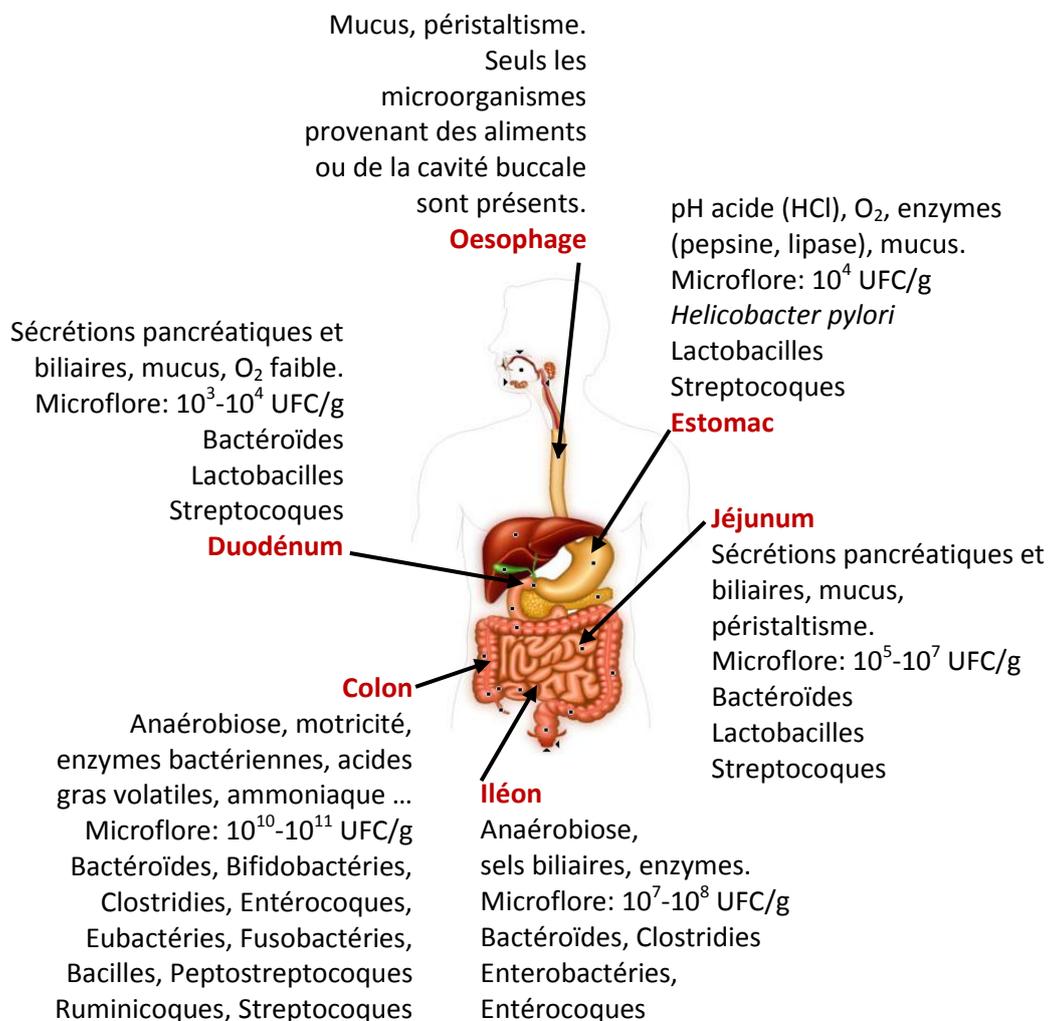


Figure 2. Schéma des compartiments de l'appareil digestif de l'homme et leurs microflores (adapté de Ouwehand et Vesterlund, 2003)

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

Comme le montre la [figure 2](#), l'environnement gastro-intestinal comprend trois régions principales (estomac, intestin grêle et côlon) qui offrent des conditions très différentes pour la survie des microorganismes. Dans le premier compartiment qu'est l'estomac, la prolifération microbienne est fortement réduite à cause de l'oxygène apporté par la déglutition et par la présence d'une forte acidité. L'estomac héberge sélectivement les microorganismes qui tolèrent l'acidité du milieu et qui vivent en aérobiose. C'est le cas par exemple de *Helicobacter pylori* (bactérie pathogène) qui est responsable des ulcères gastriques et duodénaux.

Dans le deuxième compartiment qu'est l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon), la microflore est assez constante. On note par ailleurs la présence d'autres bactéries au niveau de l'iléon (bactéroïdes, clostridies, entérobactéries, entérocoques etc). Dans le dernier compartiment qu'est le côlon, le transit digestif est plus lent, et la flore microbienne est plus abondante, représentant 35 à 50 % du volume du contenu du côlon ([Cummings et al., 1989](#); [Gournier-Château, 1994](#)).

Il faut savoir qu'une partie de la flore gastro-intestinale (fraction minoritaire) demeure non cultivable et moins explorée, et ce pour diverses raisons: méconnaissance des besoins de croissance de certaines bactéries, sélectivité des milieux utilisés, stress dû aux conditions de culture, nécessité d'anaérobiose stricte, difficulté à stimuler les interactions entre les bactéries et les autres microorganismes ou les cellules de l'hôte ([Zoetendal et al., 2004](#)). La stabilité de l'écosystème intestinal est due à la présence de mécanismes de régulation et de défense propres à l'hôte ou à la microflore résidente. Les populations microbiennes affectent les fonctions digestives et la physiologie de l'épithélium intestinal par leurs activités métaboliques ([Roberfroid et al., 1995](#)). De nombreuses bactéries intestinales participent à la décomposition des substances non digérées comme les fibres, les amidons et les sucres ([Gibson et Roberfroid, 1995](#)). Une autre fonction exercée par la microflore intestinale est la stimulation du système immunitaire de l'hôte. Des études ont montré que la flore intestinale stimule l'activité phagocytaire ([Nicaise et al., 1993](#)) et la sécrétion de cytokines par les macrophages ([Nicaise et al., 1999](#)). La reconnaissance de la microflore endogène par le système immunitaire de l'hôte se traduit par la production d'anticorps locaux et systémiques ([Apperloo-Renkema et al., 1993](#)). Différents facteurs endogènes contribuent à maintenir le bon fonctionnement de la microflore, contrôlant ainsi l'homéostasie intestinale (contrôle des équilibres hydroélectrolytique et acido-basique).

Parmi ces facteurs endogènes, on retrouve le pH, les sécrétions biliaires et pancréatiques, les interactions microbiennes, le mucus et le péristaltisme (Holzapfel et al., 1998). Les facteurs exogènes comme la composition du régime alimentaire, les circonstances environnementales (antibiothérapie, chimiothérapie, stress, hygiène etc) modifient le fonctionnement de la microflore intestinale (Hopkins et al., 2002). A noter également qu'avec l'âge, il est possible d'observer une modification de la flore de putréfaction, faisant apparaître des troubles du transit, une baisse du tonus intestinal, et une sensibilité accrue aux infections.

Dans bien des cas, l'équilibre de la microflore intestinale est perturbé, favorisant la prolifération de microorganismes pathogènes, ce qui peut compromettre la santé et le bien-être de l'hôte. La restauration de l'équilibre de la microflore intestinale par l'utilisation de probiotiques apparaît être une alternative prometteuse. Les probiotiques, une fois ingérés, sont capables de régénérer la microflore et de contribuer à renforcer les défenses de l'organisme.

### 2.2. Microorganismes à activité probiotique

Le terme probiotique dérive de deux mots grecs "pros" et "bios" qui signifient littéralement "pour la vie", contrairement au terme antibiotique qui signifie "contre la vie". C'est sans doute Vergin (1954) qui a introduit pour la première fois le terme de "probiotique", en comparant dans un écrit intitulé « *Anti-und Probiotika* » les effets délétères des antibiotiques sur la flore avec les effets bénéfiques de substances produites par certaines bactéries. Quelques années plus tard, Lilly et Stillwell (1965) parlent des probiotiques comme des substances produites par des microorganismes, et qui stimulent la croissance d'autres microorganismes.

Par la suite, la définition du probiotique a privilégié la notion "*d'effet bénéfique sur la flore de l'hôte par rapport à un effet sur la croissance*". Cette définition qui a été proposée par Fuller (1989) se basait sur des études chez l'animal. Une telle définition était difficilement acceptable faute de marqueurs adéquats de l'effet sur la flore. Cette définition était également très limitative car les microorganismes peuvent agir par d'autres moyens qu'une action sur la flore.

Toutefois, cette définition indiquait déjà la recherche d'un mécanisme d'action et la flore était le premier site d'action logique. La définition actuelle des probiotiques est celle adoptée par le comité mixte d'experts FAO/WHO (2002) qui les définit comme "des

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte". Cette dernière définition implique donc de définir des critères de sélection des microorganismes à activité probiotique.

Le premier critère suggéré par [Doleyres et Lacroix \(2005\)](#) est un critère technologique: une souche probiotique doit être produite à grande échelle à partir d'un concentré de cultures viables, survivre au cours des phases de préparation et de conservation, et être stable jusqu'au moment de son utilisation. Le critère technologique doit également inclure les propriétés sensorielles ([Saarela et al., 2000](#)). Le second critère qui se rapporte à la fonctionnalité de la souche prend en compte les effets bénéfiques sur la santé ([Doleyres et Lacroix, 2005](#); [Ammor et Mayo, 2007](#)).

Les probiotiques sont principalement des bactéries et des levures. On n'en connaît pas à ce jour qui soit d'origine virale. La seule levure déclarée probiotique au jour d'aujourd'hui est *saccharomyces cerevisiae* Boulardii ([Segarra-Newnham, 2007](#)). Depuis très longtemps, les probiotiques sont consommés dans les produits fermentés, plus particulièrement dans les produits dérivés du lait ([Ballongue et al., 1993](#)). Ils bénéficient du statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Les principales espèces de microorganismes à activité probiotique sont répertoriées dans le [tableau 3](#).

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

Tableau 3. Principales espèces de microorganismes à activité probiotique (adaptés de Hozalpfel et *al.*, 1998 et Shah, 2007)

Principales espèces de bactéries lactiques			Espèces de bactéries non lactiques	Espèces de levures
Lactobacilles	Bifidobactéries	Autres bactéries lactiques		
- <i>Lactobacillus acidophilus</i>	- <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	- <i>Enterococcus faecalis</i>	- <i>Bacillus spp</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
- <i>Lactobacillus amylovorus</i>	- <i>Bifidobacterium bifidum</i>	- <i>Enterococcus faecium</i>	- <i>Escherichia coli</i> (souche nissle)	
- <i>Lactobacillus brevis</i>	- <i>Bifidobacterium breve</i>	- <i>Lactococcus lactis</i>	- <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	
- <i>Lactobacillus casei</i>	- <i>Bifidobacterium infantis</i>	- <i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
- <i>Lactobacillus cellobius</i>	- <i>Bifidobacterium lactis</i> (reclassé	- <i>Pediococcus acidilactici</i>		
- <i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> )	- <i>Sporolactobacillus inulinus</i>		
- <i>Lactobacillus curvatus</i>	- <i>Bifidobacterium laterosporus</i>	- <i>Streptococcus diacetylactis</i>		
- <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	- <i>Bifidobacterium longum</i>	- <i>Streptococcus intermedius</i>		
- <i>Lactobacillus farciminis</i>	- <i>Bifidobacterium thermophilum</i>	- <i>Streptococcus thermophilus</i>		
- <i>Lactobacillus fermentum</i>				
- <i>Lactobacillus gasseri</i>				
- <i>Lactobacillus gallinarum</i>				
- <i>Lactobacillus helveticus</i>				
- <i>Lactobacillus johnsonii</i>				
- <i>Lactobacillus paracasei</i>				
- <i>Lactobacillus plantarum</i>				
- <i>Lactobacillus reuteri</i>				
- <i>Lactobacillus rhamnosus</i>				

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

L'identification des espèces de probiotiques repose sur deux approches qui sont basées sur l'étude des caractères phénotypiques et génomiques (Charteris *et al.*, 1997; Ammor *et al.*, 2005). L'évaluation des caractères phénotypiques prend en compte les exigences nutritionnelles des microorganismes, leur tolérance à l'oxygène, leur sensibilité aux antibiotiques, ainsi que la couleur et la morphologie des colonies formées. L'évaluation des caractères génomiques (recherche d'une parenté génétique) fait appel aux techniques de biologie moléculaire, en particulier à l'hybridation des acides nucléiques: hybridation ADN/ADN et séquençage des gènes codant l'ARN ribosomal (Charteris *et al.*, 1997; Stackebrandt *et al.*, 2002; Marmonier et Teyssou, 2002).

L'activité probiotique n'est pas spécifique d'une espèce (Hozalpfel *et al.*, 1998). Elle est plutôt spécifique de la souche de microorganisme issue de l'espèce (de Vries *et al.*, 2006; Shah, 2007). Une souche par définition provient d'une succession de cultures dérivées d'une culture pure (le plus souvent une colonie parfaitement isolée). Une souche est généralement déposée dans une collection répertoriée qui lui attribue un code d'identification. La connaissance de ce code permet d'identifier la souche de façon formelle, et offre une référence par rapport à une possible évolution de la souche (Azais-Braesco, 2007).

Le fait qu'une souche dispose de noms différents prête à confusion. C'est le cas par exemple de *L. plantarum* 299v qui est répertoriée sous le nom de *L. plantarum* DSMZ 9843 (Johansson *et al.*, 1998), ou encore de *L. rhamnosus* GG qui est répertoriée sous le nom de *L. rhamnosus* ATCC 53103 (Shah, 2004). Le reclassement de souches suite à des données expérimentales récentes peut aussi prêter à confusion. C'est le cas avec *B. lactis* Bb 12 qui est désormais désignée *B. animalis* Bb 12 (Shah, 2007). En réalité, *B. lactis* et *B. animalis* appartenaient à deux espèces différentes. Aujourd'hui, ces deux espèces n'en font qu'une (*B. animalis*), celle-ci est subdivisée en deux sous-espèces. La nomenclature exacte est donc *B. animalis* subsp *animalis* et *B. animalis* subsp *lactis* (Masco *et al.*, 2004). Malgré cette précision, l'appellation *B. lactis* Bb 12 continue d'être employée dans la littérature (Ringer-Kulka *et al.*, 2009).

D'autres formes de confusion existent, notamment avec les souches commerciales. Pour des raisons de confidentialité, il est difficile d'identifier les probiotiques présents sur le marché. A titre d'exemple, la souche DN-173 010 du groupe Danone®, isolée à partir de la sous-espèce *B. animalis* subsp *animalis*, est commercialisée sous divers noms (*Bifidus*

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

*digestivum* au Royaume-Uni; *Bifidus regularis* aux États-Unis et au Mexique; *Bifidus actiregularis* dans les pays de la zone Euro etc). C'est également le cas avec la souche BB-12 du groupe Chr. Hansen®. La société continue de commercialiser sous la marque BB-12 les deux sous espèces *B. animalis* subsp *animalis* et *B. animalis* subsp *lactis*.

### 2.3. Probiotiques et allégations

Le mot "allégation" est d'origine latine, il est synonyme d'affirmation, de déclaration ou de prétention. Les allégations restent des affirmations sans preuves, jusqu'à ce qu'elles puissent être prouvées. Ce mot prend de l'ampleur dans le domaine de l'alimentation, avec le concept d'allégation nutritionnelle (énonce une propriété nutritionnelle particulière).

D'autres concepts sont apparus entre temps, à savoir les allégations fonctionnelles (décrivent l'effet d'un ingrédient sur les fonctions normales de l'organisme), les allégations santé (décrivent l'amélioration d'une fonction dans un sens favorable à la santé) et les allégations thérapeutiques (présentent l'ingrédient alimentaire comme possédant des propriétés de prévention, de traitement ou de guérison). La classification des allégations, tirée de l'annexe I des directives du codex alimentarius, est représentée à la figure 3 (Cynober, 2008).

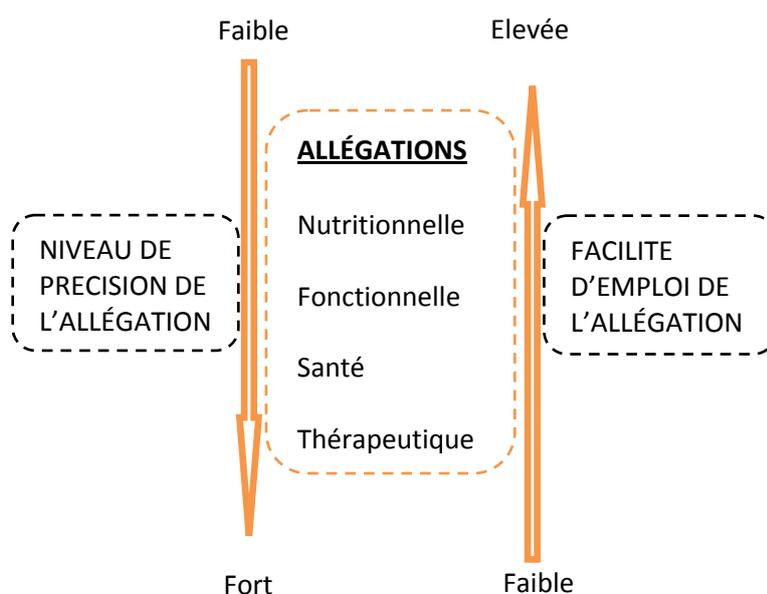


Figure 3. Classification des différentes allégations (adapté de Cynober, 2008)

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

Le codex alimentarius distingue deux catégories d'allégations santé. La première est *"toute évocation d'une amélioration d'une fonction et/ou d'un paramètre physiologique, biologique, psychologique dans le sens d'apporter une contribution positive à la santé "*. La seconde est *"toute évocation d'une relation entre un aliment ou un de ses composants et un état lié à la santé, ou relative à la réduction du risque de maladies, sans faire référence à une maladie précise"*.

En Europe, la commission européenne, appuyée par les États membres, a promulgué un règlement spécifique sur cette question, le règlement n° 1924/2006 (JOUE, 2007; Baelde, 2008; Bourlioux, 2008). Ce règlement englobe dans les allégations santé, celles qui décrivent ou mentionnent le rôle d'un nutriment ou d'une substance dans la croissance ou le développement de l'organisme, dans les fonctions psychologiques ou comportementales, dans le contrôle du poids, et dans la baisse d'un facteur de risque de maladies humaines.

En prenant en compte la *"baisse d'un facteur de risque de maladies humaines"* qui peut être assimilée à une action de prévention de survenue de maladies, la commission européenne a franchi un pas en se rapprochant de la frontière du médicament, et en interdisant par la même occasion les allégations thérapeutiques. La prévention de risque de maladies figure dans la définition du médicament. Un médicament est défini comme *"toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard de maladies humaines ou animales ..."* (article L511 du code français de la santé publique). Une législation inadéquate et des amalgames génèrent très souvent la confusion (Cynober, 2006).

De nombreux ingrédients contenus dans les aliments revendiquent des effets bénéfiques sur la santé par le biais d'allégations, et les probiotiques n'échappent pas à ce phénomène. Pour ces microorganismes, il s'agit surtout d'allégations fonctionnelles ou de santé qui méritent d'être prouvées. Il faut donc apporter la preuve du bénéfice lié à la consommation de quantités habituelles du probiotique par la population cible. Si des éléments expérimentaux sur des cellules ou des animaux sont utiles, la preuve clinique, obtenue par des études conformes à la méthodologie reconnue, est indispensable. Analysons quelques données publiées sur les effets bénéfiques ou non de quelques souches de probiotiques.

### *L. rhamnosus* GG (*L. rhamnosus* ATCC 53103)

Le premier constat qui se dégage de l'étude de cette souche est le nombre de publications scientifiques qui lui ont été consacrées. Sur l'ensemble des études publiées de 1988 à 1998 portant sur les effets des probiotiques, environ 45% ont été consacrées à *L. rhamnosus* GG (de Roos et Katan, 2000). Les auteurs ont révélé que la prise quotidienne de *L. rhamnosus* GG retarde la phase diarrhéique des infections liées au rotavirus. La preuve d'une prévention des diarrhées liées à des toxines bactériennes (*E. coli* enterotoxinogène) a été moins évidente. Une efficacité dans la lutte contre les diarrhées causées par *C. difficile* a été alléguée à cette souche (Shah, 2007).

Une autre excellente revue de la littérature est parue dans les annales de pharmacothérapie (Segarra-Newnham, 2007). L'auteur a passé en revue la littérature médicale (de janvier 1970 à mars 2007) sur l'usage de *L. rhamnosus* GG. Des études cliniques contrôlées et des études de cas-témoins ont évalué ce probiotique dans le traitement ou la prévention des épisodes aigus ou récurrents de diarrhée associée à *C. difficile*. Certaines de ces études ont montré des résultats favorables avec *L. rhamnosus* GG. Cependant, d'autres études ont mis en évidence une absence de bénéfice de ce probiotique. L'hétérogénéité de ces études a rendu toutes conclusions définitives difficiles. En outre, plusieurs cas de bactériémie (présence de bactéries dans le sang) liée à l'usage de ce probiotique ont été rapportés durant la dernière décennie. Les patients les plus fréquemment affectés par cette complication sont les immunodéprimés. Malheureusement, ces patients sont également ceux qui sont les plus exposés aux diarrhées récurrentes. En conclusion, l'auteur estime que des études additionnelles avec *L. rhamnosus* GG sont indispensables pour clarifier des questions restées sans réponse (mécanisme d'action, présence d'une bactériémie etc).

### *S. cerevisiae* Boulardii

*S. cerevisiae* Boulardii est la souche qui, avec *L. rhamnosus* GG, ont fait l'objet d'une méta-analyse (Segarra-Newnham, 2007). L'auteur a rapporté des résultats mitigés concernant cette levure, dans le traitement des diarrhées associées à *C. difficile*. Shah (2007) a plutôt rapporté des effets positifs dans le traitement des colites associées à *C. difficile*. Pour McFarland (2006), *S. cerevisiae* Boulardii aide à prévenir les diarrhées associées à une antibiothérapie, et présente une utilité dans les pathologies intestinales liées à *C. difficile*.

### *B. animalis* Bb-12

Autrefois connue sous l'appellation de *B. lactis* Bb 12, cette souche probiotique a fait l'objet de peu d'études cliniques (Malinen et al., 2002; Mohan et al., 2006, Ringer-Kulka et al., 2009). Sa principale cible est la flore endogène où elle entre en compétition avec certaines bactéries pathogènes. *B. animalis* Bb 12 a réduit le nombre d'entérobactéries et de clostridies au profit des bifidobactéries chez des enfants supplémentés (Mohan et al., 2006). Ce probiotique a eu un effet positif sur la prévention des diarrhées associées à une antibiothérapie (Shah, 2007). Il a aussi présenté un effet positif sur la physiologie digestive, en terme d'amélioration de la consistance des selles émises (Ringel-Kulka et al., 2009). Aucun effet sur la réduction de certains pathogènes résistants aux antibiotiques n'a été obtenu avec ce probiotique (Mohan et al., 2006).

A travers ces trois exemples qui mettent en évidence les effets parfois controversés des probiotiques, il est important de relativiser la portée de certains travaux, et de conserver essentiellement la littérature scientifique pertinente, en indiquant précisément quels critères ont amené à inclure telle étude et à exclure telle autre. La prise en compte des facteurs d'impact des revues à comité de lecture peut être un moyen sûr d'évaluer le niveau scientifique des travaux, même si cette approche n'est pas idéale. Pour preuve, un article publié dans le "*British Medical Journal*" (Hatakka et al., 2001) a traité de l'administration de *L. rhamnosus* GG en association d'une antibiothérapie, chez des jeunes enfants (âge moyen de 4,4 ans), afin de lutter contre des infections respiratoires et gastro-intestinales.

Le résumé des résultats de l'étude nous informe d'une baisse de 17% du nombre d'infections respiratoires, d'une baisse de 19% de l'utilisation des antibiotiques dans le groupe d'intervention, sans toutefois dire un mot sur les infections gastro-intestinales. En parcourant le contenu de l'article, on se rend compte que l'effet protecteur dans les infections gastro-intestinales n'a pas été démontré. En investiguant un peu plus encore, on note que les plaintes des enfants étaient enregistrées par les parents, ce qui laisse la porte grande ouverte à une interprétation subjective. On note également que les enfants malades étaient suivis par des médecins différents, ce qui peut influencer l'interprétation des signes cliniques observés chez chaque enfant. Aussi, sur les 571 enfants qui participaient à l'étude, 58 ont abandonné les essais sans évoquer de raisons. L'étude a conclu à une légère différence, statistiquement non significative, en faveur du groupe d'intervention (comparé au groupe placebo). Cette

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

conclusion montre que la statistique ne peut pas et ne doit pas remplacer l'interprétation clinique. Après 3 mois d'administration quotidienne de ce probiotique, le bilan est bien maigre: on peut juste s'attendre à une légère protection. Cette étude montre à quel point il est important d'analyser les données de la littérature avec tout le recul nécessaire, au risque d'aboutir à des conclusions trop hâtives ou parfois erronées, même si les travaux sont publiés dans des revues de qualité.

Le dernier exemple de probiotique est donné au [tableau 4](#). Il s'agit de *L. plantarum* 299v (*L. plantarum* DSMZ 9843). Les propriétés alléguées à cette souche sont en rapport avec la réduction du taux de cholestérol sanguin, la baisse des diarrhées associées à *C. difficile*, et la réduction probable des signes cliniques du syndrome du côlon irritable.

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

Tableau 4. Principales allégations attribuées à *L. plantarum* 299v après des études *in vivo* chez l'homme (adapté de de Vries et al., 2006).

Dose utilisée (UFC/Jour)	Nombre de sujets	Durée de la prise	Type d'études cliniques	Effets cliniques observés	Références
$2 \times 10^{10}$	26	21 jours	Essai contrôlé, randomisé, en double aveugle, versus placebo	Augmentation du contenu fécal d'acides gras à chaînes courtes	Johansson et al. (1998)
$2 \times 10^9$	32	21 jours	"	Pas d'augmentation du contenu fécal d'acides gras à chaînes courtes	Goossens et al. (2005)
$\sim 10^{10}$	30	42 jours	"	Réduction du LDL-Cholestérol (9,6%) et du fibrinogène (13,5%)	Bukowska et al. (1998)
$2 \times 10^{10}$	36	42 jours	"	Réduction du LDL-Cholestérol (11,7%) et du fibrinogène (21%)	Naruszewicz et al. (2002)
$5 \times 10^{10}$	20	38 jours	"	Baisse de 30% des diarrhées associées à <i>C. difficile</i>	Wullt et al. (2003)
$2 \times 10^{10}$	60	28 jours	"	Réduction des signes cliniques du syndrome du côlon irritable	Nobaek et al. (2000)
$2 \times 10^{10}$	40	28 jours	"	Réduction des signes cliniques du syndrome du côlon irritable	Niedzielin et al. (2001)
$6,3 \times 10^9$	12	28 jours	"	Pas de réduction des signes cliniques du syndrome du côlon irritable	Sen et al. (2002)

UFC (Unité Formant une Colonie) LDL (Low Density Lipoprotein)

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

La validité scientifique des effets cliniques observés dans le [tableau 4](#) est très variable. *L. plantarum* 299v a montré des effets controversés dans l'évaluation du contenu fécal en acides gras à chaînes courtes, de même que dans la symptomatologie du syndrome du côlon irritable (Johansson *et al.*, 1998; Goossens *et al.*, 2005; Nobaek *et al.*, 2000; Niedzielin *et al.*, 2001; Sen *et al.*, 2002). Les propriétés alléguées à ce probiotique demeurent encore à un stade hypothétique, et des études plus approfondies sont nécessaires pour apporter des preuves scientifiques plus convaincantes à ces allégations.

Dans les différents travaux mentionnés, la taille de l'échantillon pose le problème de la pertinence de certains résultats. En recherche clinique, la notion de grand ou petit échantillon repose sur la théorie statistique de l'estimation. On parle de grand échantillon quand  $N > 30$  et de petit échantillon quand  $N < 30$ .  $N$  étant le nombre de volontaires par groupes de comparaison (groupe placebo et groupe d'intervention). Dans chacune des études, la différence de taille des échantillons rend complexe la comparaison inter-études. Au problème de la taille de l'échantillon doit être ajouté le problème de sa représentativité. Cette dernière doit refléter la population à étudier. La définition de la représentativité est une question difficile à résoudre au cas par cas. En effet, il faut prendre en compte selon le paramètre à étudier, l'importance de l'âge, du sexe, du groupe ethnique, le style de vie et l'alimentation, le poids et la taille, l'environnement (climat) etc.

Dans le [tableau 4](#) sont également mentionnées la dose quotidienne ingérée et la durée de traitement. Un minimum de  $10^9$  UFC/Jour a été administré par voie orale aux volontaires, ce qui est en conformité avec certaines normes en vigueur comme celle des pays de l'union européenne (JOUE, 2004). Les études cliniques réalisées ont été contrôlées, c'est-à-dire que le produit testé a été comparé à un produit contrôle (idéalement un placebo). La randomisation est également un critère important: elle permet d'affecter au hasard les volontaires à un traitement, évitant ainsi des biais importants. Enfin, on parle d'études "en double aveugle" selon que l'affectation des sujets aux différents traitements est inconnue de tous.

Dans les études "ouvertes" ou "en simple aveugle", l'affectation des sujets est respectivement connue de tous ou connue seulement des investigateurs jusqu'à la fin du traitement des données. Les études cliniques contrôlées, randomisées, et en double aveugle présentent le meilleur niveau de qualité, et sont donc les plus recherchées (Azais-Braesco, 2007). Toutefois, elles ne sont pas toujours possibles, ni adaptées à toutes les situations, et

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

d'autres configurations peuvent tout à fait être recevables. Quelle que soit l'étude retenue, celle-ci doit respecter les règles de bonnes pratiques cliniques qui assurent l'information, l'anonymat, la liberté et la sécurité du volontaire, ainsi que la qualité de l'étude, sur les aspects traçabilité, fiabilité des résultats, et pertinence du traitement statistique.

La conduite d'une étude clinique conforme aux règles en vigueur représente un travail important et réclame un grand professionnalisme. Il est aujourd'hui impossible qu'un produit probiotique, dont l'allégation repose sur un dossier de qualité moyenne, puisse bénéficier d'une évaluation favorable par une agence nationale. Plusieurs produits contenant des probiotiques ont été récemment soumis à l'évaluation de comités d'experts. En France, sur les 8 dossiers qui ont jusqu'ici fait l'objet de l'avis de l'AFSSA (*Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*), seuls 2 ont été jugés aptes à justifier l'allégation pour laquelle ils étaient proposés à l'évaluation ([tableau 5](#)). Ces avis sont intégralement disponibles sur le site internet de l'agence. Les avis négatifs correspondent à des dossiers dont la qualité a été jugée insuffisante.

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

Tableau 5. Synthèse des avis rendus par l'AFSSA depuis 2002 sur les dossiers scientifiques portant sur des produits probiotiques à usage humain.

Date de la publication de l'avis	Type de produits	Type de probiotiques	Population visée	Allégation formulée	Décision de l'AFSSA	Quelques éléments explicatifs motivant la décision
12/11/2007	Aliment diététique	<i>L. rhamnosus</i> GG	Enfants à bas âge et nourrissons	Probiotique bon pour l'intestin	Négative	Allégation vague, imprécise et non démontrée, aucune preuve de l'activité du probiotique sur une longue période
14/10/2005	Complément alimentaire	<i>L. rhamnosus</i> GG + <i>L. acidophilus</i> R52	Enfants à bas âge et nourrissons	Probiotique d'emploi sécurisé	Négative	Allégation vide de sens, nécessité de conduire des études cliniques afin d'évaluer le bénéfice/risque
16/12/2004	Produit laitier	<i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i> + <i>B. lactis</i> Bb 12	Adultes, enfants, adolescents	Aide à renforcer les défenses naturelles	Négative	Absence d'études cliniques réalisées avec le produit fini sur la population cible, posologies non justifiées
15/12/2004	Aliment diététique	<i>L. rhamnosus</i> GG	Enfants à bas âge et nourrissons	Aide à lutter contre les allergies liées aux protéines de vache	Négative	Absence de preuves cliniques, arguments scientifiques suggestifs
22/03/2004	Aliment diététique	<i>B. lactis</i> Bb 12	Enfants à bas âge et nourrissons	Participe au bon fonctionnement du tube digestif	Positive	Allégation acceptable d'un point de vue scientifique
04/03/2004	Complément alimentaire	<i>P. freudenreichii</i> shermanii	Enfants de plus de 3 ans et adultes	Stimule la flore intestinale bifide	Négative	Absence de preuves scientifiques incontestables, conditions d'emploi insuffisamment argumentées
23/01/2003	Produit laitier	<i>L. casei</i> DN 114-001	Enfants de plus de 3 ans et adultes	Participe à renforcer les défenses naturelles	Positive	Nombreuses études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> attestant de l'efficacité de la souche sur la flore intestinale
08/10/2002	Complément alimentaire	<i>L. acidophilus</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>L. casei</i> + <i>S. thermophilus</i> + <i>S. cremoris</i> + <i>E. faecum</i>	Enfants de plus de 3 ans et adultes	Multiplés allégations portant sur le système digestif	Négative	Allégations non scientifiquement établies, données insuffisantes pour mener une évaluation rigoureuse de l'innocuité

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

Dans le [tableau 5](#), les probiotiques ont été présentés sous des formes alimentaires diverses (aliment diététique, complément alimentaire, produit laitier). Or il est bien connu que les aliments diététiques et les compléments alimentaires sont régis par une réglementation bien précise ([JOCE, 1999, 2002](#)). Les compléments alimentaires sont des "*produits destinés à être ingérés en complément de l'alimentation courante, afin de pallier l'insuffisance réelle ou supposée des apports journaliers*" ([JOCE, 2002](#)). Les aliments diététiques sont des "*aliments destinés à une alimentation particulière et devant répondre à des besoins physiologiques particuliers, soit en raison d'une maladie comme par exemple le diabète, soit en raison d'une situation physiologique particulière comme la grossesse*" ([JOCE, 1999](#)). Au regard de ces deux définitions, on pourrait se demander s'il existe un apport journalier recommandé en probiotiques, et si ces derniers répondent à des besoins physiologiques particuliers. Il est bien évident que non. Par conséquent, les produits probiotiques ne sauraient être présentés sous ces deux formes alimentaires. Malheureusement, de nombreux aliments contenant des probiotiques sont de plus en plus présentés sous la forme de compléments alimentaires ([Majaama et Isolauri, 1997](#); [Vanderhoof et al., 1999](#); [Pessi et al., 2000](#); [Gionchetti et al., 2003](#); [de Vries et al., 2006](#)).

Depuis l'adoption de la nouvelle réglementation européenne ([JOUE, 2007](#)), il appartient à l'autorité Européenne de sécurité des aliments (EFSA, European Food Safety Authority) de procéder à l'harmonisation des avis émis par les agences nationales, mais aussi à l'évaluation de nouvelles demandes de produits porteurs d'allégations. Dans son rapport d'octobre 2009, L'EFSA a discrédité toutes les allégations en rapport avec les probiotiques. L'EFSA a estimé que les probiotiques n'ont pas apporté la preuve de leur efficacité, en raison d'un manque d'information concernant les souches pour lesquelles des avantages sur la santé ont été revendiqués.

### 2.4. Cadre réglementaire des aliments contenant des probiotiques

En consommant des produits probiotiques, on recherche un effet bénéfique sur la santé. Toutefois, la nature de ce bénéfice santé n'est pas précisée. D'aucuns disent que le bénéfice santé est d'ordre fonctionnel. C'est pourquoi, on qualifie les probiotiques de cultures fonctionnelles ([Shah, 2007](#); [Ammor et Mayo, 2007](#)). Cette approche semble idéale pour répertorier les produits probiotiques dans la catégorie des aliments dits "fonctionnels", mais le concept d'aliments fonctionnels est un concept flou et ambigu, et pour cause, il n'existe pas

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

de définition consensuelle de ces aliments (Cynober, 2008). Plusieurs définitions ont été proposées pour ces aliments. Goldberg (1994) a défini l'aliment fonctionnel comme "tout aliment qui en plus de sa valeur nutritive, a un impact positif sur la santé de l'individu, sur sa performance et son état mental". Pour Diplock et al. (1999), un "aliment peut être considéré comme fonctionnel s'il a démontré de façon satisfaisante qu'il exerce un effet bénéfique sur une ou plusieurs fonctions cibles de l'organisme, au-delà des effets nutritionnels de base, de manière à améliorer la santé et le bien être". Jones et Varady (2008) ont défini l'aliment fonctionnel comme "un aliment non nécessaire au fonctionnement de l'organisme mais qui procure des bienfaits physiologiques additionnels améliorant globalement la santé".

L'absence d'un consensus universel sur la définition de l'aliment fonctionnel montre qu'il est urgent de définir un cadre réglementaire clair pour ce type d'aliment, afin de permettre leur contrôle, et d'assurer la protection du consommateur. Les aliments fonctionnels sont avant tout des aliments, et doivent par conséquent se présenter sous une forme alimentaire. Ils sont censés améliorer la santé de ceux qui les consomment. Ils se positionnent à l'interface des médicaments et des compléments alimentaires, comme le montre bien la figure 4.

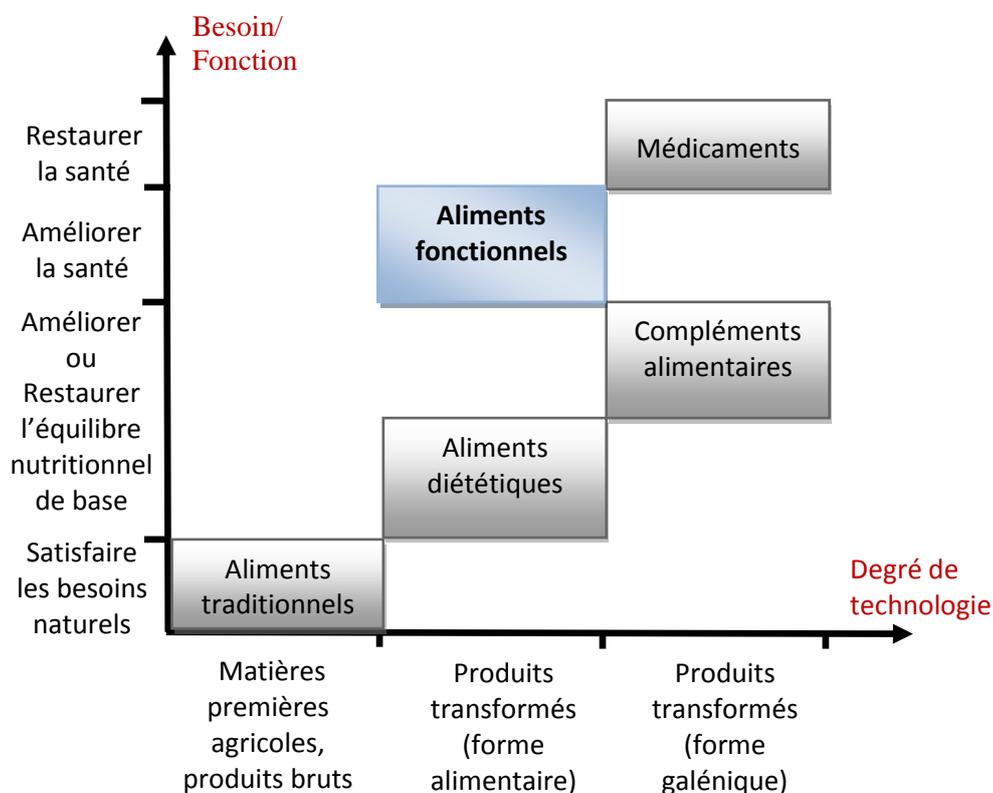


Figure 4. Schéma du positionnement des aliments fonctionnels

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

Les effets bénéfiques attribués aux probiotiques sont nombreux, mais les preuves confirmant les différentes allégations nécessitent de plus amples investigations. On ne sait pratiquement pas grand chose du mode d'action des probiotiques. Aussi, les techniques d'identification des souches de probiotique ne sont pas spécifiques. Les techniques d'hybridation ADN/ADN ou le séquençage de l'ARNr 16S ne permettent pas à l'heure actuelle de discriminer avec certitude deux souches d'une même espèce. Chaque technique ayant ses limites. La nomenclature des souches prête souvent à confusion. Il serait souhaitable de se référer aux banques de données internationales, et d'arriver si possible à une banque de données unique. Chaque souche devra être déposée dans une collection unique reconnue universellement. Une fois cette étape franchie, il va falloir établir la liste des méthodes pertinentes pour la caractérisation de ces souches, et définir les critères de validation de ces méthodes.

Enfin, il va falloir fournir la preuve des effets bénéfiques des probiotiques. Cela exige une approche scientifique sérieuse et rigoureuse, comme l'ont suggéré [Pascal et al. \(2008\)](#) qui proposent l'identification formelle de la souche de probiotique, la construction d'une argumentation basée sur des études cliniques conduites chez l'homme, et la sélection de marqueurs pertinents lors de ces études cliniques. Ces propositions figurent également dans le guide d'évaluation des probiotiques du comité mixte d'experts [FAO/WHO \(2002\)](#). Dans ce guide, on retrouve des tests *in vivo* et des tests *in vitro*. Les tests *in vivo* se rapportent aux essais précliniques chez l'animal et cliniques chez l'homme. Les tests *in vitro* sont censés reproduire les conditions *in vivo*. La tolérance des probiotiques à l'acidité et/ou à la bile, aux sécrétions enzymatiques et aux substances antimicrobiennes font partie intégrante des tests *in vitro*. On y retrouve également les tests d'adhésion aux cellules intestinales et les tests d'antagonisme contre les pathogènes. Tous ces différents tests devront participer au recueil de données sur le probiotique pour en tirer les conclusions nécessaires, et formuler un avis justifiant ou non l'allégation proposée.

### 3. Méthodologie de l'encapsulation

#### 3.1. Importance de l'encapsulation des probiotiques

Les probiotiques sont censés exercer un effet bénéfique sur la santé. Pour y parvenir, ils doivent se retrouver vivants au niveau intestinal après avoir été consommé. Cela suppose qu'ils doivent passer la barrière de l'estomac. Malheureusement, ce passage n'est pas sans obstacle du fait de l'acidité qui règne dans cette zone. Dans la littérature, plusieurs études ont été consacrées à la viabilité des probiotiques en milieu acide. Le tableau 8 présente les effets de l'acidité sur la survie de certaines souches de probiotiques. L'estomac étant la première barrière à franchir avant d'atteindre l'intestin grêle, une évaluation de la survie des probiotiques en conditions gastriques demeure primordiale.

Tableau 8. Influence de l'acidité sur la survie des souches non encapsulées de probiotiques.

Souches bactériennes	Population initiale	Durée d'incubation & degré d'acidité	Effets sur la survie des micro-organismes	Références bibliographiques
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	1,23.10 <sup>9</sup> UFC/mL	0,5 h & pH 2,5	Aucune survie de la bactérie après ce temps d'incubation	Sun et Griffiths (2000)
<i>L. acidophilus</i> 2409 <i>L. casei</i> 2603	≈10 <sup>11</sup> UFC/mL	3 h & pH 2 et 3	Baisse de 5 log <sub>10</sub> UFC/mL à pH 2, baisse de 2 log <sub>10</sub> UFC/mL à pH 3	Sultana et al. (2000)
<i>L. acidophilus</i> 05 <i>B. lactis</i> Bb 12	≈10 <sup>10</sup> UFC/mL	1 h pH 1, 2 et 3	Aucune survie à pH 1 et 2, baisse d'environ 1,5 log <sub>10</sub> UFC/mL à pH 3	Favaro-Trindade et Grosso (2002)
<i>B. lactis</i> Bb 12 <i>B. bifidum</i> 11 <i>B. longum</i> 46 <i>B. breve</i> 15700 <i>B. infantis</i> ATCC 15697	5.10 <sup>9</sup> UFC/mL	2 h & pH 1 et 2	Aucune survie à pH 1, baisse de 1 log <sub>10</sub> UFC/mL pour <i>B. lactis</i> Bb 12 à pH 2, de 5 log <sub>10</sub> UFC/mL pour <i>B. breve</i> , de 6,5 Log <sub>10</sub> UFC/mL pour <i>B. longum</i> , de 7,5 log <sub>10</sub> UFC/mL pour <i>B. infantis</i> . Aucune survie pour <i>B. bifidum</i>	Hansen et al. (2002)

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

<i>B. longum</i> B6 <i>B. infantis</i> CCRC 14633	≈10 <sup>10</sup> UFC/mL	4 h & pH 2 et 3	Baisse de 8,5 log <sub>10</sub> UFC/mL pour <i>B. longum</i> et de 9,8 log <sub>10</sub> UFC/mL pour <i>B. infantis</i> à pH 2. Baisse d'environ 1 log <sub>10</sub> UFC/mL pour les deux souches à pH 3	Lian et al. (2003)
<i>L. acidophilus</i> 547 <i>L. casei</i> 1 <i>B. bifidum</i> ATCC 1994	≈10 <sup>9</sup> UFC/mL	2 h & pH 1,55	Baisse de 6 log <sub>10</sub> UFC/mL pour <i>L.</i> <i>acidophilus</i> et <i>L. casei</i> . Aucune survie pour <i>B.</i> <i>bifidum</i>	Krasaekoopt et al. (2004)
<i>L. acidophilus</i> Ki <i>L. paracasei</i> LCS- 1	≈10 <sup>8</sup> UFC/mL	2 h & pH 3	Aucune perte pour <i>L.</i> <i>acidophilus</i> Baisse de 3 log <sub>10</sub> UFC/mL pour <i>L.</i> <i>paracasei</i>	Madureira et al. (2005)
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826	≈10 <sup>8</sup> UFC/mL	0,5 h & pH 2	Baisse de 6 log <sub>10</sub> UFC/mL	Michida et al. (2006)
<i>L. plantarum</i> 299v, 91, 1171, 1393, 1504, 1508, DSMZ 20174	≈10 <sup>10</sup> UFC/mL	0,5 h & pH 2	Baisse de 8 log <sub>10</sub> UFC/mL pour <i>L.</i> <i>plantarum</i> 299v, 91, 1171 et 1508 ; baisse de 6 à 7 log <sub>10</sub> UFC/mL pour les autres souches	Del Piano et al. (2006)

ATCC (American Type Culture Collection)

CCRC (Culture Collection and Research Center)

NCIMB (National Collection of Industrial and Marine Bacteria)

DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

UFC (Unité Formant une Colonie)

NB: L'observation d'une population bactérienne élevée, atteignant parfois 10<sup>11</sup> UFC/mL, est le signe de la croissance optimale de ces bactéries au sein de leurs milieux de culture respectifs.

Les exemples répertoriés dans ce tableau montrent que la survie des probiotiques devient problématique en dessous de pH 3. Des tolérances à l'acidité controversées ont été observées, c'est le cas de la souche *B. infantis* ATCC 15697 qui ne survit pas plus de 30 min à pH 2,5 (Sun et Griffiths, 2000) mais qui curieusement parvient à survivre pendant 2 h à pH 2 (Hansen et al., 2002). C'est également le cas de *B. lactis* Bb 12 qui ne présente aucune survie après 2 h d'incubation à pH 2 en milieu salin (Favaro-Trindade et Grosso, 2002) mais qui de façon surprenante, parvient à ne perdre qu'un seul log<sub>10</sub> UFC/mL à ce même pH, durant la même durée d'incubation, et en présence d'un milieu simplement aqueux (Hansen et al.,

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

2002). Ces deux exemples montrent que des études complémentaires sont nécessaires pour clarifier ce paradoxe. Dans l'ensemble, la tolérance des probiotiques à l'acidité varie d'une souche à une autre au sein de la même espèce, et entre espèces différentes. Ce qu'il faut surtout retenir, c'est la nécessité de protéger ces probiotiques de l'acidité gastrique, et l'encapsulation est une alternative prometteuse. Les souches de *L. plantarum*, contrairement aux autres probiotiques, ont été particulièrement sensibles à l'acidité (Michida et al., 2006 ; Del Piano et al., 2006).

Une perte considérable de la survie a été observée après 30 min d'incubation à pH 2. Ce constat amène à penser qu'il est moins évident que de telles souches soient encore viables au-delà d'un séjour plus important, environ 2 h, à ce même pH, dans un milieu gastrique artificiel ou non. La sensibilité particulière des souches de cette espèce bactérienne a été le principal facteur qui a conduit à leur sélection. *L. plantarum* a donc été utilisée comme modèle de probiotique dans le cadre de ce travail de thèse. Nous sommes partis d'une dizaine de souches de cette espèce au départ. Après un test rapide en milieu acide, nous avons retenu les souches les plus sensibles. Au nombre de trois, nous avons travaillé avec un isolat extrait du raifort (*L. plantarum* 800), une souche de la collection de l'institut Pasteur de France (*L. plantarum* CIPA159) et une souche commerciale (*L. plantarum* 299v) repertoriée dans la collection allemande (*L. plantarum* DSMZ 9843)

### 3.2. Historique de l'encapsulation

C'est en 1931 que deux chimistes chercheurs (Bungenburg de Jong et Kaas) découvrirent la coacervation, un phénomène physique permettant de réaliser des systèmes colloïdaux, ce qui a conduit aux premiers essais d'encapsulation (Boh, 2007). Le développement de cette technique de l'échelle du laboratoire à la production industrielle aura duré une vingtaine d'années. Durant cette époque, la technologie a été constamment améliorée, modifiée et adaptée. Au cours des années qui suivirent, de nouvelles méthodes ont fait leur apparition. L'encapsulation devint un domaine dans lequel les connaissances scientifiques s'accumulèrent à l'image du nombre croissant d'articles scientifiques et de brevets publiés dans ce domaine (Boh, 2007). Il existe à ce jour une très grande variété de méthodes d'encapsulation (Gouin, 2004; Anal et Singh, 2007).

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

La diversité des méthodes rend complexe le choix de la technique la plus en adéquation avec les objectifs spécifiques recherchés. Ces méthodes touchent aujourd'hui tous les secteurs de l'industrie et permettent de répondre à de nombreuses interrogations technologiques et d'améliorer les procédés actuels (Gouin, 2004). L'encapsulation se définit comme une technologie qui vise à piéger des ingrédients bioactifs dans une matrice en vue de les protéger, les structurer ou assurer le contrôle de leur libération (Poncelet et al., 2007). L'encapsulation fait appel à des techniques relevant aussi bien de la physicochimie que de la physique. Elle offre des solutions nouvelles aux problèmes de stabilité des ingrédients (principes actifs, vitamines, microorganismes etc).

La classification des méthodes d'encapsulation est difficile et peut prêter souvent à confusion. L'une des difficultés réside dans le fait que plusieurs termes peuvent désigner la même méthode. C'est le cas par exemple des termes "spray-cooling", "spray-freezing" et "spray-congealing" qui désignent la pulvérisation d'un liquide dans une chambre froide en vue de l'obtention de fines particules sèches (Gouin, 2004) ou encore le terme "extrusion" retrouvé dans la littérature sous l'appellation de "prilling" (Poncelet et Dreffier, 2007). C'est également le cas pour la gélification ionotropique et la coacervation, respectivement appelées méthode électrostatique et méthode de séparation de phases (Anal et Singh, 2007).

L'autre difficulté de cette classification est liée à l'interdépendance des procédés utilisés durant les étapes de l'encapsulation. L'émulsification (procédé permettant de former des capsules huileuses ou aqueuses) est une technique d'encapsulation à part entière (Blanco-Prieto et al., 1998). Les capsules obtenues peuvent être réticulées dans un bain de solution gélifiante ou subir une évaporation du solvant. La réticulation par gélification (Gouin, 2004) et l'évaporation de solvant (Blanco-Prieto et al., 1998) sont aussi considérées comme des méthodes d'encapsulation à part entière. Dans un souci de simplification, Poncelet et Dreffier (2007) ont proposé une classification basée sur les différentes étapes de l'encapsulation et non sur les méthodes:

étape 1: Incorporation de l'ingrédient bioactif dans la matrice,

étape 2: Encapsulation proprement dite par des procédés mécaniques,

étape 3: Stabilisation du système par des procédés chimiques ou physicochimiques.

### 3.3. Approche méthodologique de l'encapsulation des probiotiques

L'encapsulation des probiotiques nécessite de recourir à des méthodes qui soient douces, non agressives des cellules, et à des matériaux qui soient non toxiques et biocompatibles. Les premières méthodes d'encapsulation développées pour améliorer la durée de vie et la conservation des cultures bactériennes consistaient à transformer des bouillons de culture en poudre sèche concentrée. Les méthodes de séchage par atomisation, par lyophilisation ou encore par lit d'air fluidisé ont montré leurs limites: faible protection vis-à-vis de l'environnement de la matrice alimentaire, absence de protection en présence d'acide ou de bile (Gilliland et Speck, 1977; Anonymous, 1992; Lankaputhra et Shah, 1995). D'autres méthodes ont fait leur apparition pour davantage améliorer la protection des cultures bactériennes. Ces méthodes avaient pour but de formuler des billes ou des capsules (Lacroix et al., 1990 ; Kearney et al., 1990). Ces formes galéniques ont été réalisées à partir de solutions colloïdales (King, 1995), et ont fait appel aux techniques d'extrusion ou d'émulsification (Krasaekoopt et al., 2003) (figure 5).

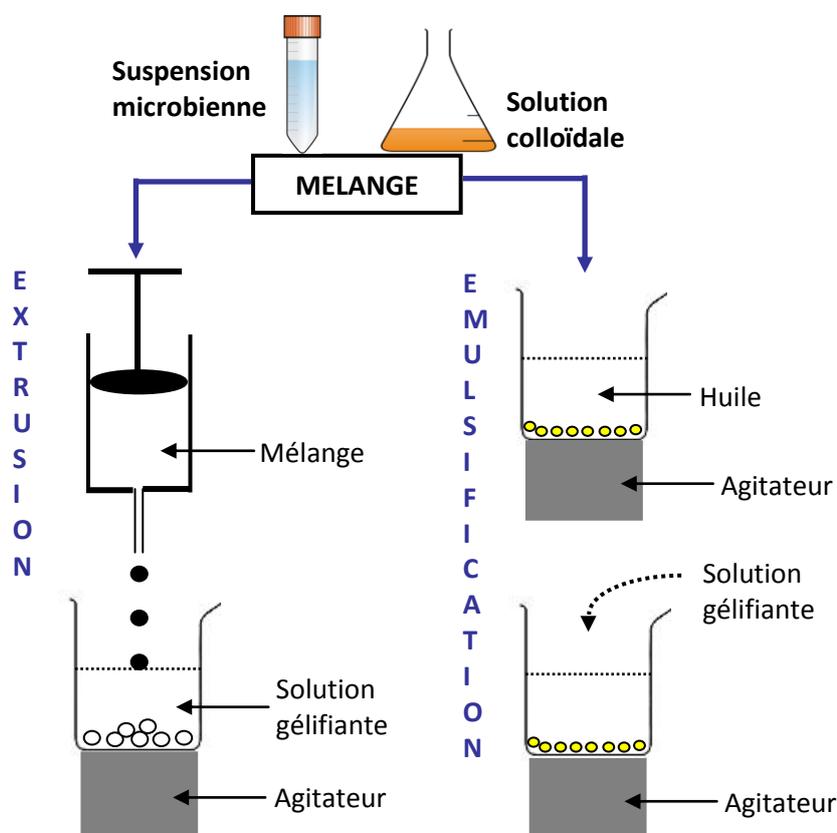


Figure 5. Procédés d'encapsulation des microorganismes par les techniques d'extrusion et d'émulsification (adapté de Krasaekoopt et al., 2003)

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

Dans l'extrusion, la solution colloïdale (à base de biopolymère) est mélangée à la suspension microbienne. Le mélange obtenu est introduit dans un dispositif d'extrusion, en général une seringue. Une pression exercée sur le piston de la seringue laisse tomber goutte à goutte le contenu de la seringue dans une solution gélifiante, sous une faible agitation. La taille et la forme des gouttes dépendent du diamètre de l'aiguille, et de la distance séparant l'aiguille de la solution gélifiante. L'extrusion est une méthode simple, de réalisation aisée, permettant la rétention d'un nombre élevé de cellules microbiennes. Des procédés automatisés exploitant ce principe sont disponibles de nos jours (Chandramouli *et al.*, 2004).

Dans l'émulsification, le mélange (suspension microbienne plus solution colloïdale) constitue la phase discontinue. Cette phase est dispersée par fraction dans un volume plus grand d'huile végétale (phase continue). L'émulsion eau-dans-huile (E/H) en cours de formation est continuellement homogénéisée par agitation. L'agitation est une étape déterminante et la vitesse d'agitation l'est davantage car elle conditionne la taille et la forme des gouttelettes formées (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Shima *et al.*, 2006). Ces gouttelettes une fois récupérées (par filtration ou décantation) subissent un phénomène de gélification après ajout de la solution gélifiante. L'utilisation de cette technique pour l'encapsulation des probiotiques a été décrite dans la littérature (Sultana *et al.*, 2000; Krasaekoopt *et al.*, 2003; Shima *et al.*, 2006).

La différence entre les deux techniques se situe à plusieurs niveaux. L'extrusion génère des gouttes gélifiées communément appelées billes, alors que l'émulsification donne des gouttelettes huileuses ou aqueuses, appelées capsules. Le cœur de la capsule est un liquide alors que celui de la bille est un réseau poreux (Gentile *et al.*, 1995). Les capsules ont des tailles qui sont au moins cent fois inférieures à celles des billes (Krasaekoopt *et al.*, 2003). Enfin, l'extrusion est beaucoup plus simple à réaliser que l'émulsification. En termes de coût, l'émulsification est plus onéreuse car elle nécessite des matières premières supplémentaires, comme l'huile végétale, ou les tensioactifs utilisés pour stabiliser l'émulsion. Quelle que soit la technique envisagée, le choix des matériaux d'encapsulation reste une étape décisive.

Dans le cadre de cette thèse, les premiers essais d'encapsulation réalisés l'ont été avec la technique d'émulsification. Des difficultés techniques et de mise en œuvre nous ont contraints à l'abandonner pour les motifs suivants: instabilité de l'émulsion, nécessité de recourir à une agitation vigoureuse de préférence avec un Ultraturax<sup>®</sup> (équipement permettant

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

d'exercer une force de cisaillement élevée, et d'atteindre des vitesses d'agitation jusqu'à 13.500 tours/min, ce qui est préjudiciable à la survie des bactéries), présence simultanée de bactéries dans les phases aqueuse et huileuse lors de la décantation (l'émulsion se séparant en deux phases du fait de son instabilité), difficulté à discriminer les gouttelettes huileuses des gouttelettes d'eau au microscope optique, difficulté à incorporer le maximum de bactéries au sein des capsules puisque la formation des capsules et l'incorporation des bactéries se font de façon aléatoire. Finalement, la méthode d'extrusion/gélification a été retenue pour l'encapsulation des bactéries. Une fois la méthode adoptée, il faut sélectionner des biomatériaux adaptés aux objectifs spécifiques de la recherche.

### 3.4. Choix des biomatériaux pour l'encapsulation

Le concept de biomatériaux aboutit en général à diverses définitions. Une définition souvent acceptée dans le domaine de la biologie et de la médecine est "*tout matériau naturel ou non, qui est en contact direct avec une structure vivante et qui est destiné à agir avec des systèmes biologiques*" (Gentile et al., 1995). Les biomatériaux englobent les métaux et alliages métalliques, les céramiques, les matériaux de synthèse et les polymères naturels (biopolymères). Les termes "biocompatible" et "biodégradable" sont associés à certains de ces matériaux. La biocompatibilité d'un matériau est sa propriété à agir dans une application spécifique avec une réponse appropriée de l'hôte. La biodégradabilité est la capacité intrinsèque d'un matériau à se dégrader (par divers procédés) dans un temps bien déterminé (Gentile et al., 1995). Dans ce travail de thèse, des polymères naturels, d'origines polysaccharidique et protéique, ont été utilisés. Ces polymères bénéficient d'une longue expérience d'utilisation dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. Ils peuvent donc être considérés comme non toxiques.

#### 3.4.1. Polymères naturels

Les polymères sont des macromolécules organiques ou inorganiques, constitués de l'enchaînement répété d'un même motif (le monomère), reliés les uns aux autres par des liaisons covalentes. La structure chimique et la conformation des chaînes de monomères confèrent aux polymères des fonctionnalités spécifiques (capacité à former des gels, capacité d'absorption d'eau) (Renard et Reddy, 2007). Ces polymères sont hydrophiles pour la plupart d'entre eux, voire amphiphiles pour les protéines ou certains polysaccharides. Une liste non

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

exhaustive de polymères naturels recensés à ce jour dans le domaine de l'encapsulation est donnée au [tableau 6](#).

Tableau 6. Principales sources de polymères naturels (adapté de Renard et Reddy, 2007)

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

### 3.4.2. Justification du choix des polysaccharides dans cette étude

La méthode d'encapsulation par extrusion gélification a été retenue dans ce travail. La gélification en présence de cations divalents est un processus qui conduit à la formation d'un colloïde. Des polymères de charges négatives sont tout à fait indiqués. En présence de cations, il est possible d'établir des liaisons ioniques avec les monomères des chaînes de ces polysaccharides. Trois polysaccharides ont été étudiés, il s'agit de l'alginate de sodium, de la pectine et du kappa-carraghénane.

#### 3.4.2.1. Description des alginates

Les premières expériences sur l'extraction des alginates à partir d'algues brunes (*Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria japonica*, *Macrocystis pyrifera*, *Fucus serratus*, *Ascophyllum nodosum*, *Lessonia nigrescens*, *Durvillea antarctica*, *Durvillea potarum* etc) ont été réalisées par le chimiste anglais Stanford à la fin du 19<sup>e</sup> siècle (Standford, 1883). En 1930 a débuté la production industrielle d'alginate aux États-Unis par la société Henkel, aujourd'hui un des leaders mondiaux de la fabrication des colles et adhésifs à base d'alginate. L'alginate est un polymère linéaire de structure hétérogène composé de

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

deux unités monosaccharidiques : l'acide  $\alpha$ -L-guluronique (G) et l'acide  $\beta$ -D-mannuronique (M) liés par des liaisons glycosidiques de type  $\beta$ -(1-4) (Draget *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2006).

Les monomères G et M sont représentés à la figure 6a. L'apparition des G et M à l'intérieur de la chaîne d'alginate se fait par blocs, avec des séquences alternées (fig. 6b), et non de façon aléatoire. Cette disposition des chaînes en blocs alternés est largement décrite dans la littérature et varie d'une structure à une autre (Draget *et al.*, 1998; Sikorski *et al.*, 2007; Funami *et al.*, 2009; Pongjanyakul, 2009).

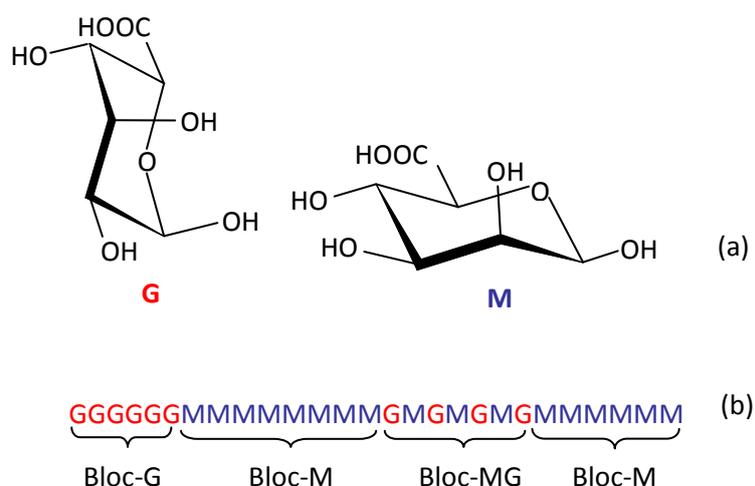


Figure 6. (a) Monomères d'alginate (b) Séquence de la chaîne d'alginate: 2 types de monomères (G et M), 3 types de blocs (G, M et MG).

Les propriétés viscoélastiques d'une suspension d'alginate sont liées au rapport M/G (Moresi *et al.*, 2001; Storz *et al.*, 2010). Ce rapport dépend du type d'algue brune, de la période de récolte de l'algue, et de la partie de l'algue étudiée (Donati *et al.*, 2005). En dehors de *Laminaria Hyperborea* qui possède un rapport M/G < 1 ( $\approx 0,45$ ), toutes les autres espèces d'algues brunes ont un rapport M/G compris entre 1 et 3,5 (Smidsrod et Draget, 1996). Le rapport M/G conditionne la fonctionnalité technologique des alginates. Le pouvoir gélifiant est d'autant plus important que la proportion des bloc-G est élevée. La gélification de l'alginate est basée sur son affinité envers certains cations, mais surtout, sur sa capacité à se lier à ces cations de façon sélective et coopérative (Draget *et al.*, 1998). D'après Matsumoto et Mashiko (1990), la force de cette liaison varie en fonction du type de cation impliqué:  $K^+ < Na^+ < Mg^{2+} \ll Ca^{2+}$ , c'est la raison fondamentale pour laquelle le mécanisme de gélification de l'alginate est toujours décrit avec le  $Ca^{2+}$  (figure 7).

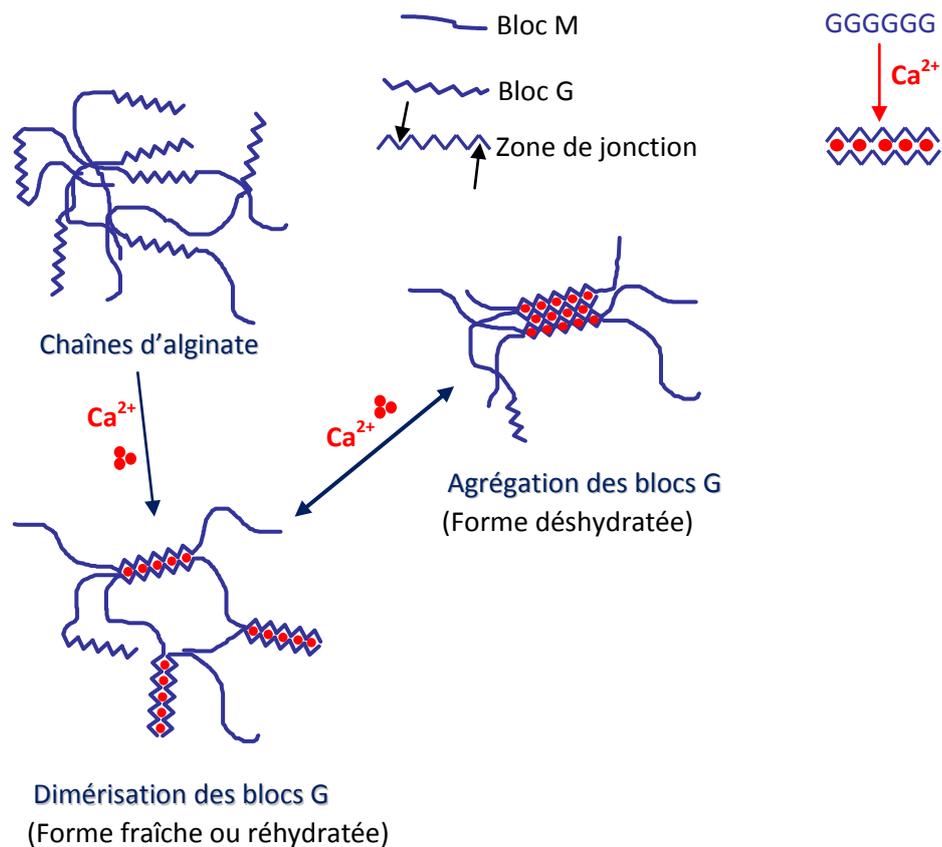


Figure 7. Principales étapes de la gélification de l'alginate (Stokke et *al.*, 2000; Braccini et Perez, 2001; Jorgensen et *al.*, 2007; Funami et *al.*, 2009)

Le mécanisme de gélification proposé à la figure 7 se résume en deux grandes étapes. La première étape irréversible et instantanée permet à l'alginate de gélifier en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Parmi les blocs G et M des chaînes d'alginate, seuls les blocs G interviennent dans cette gélification (Grant et *al.*, 1975; Draget et *al.*, 1998; Li et *al.*, 2007; Sikorski et *al.*, 2007; Funami et *al.*, 2009). Les blocs G des chaînes passent d'un état désordonné à un état ordonné où deux blocs s'associent au niveau de leur zone de jonction, piégeant ainsi en leur sein le  $\text{Ca}^{2+}$ . L'association de ces deux blocs se fait par un mécanisme coopératif. La fixation d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$  au sein d'une zone de jonction facilite la capture d'un second ion  $\text{Ca}^{2+}$ , et ainsi de suite. Ce phénomène va conduire à la dimérisation de tous les blocs G.

La seconde étape réversible se poursuit par une agrégation des chaînes. Cette agrégation est le plus souvent constatée avec des gels d'alginate de sodium déshydratés (Jorgensen et *al.*, 2007). Le rangement des ions  $\text{Ca}^{2+}$  au sein des blocs G ressemble à des œufs qui sont rangés dans chaque cavité des boîtes les contenant. Cette disposition, plus connue

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

sous le nom de modèle "boîte à œufs", a été décrite pour la première fois par *Grant et al.* (1975). Grâce à ce modèle, il a été démontré que la gélification de l'alginate en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  conduit à une structure en réseau bien ordonnée (*Draget et al.*, 1998; *Blandino et al.*, 1999; *Li et al.*, 2007; *Sikorski et al.*, 2007). Cette structure en réseau qui s'observe dans les billes, films ou fibres à base d'alginate, a été mise à profit dans diverses applications alimentaire et pharmaceutique (*Draget et al.*, 1998).

Les alginates figurent sur la liste positive émise par l'union européenne. Ils sont classés dans la catégorie des additifs alimentaires (catégorie 4, code E400 à 495). Plusieurs variétés existent: E400 (acide alginique), E401 (alginate de sodium), E402 (alginate de potassium), E403 (alginate d'ammonium), E404 (alginate de calcium), E405 (alginate de propane-1,2-diol). La FDA (Food and Drug Administration) a classé l'alginate de sodium dans la catégorie des composés GRAS (Code n° 21CFR184.1724). En cas d'applications autre que alimentaire, de préférence médicale ou pharmaceutique, l'alginate de sodium doit satisfaire à certaines exigences de sécurité (faible taux d'impuretés, absence de substances pyrogènes etc) selon la réglementation en vigueur (ISO 10993).

L'alginate de sodium est le biopolymère le plus abondant après la cellulose. Il bénéficie d'une longue expérience d'utilisation dans le domaine alimentaire. Sa capacité à adopter des aspects texturaux variés (biofilms, billes, capsules, gels etc) dans des conditions bien définies est une des raisons de l'intérêt dont il est l'objet. La présence de blocs G dans toutes les espèces d'algues brunes (*Smidsrod et Draget*, 1996) permet aux alginates de gélifier en présence de cations (*Draget et al.*, 1997). Les propriétés gélifiantes de l'alginate de sodium ont été mises à profit dans le cadre de cette thèse, afin de mettre au point des billes à base de ce polysaccharide.

### 3.4.2.2. Description des pectines

Les pectines sont extraites de plantes (pépins de tomate, écorces d'agrumes et de betterave, pulpes de pomme etc) (*Ridley et al.*, 2001). Elles présentent des structures variées. Leur structure primaire a été élucidée dans les années 1920 (*Griggs et Johnston*, 1926). Les pectines sont des polymères composés de plusieurs chaînes d'acide galacturonique (AG) ramifiées en position  $\alpha$ -(1-4) (*Thakur et al.*, 1997) (figure 8).

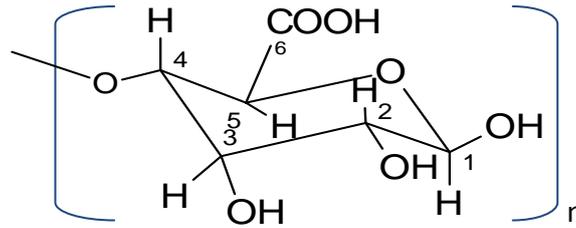


Figure 8. Structure de l'acide galacturonique (AG) des pectines

L'AG peut subir des estérifications en présence de méthanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) et/ou d'acide acétique ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). La methyl-estérification est très répandue dans les pectines natives (Rombouts et Thibault, 1986) et a lieu au niveau du carbone 6 de l'AG. Les pectines sont classées selon le degré de méthylation (DM) qui correspond au pourcentage de groupements  $\text{COOH}$  estérifiés par du  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Ainsi, trois catégories de pectines ont pu être distinguées: la pectine faiblement méthylée ( $\text{DM} < 50\%$ ), la pectine hautement méthylée ( $\text{DM} > 50\%$ ) et l'acide pectique ( $\text{DM} < 10\%$ ). Les pectines peuvent également subir une estérification au niveau des carbones 2 et 3 par du  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , ce qui conduit au degré d'acétylation (Voragen *et al.*, 1995; Levigne *et al.*, 2002). Par homologie avec l'alginate, l'AG des pectines se lie au  $\text{Ca}^{2+}$ . L'ensemble forme alors un réseau dont la représentation est similaire à celle de l'alginate décrite à la figure 7. Ce réseau est beaucoup moins stable que celui de l'alginate, du fait d'un taux élevé d'acétylation dans la structure (Ralet *et al.*, 2001).

Le terme "boîte à œufs" n'est pas encore admis dans le cas des pectines (Braccini et Perez, 2001). En effet, Grant *et al.* (1975) avaient remarqué de faibles interactions entre l'AG et le  $\text{Ca}^{2+}$ . Les auteurs ont attribué cela au caractère non chargé des résidus galacturonyle qui ne participent pas directement à la liaison ionique. Malgré l'analogie structurale entre l'AG des pectines et l'acide guluronique (G) de l'alginate, des différences fondamentales subsistent au niveau de la conformation des chaînes. Il se trouve que la conformation des chaînes de l'AG n'est pas à l'heure actuelle bien établie (Braccini et Perez, 2001). Le modèle structural en blocs des pectines reste donc controversé (Lutz *et al.*, 2009). Face à ce constat, il apparaît illusoire de décrire des zones de jonction dans le cas des pectines. Or sans zone de jonction adaptée à l'insertion du  $\text{Ca}^{2+}$ , il n'est pas envisageable de parler de "boîte à œufs" (Braccini et Perez, 2001).

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

Les pectines sont des texturants alimentaires classés dans la catégorie 4 de la liste positive émise par l'union européenne (Code E440). Ils sont également reconnus par la FDA (Code n° 21CFR184.1588) comme des substances alimentaires non toxiques (GRAS). La capacité de ces polysaccharides à générer des billes en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  a été évaluée dans le cadre de cette thèse.

### 3.4.2.3. Description des carraghénanes

Les premières extractions des carraghénanes à l'état pur remontent à 1871 aux États-Unis. Le terme "carraghénane" fait référence à une ville du comté du sud de l'Irlande appelée Carrageen (Mitchell et Guiry, 1983). Là bas, les habitants utilisaient une mousse (lichen de mer) qu'ils trouvaient sur les rochers de leurs côtes pour fabriquer des pommades. C'est par la suite qu'ils vont découvrir que cette mousse appartenait à la famille des Rhodophycées (algues rouges). De nombreuses espèces d'algues rouges (*Chondrus crispus*, *Euचेuma spinosum*, *Euचेuma cottonii*, *Gigartina stellata* etc) produisent des carraghénanes. Ces derniers sont des polymères de structure linéaire constitués d'unités de D-galactose liées alternativement par des liaisons  $\alpha(1-3)$  et  $\beta(1-4)$  (Gaaloul et al., 2009) (figure 9).

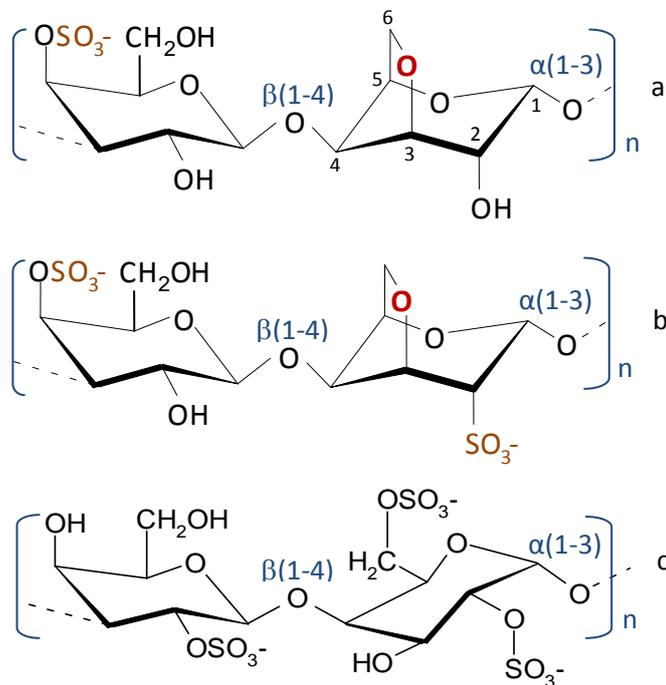


Figure 9. Structure et différents types de carraghénanes  
(a) κ-carraghénane (b) ι-carraghénane (c) λ-carraghénane

Ces polymères sont constitués de plus de 1000 résidus de galactose. La probabilité de variations de structures est énorme. Trois types de carraghénanes sont connus à ce jour: le kappa ( $\kappa$ ) carraghénane, le iota ( $\iota$ ) carraghénane et le lambda ( $\lambda$ ) carraghénane. La densité des charges négatives augmente progressivement des  $\kappa$ -carraghénanes vers les  $\lambda$ -carraghénanes. Les  $\kappa$ -carraghénanes (monosulfaté) et les  $\iota$ -carraghénanes (bisulfaté) possèdent un pont oxygène entre les carbones 3 et 6 du D-galactose. Ce pont est responsable des transitions conformationnelles. Il est à l'origine de la gélification des  $\kappa$ -carraghénanes et des  $\iota$ -carraghénanes. Les  $\lambda$ -carraghénanes (trisulfaté) qui ne possèdent pas ce pont sont incapables de gélifier (Yuguchi *et al.*, 2002). Le mécanisme de gélification des kappa et iota carraghénanes est schématisé à la figure 10.

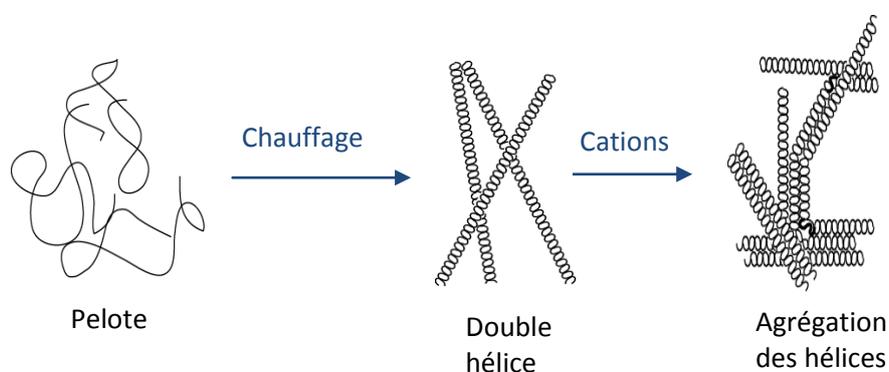


Figure 10. Mécanisme de gélification des kappa et iota carraghénanes (adapté de Renard et Reddy, 2007)

Les carraghénanes ont la particularité de subir des modifications conformationnelles: passage de l'étape de pelote à une étape d'hélice pour aboutir à l'agrégation des hélices. La gélification conduit à la formation d'un réseau bien ordonné (Mangione *et al.*, 2003). La température est indispensable pour initier cette gélification (Yuguchi *et al.*, 2002; Mangione *et al.*, 2003; Renard et Reddy, 2007). Le type de cation est un paramètre tout aussi important à prendre en compte, car il conditionne l'effectivité de la gélification. Divers travaux ont porté sur le mécanisme de gélification des carraghénanes (Morris *et al.*, 1980; Smidsrod et Grasalden, 1982; Rochas et Rinaudo, 1984; Picullel, 1998). Tous ont confirmé l'existence d'une transition pelote-hélice, étape indispensable avant la gélification au contact d'un cation. Les effets de divers cations monovalents et divalents sur la gélification du kappa-carraghénane ont été étudiés. C'est le cas des cations  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  (Belton *et al.*, 1984; Yuguchi *et al.*, 2003; Mangione *et al.*, 2005),  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  et  $\text{Cs}^+$  (Belton *et al.*, 1984; Yuguchi *et al.*, 2003) et  $\text{Ca}^{2+}$  (Lai *et al.*, 2000; Macartain *et al.*, 2003). Il ressort de l'ensemble de ces études qu'une

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

saturation en cation est nécessaire pour neutraliser les charges négatives du polysaccharide, et favoriser ainsi la gélification.

Les carraghénanes sont des biopolymères qui bénéficient d'une longue expérience d'utilisation dans plusieurs domaines (alimentaire, pharmaceutique, cosmétique etc). Leur sécurité d'emploi a été approuvée par plusieurs agences gouvernementales dont la FDA, et par des structures officielles comme le codex alimentarius et le comité mixte d'experts FAO/WHO des additifs alimentaires (Sarett, 1981). Les propriétés colloïdales de ce polysaccharide ont été mises à profit dans le cadre de cette thèse, afin de mettre au point des billes à base de ce biopolymère.

### 3.4.3. Justification du choix des protéines de lactosérum dans cette étude

La gélification en présence de cations divalents conduit à la formation d'un colloïde. Les protéines étant constitués de groupements dont la charge varie avec le pH, nous avons étudié ce polymère dans différentes conditions. En présence de cations, il est possible d'établir des interactions avec des cations divalents, ou encore avec des polysaccharides. Les protéines de lactosérum ont été préférées à d'autres protéines comme le gluten (allergies liées à la consommation de gluten), la gélatine ou le collagène. Les protéines constituant le lactosérum représentent 20% des protéines totales du lait (tableau 7).

Tableau 7. Composition en protéines de lactosérum du lait bovin (Cayot et Lorient, 1998)

Type de protéines	Masse moléculaire (KDa)	Point isoélectrique (pHi)	Structure secondaire	Nombre de ponts S-S	Nombre de groupements S-H libres
bêta-Lactoglobuline	18,362	5,2	10% d'hélice $\alpha$ et 45% feuillet $\beta$	2	1
alpha-Lactalbumine	14,174	4,5-4,8	14% d'hélice $\alpha$ et 26% feuillet $\beta$	4	0
Albumine sérique bovine	69,000	4,7-4,9	54% d'hélice $\alpha$ et 40% feuillet $\beta$	17	1
Immuno-globulines G	variable $10^5$ à $10^6$	5,5-8,3	np	32	np

(np) non précisé

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

D'un point de vue fonctionnel, les deux principales protéines du lactosérum sont la bêta-lactoglobuline et l'alpha-lactalbumine. Les propriétés fonctionnelles de ces deux protéines sont affectées par la source de lactosérum (variabilité saisonnière, type de fabrication fromagère) et par les techniques de fractionnement (Cayot et Lorient, 1998). La bêta-lactoglobuline est la plus abondante des protéines de lactosérum. Elle représente au minimum 50% des protéines totales (Cayot et Lorient, 1998). Elle gouverne le comportement général de l'ensemble des protéines sériques. Sa structure primaire comprend 162 résidus d'acides aminés pour une masse moléculaire relative de 18,362 KDa (Papiz et al., 1986; Wong et al., 1996; Fox, 2003).

La bêta-lactoglobuline renferme deux ponts disulfures (S-S) aux positions 66-160 et 106-121 ou 106-119 (Papiz et al., 1986; Monaco et al., 1987), et un groupement thiol libre en position 121 ou 119 (McKenzie et al., 1972; Kinsella et Whitehead, 1989). Plusieurs régions peptidiques de la bêta-lactoglobuline sont riches en acides aminés chargés positivement (arginine, histidine et lysine) ou négativement (acide glutamique et asparagine) (Brownlow et al., 1997). Des estimations très variables de la structure secondaire de la bêta-lactoglobuline ont été données (Creamer et al., 1983; Casal et al., 1988; Cayot et Lorient, 1998). Globalement, elle est composée d'un mélange d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$ , en proportions variables (tableau 7). La structure tertiaire à l'état de monomère est constituée principalement de feuillets  $\beta$  qui délimitent une cavité hydrophobe (Papiz et al., 1986). La bêta-lactoglobuline présente également une structure quaternaire, celle-ci est influencée par les conditions du milieu. En fait, les molécules de bêta-lactoglobuline s'associent en dimères ou en tétramères. La formation de dimères résulte d'interactions non covalentes entre deux monomères (Papiz et al., 1986; Sakurai et al., 2001). La bêta-lactoglobuline prédomine sous sa forme dimérique. Elle est souvent dissociée en monomère en milieu acide (pH < 3). Sa structure à l'état natif demeure intacte aux faibles valeurs de pH (Uhrinova et al., 2000).

A ce jour, il existe 9 variants génétiques de cette protéine (figure 11). Chacun de ces variants est désigné par une lettre en fonction de sa date de découverte. Les variants A, B et C furent donc les trois premiers découverts, et sont d'ailleurs les plus fréquemment rencontrés. Les variants A et B se différencient par la présence de deux acides aminés aux positions 64 (la glycine du variant A se substitue à l'asparagine) et 118 (la valine du variant A se substitue à l'alanine). La séquence complète de ces variants est décrite dans la littérature (Wong et al., 1996; Sawyer, 2003; Kontopidis et al., 2004).

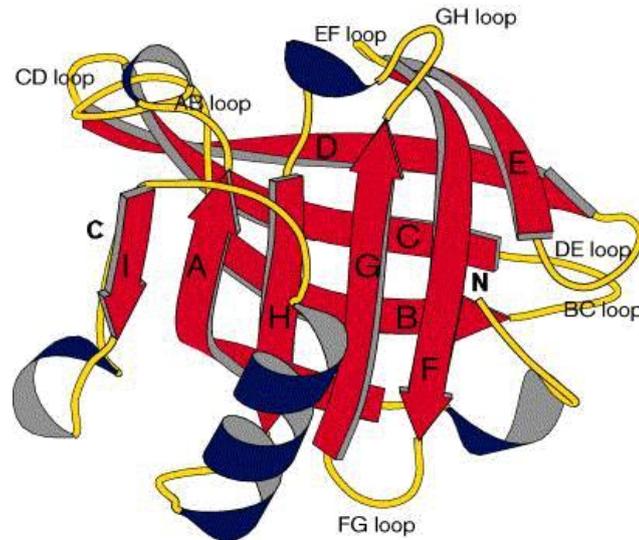


Figure 11. Structure tridimensionnelle d'un monomère de bêta-lactoglobuline en solution aqueuse (d'après Brownlow et *al.*, 1997). Feuilles  $\beta$  (annotés de A à I) en rouge, hélice  $\alpha$  en bleu, structures désordonnées en jaune reliant les feuillets deux par deux. FG loop signifie boucle FG ou circuit FG.

La bêta-lactoglobuline se différencie de l'alpha-lactalbumine par l'absence de groupement thiol libre dans la molécule d'alpha-lactalbumine. Ce groupement thiol permet d'initier des réactions covalentes qui aboutissent à une agrégation. L'alpha-lactalbumine est donc incapable de gélifier (Acharya et *al.*, 1989). La séquence peptidique de cette protéine ressemble fortement à celle du lysozyme, en particulier dans sa forme combinée au  $\text{Ca}^{2+}$  (Acharya et *al.*, 1989). Les protéines de lactosérum sont utilisées dans de nombreux produits alimentaires, et dans plusieurs formulations destinées à des applications spéciales, comme les formules lactées pour nourrissons, et les formulations diététiques pour athlètes (Morr et Ha, 1993; Horton, 1998).

Les nombreux groupements hydrophiles ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONH}-$  etc) constituant leur structure les prédisposent à interagir avec d'autres polymères naturels (Gunasekaran et *al.*, 2006, 2007). Les protéines de lactosérum ne font l'objet d'aucune réglementation pour l'instant. D'aucuns pensent qu'elles peuvent être considérées comme des ingrédients à haute valeur nutritionnelle, générant un effet de satiété après ingestion (Luhovy et *al.*, 2007). Leur passé, parsemé de succès dans divers domaines d'applications, leur réserve un avenir prometteur. Les protéines de lactosérum en milieu aqueux ont été utilisées comme solution d'imprégnation dans le cadre de cette thèse.

## Chapitre 1 : Contexte de l'étude

Dans la mise en œuvre d'un procédé d'encapsulation destiné aux probiotiques, il est important de prendre en compte deux aspects: le choix de la méthode d'encapsulation, et le choix des matériaux d'encapsulation. La méthode doit tenir compte de la nature des cellules (cellules vivantes) et de leur fragilité. L'utilisation de solvants autre qu'aquaux est à proscrire. L'objectif premier de l'encapsulation est d'abord de protéger les probiotiques, ce qui signifie que la matrice de protection doit être inerte, non toxique, compatible avec la structure de la cellule vivante. Le second objectif étant de permettre aux probiotiques de résister au passage de la barrière de l'estomac, la matrice doit donc montrer des propriétés de gastrorésistance. Le dernier objectif étant de libérer les probiotiques dans l'intestin, il est important que la matrice soit biodégradable.

Parmi l'ensemble des biopolymères disponibles, il va falloir procéder à une sélection rigoureuse des matériaux capables de satisfaire les objectifs sus-mentionnés. Cette sélection ne passe pas nécessairement par une étude expérimentale approfondie de tous les biopolymères disponibles, une telle approche ne serait pas réaliste. Un moyen simple consiste à réaliser une étude critique des données publiées sur ces biopolymères. A titre d'exemple, le chitosan est un biopolymère qui se dissout principalement en milieu acide. L'acide acétique est le composé le plus utilisé pour sa dissolution. La littérature rapporte parfois son utilisation en tant qu'agent d'enrobage des probiotiques (Krasaekoopt *et al.*, 2004). Il est évident qu'utiliser une solution acide pour enrober des probiotiques est un paradoxe, car ces cellules sont réputées être sensibles à l'acidité.

Il est possible d'éprouver d'autres types de matériau, pourvu qu'ils aient été insuffisamment étudiés dans la littérature. Il est aussi possible d'envisager la formation de matériaux hybrides en combinant en solution plusieurs matériaux pris isolément.

# **CHAPÎTRE 2 : ENCAPSULATION DES PROBIOTIQUES**

### 1. Introduction

La tolérance à l'acidité des probiotiques est dépendante de la souche bactérienne. Parmi les probiotiques les moins tolérants, les souches de *L. plantarum* sont les plus fréquemment incriminées. La faible tolérance à l'acidité de cette espèce bactérienne nécessite que des moyens soient mis en œuvre pour la protéger. Parmi ces moyens de protection, l'encapsulation apparaît être une alternative prometteuse. Encapsuler des probiotiques implique l'utilisation d'une méthode d'encapsulation douce, c'est-à-dire non agressive des cellules vivantes.

La méthode par extrusion/gélification est adaptée à l'encapsulation des probiotiques. Cette méthode est largement décrite dans la littérature (Kearney *et al.*, 1990; Champagne *et al.*, 1992a; Velings et Mestdagh, 1995; Jankowski *et al.*, 1997; Serp *et al.*, 2000; Mladenovska *et al.*, 2007; Homayouni *et al.*, 2008; Gbassi *et al.*, 2009). Par ailleurs, les matériaux utilisés pour l'encapsulation des probiotiques doivent présenter des garanties de non toxicité. Ces matériaux bénéficient de l'approbation des organismes chargés de la réglementation, tant au niveau national qu'international.

Dans ce travail de thèse, il a été réalisé pour la première fois une étude comparative de la sensibilité de trois souches de *L. plantarum* dans trois milieux acides de nature et de composition différentes. Ces bactéries ont été testées dans leur état non encapsulé. La méthode par extrusion/gélification a ensuite été choisie pour élaborer des supports de protection de ces bactéries. L'élaboration de ces supports a mis en jeu des interactions entre le  $\text{Ca}^{2+}$  et des polysaccharides. Ce type d'interaction a été décrit précédemment (Wang *et al.*, 1996; Mattison *et al.*, 1998; de Kruift *et al.*, 2004). Des billes de taille millimétrique ont été produites, et ont permis d'encapsuler les trois souches de *L. plantarum* utilisées comme modèle de bactéries lactiques. Aucune publication à ce jour ne fait mention de l'encapsulation de cette espèce bactérienne en dehors de la notre (Gbassi *et al.* 2009). Les principaux résultats de l'étude de la sensibilité des souches non encapsulées, ainsi que ceux relatifs au procédé d'encapsulation, sont présentés dans cette partie du travail de thèse.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Etude de la sensibilité à l'acidité des bactéries non encapsulées

#### 2.1.1. Choix des souches bactériennes

Il est bien connu que la tolérance à l'acidité des bactéries varie d'une espèce à une autre, et d'une souche à une autre au sein de la même espèce. Afin de minimiser les variabilités inter-espèces, l'idéal est de sélectionner des souches de la même espèce. Dans ce travail de thèse, des souches appartenant à *L. plantarum* ont été sélectionnées à partir d'une dizaine de souches au départ. Après un test d'acidité (NaCl 9 g/L, pH 1,8), les souches les plus moins tolérantes ont été retenues comme modèles de bactéries lactiques.

Au nombre de trois, nous avons travaillé avec une souche de la collection de l'institut Pasteur de France (*L. plantarum* CIP-A159), une autre de la collection allemande des microorganismes et cultures cellulaires (*L. plantarum* DSMZ-9843). La souche de la collection allemande est habituellement connue sous le nom de *L. plantarum* 299v. La troisième souche est un isolat de laboratoire. Elle a été isolée du raifort (plante de la famille des Brassicaceae) dont la racine est utilisée comme condiment. Les études phénotypiques et génotypiques (Hybridation ADN/ADN, séquençage de l'ARNr 16S) conduites au laboratoire ont établi une parenté génétique avec l'espèce *L. plantarum*. Cette souche a donc été baptisée *L. plantarum* 800. Le chiffre 800 est un numéro de classification interne, propre au laboratoire. Cette souche n'a pas encore été déposée dans une collection reconnue.

#### 2.1.2. Conditions de culture des souches bactériennes

L'eau milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, Molsheim, France) a servi aux différentes manipulations. Les trois souches bactériennes ont été soumises dans un premier temps à un processus de préculture. Cette préculture a consisté à prélever un échantillon de chaque bactérie à l'aide d'une anse stérile en matière plastique à usage unique (Labo-Moderne<sup>®</sup>, Paris, France), et à l'inoculer dans un tube à hémolyse en verre, à fond rond avec bouchon à vis autoclavable (VWR<sup>®</sup>, Strasbourg, France). Le tube à hémolyse contenait au préalable 5 mL de bouillon MRS (Biokar<sup>®</sup> diagnostics, Beauvais, France) préalablement stérilisé (120°C, 20 min). Le bouillon MRS était composé de polypeptone (10 g/L), de glucose (20 g/L), d'extraits de

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

viande (10 g/L), d'extraits de levure (5 g/L), de tween 80 (1,08 g/L), de phosphate dipotassique (2 g/L), d'acétate de sodium (5 g/L), de citrate d'ammonium (2 g/L), de sulfate de magnésium (0,2 g/L) et de sulfate de manganèse (0,05 g/L).

Les trois tubes à hémolyse obtenus ont été incubés à 37 °C pendant 16 h (phase de préculture). L'étape de préculture a permis une adaptation des bactéries aux conditions du milieu, mais surtout, a amorcé leur phase de croissance exponentielle. Par la suite, un volume de 0,1 mL de chacune des précultures (issu de chaque tube à hémolyse) a été introduit dans un flacon en verre borosilicaté de 250 mL surmonté d'un bouchon à vis en polypropylène stérilisable (Schott<sup>®</sup>, Mainz, Allemagne). Chaque flacon en verre contenait 100 mL de bouillon MRS préalablement stérilisé. Après une incubation à 37 °C pendant 24 h (phase de culture bactérienne), les trois flacons ont été homogénéisés par agitation manuelle, et le contenu de chacun d'eux a été reparti dans 4 tubes en polypropylène de type Falcon (Corning<sup>®</sup>, New York, États-Unis), à raison d'environ 25 mL par tube.

L'ensemble des 4 tubes Falcon a été introduit dans une centrifugeuse (GS-15R Beckmann<sup>®</sup>, Hambourg, Allemagne) réglée à 4000 tours/min pendant 5 min à 6 °C. Les différents surnageants ont été rejetés, 10 mL de solution stérile à base de tampon phosphate de sodium (TPS) ont été introduits dans chaque tube Falcon pour un lavage des différents culots bactériens. La solution aqueuse de TPS était constituée de 8 g/L de NaCl (VWR<sup>®</sup>, Strasbourg, France); 0,2 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Allemagne) et 1,44 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Allemagne). Une solution d'hydroxyde de sodium (Panreac<sup>®</sup>, Barcelone, Espagne) à 5 mol/L a permis d'ajuster le pH du TPS à 7, grâce à une électrode de pH en verre (Schott<sup>®</sup>, Mainz, Allemagne) reliée à un enregistreur de données (Knick<sup>®</sup>, Berlin, Allemagne). La solution de TPS a ensuite été stérilisée à l'autoclave (120 °C, 20 min). Il a été vérifié sur une fraction de la solution stérile que la stérilisation à l'autoclave n'a pas modifiée le pH du TPS.

Les 4 tubes Falcon ont été centrifugés à nouveau dans les mêmes conditions que précédemment. Après avoir de nouveau rejeté les surnageants, le culot bactérien des 4 tubes a été concentré dans un volume unique de 10 mL de TPS. Chaque souche bactérienne a fait l'objet d'une concentration sous ce volume. Enfin, c'est à partir de l'inoculum bactérien de chaque souche (10 mL) que le dénombrement initial de *L. plantarum* a été effectué, ainsi que

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

les études de tolérance à l'acidité. L'inoculum bactérien a été à chaque fois renouvelé, avant toute nouvelle expérimentation, dans les mêmes conditions de préculture et de culture.

### 2.1.3. Choix des liquides acides artificiels

Trois liquides artificiels simulant des conditions d'acidité gastrique ont été utilisés au cours de ce travail de thèse. Il s'agit d'une solution aqueuse de chlorure de sodium (VWR<sup>®</sup>, Strasbourg, France) à 9 g/L, additionnée de pepsine d'origine porcine (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, Allemagne) à la concentration de 3 g/L. Le second liquide est le bouillon MRS (55 g/L) également additionné de pepsine à la même concentration. Le troisième liquide est une solution aqueuse de protéose-peptone (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, Allemagne) à 7,5 g/L contenant la même concentration en pepsine.

### 2.1.4. Détermination de l'acidité des différents liquides

Le pH permet de déterminer l'acidité d'une solution. Il existe trois façons de déterminer le pH d'une solution: l'utilisation d'un indicateur coloré, l'utilisation de papier pH et l'utilisation d'un pH-mètre. Les principaux inconvénients des indicateurs colorés et des papiers pH sont la subjectivité dans l'appréciation des couleurs par l'utilisateur, et l'inexactitude des mesures due à l'étendue de la zone de virage. La dernière alternative demeure l'utilisation d'une électrode de pH reliée à un enregistreur de données (pH-mètre). C'est un dispositif qui permet de déterminer avec exactitude le pH d'une solution en immergeant l'électrode dans la solution inconnue. Il existe plusieurs types d'électrodes, notamment les électrodes ioniques à membrane de polymère. Celles-ci ont particulièrement trouvé des applications dans la détermination des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ , et  $\text{NO}_3^-$  contenus dans les aliments (Comer, 1978). Les électrodes en verre sont couramment utilisées pour la mesure du pH des produits laitiers (Upreti *et al.*, 2004). Ces électrodes ont une bonne sélectivité vis-à-vis des protons  $\text{H}^+$ . Elles permettent des mesures directes de l'échantillon sans une préparation préalable de celui-ci.

L'électrode de verre a donc été utilisée dans cette étude. Cette électrode (Schott<sup>®</sup>, Mainz, Allemagne) a combiné dans le même verre l'électrode de référence, l'électrode de mesure et un capteur automatique de température (allant de 5 à 100 °C). Cette électrode garantit des mesures de pH dans un intervalle compris entre 0 et 14. Un étalonnage manuel du

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

pH-mètre a été réalisé avant chaque expérimentation. Deux types de solution tampon (Schott<sup>®</sup>, Mainz, Allemagne) à 25 °C ont été utilisés. Il s'agit des solutions à pH 4,01 et 6,87 tamponnées par du tetroxalate de potassium à 0,05 mol/L. Le tetroxalate de potassium est un matériau de référence utilisé depuis 1975 pour la mesure du pH. Il a été recommandé en 1985 par l'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (Baucke, 1994).

Trois valeurs de pH gastrique ont été retenues à défaut d'évaluer toute la plage de pH comprise entre 1 et 3. Le choix des valeurs de pH de 1,3; 1,8 et 3 n'a reposé sur aucun critère particulier. Ces valeurs sont comparables aux valeurs étudiées dans la littérature pour simuler un milieu gastrique artificiel. Après l'étalonnage du pH-mètre, l'électrode de verre a été plongée dans chaque liquide artificiel. Le pH mesuré a été ajusté aux valeurs désirées (1,3; 1,8 et 3) à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (Riedel-de Haen<sup>®</sup>, Seelze, Allemagne) à 37% (v/v). Les différents liquides ont ensuite été filtrés sur des cartouches stériles de 0,45 µm (Macherey-Nagel<sup>®</sup>, Hoerd, France). La stérilisation par filtration a été préférée à la stérilisation à l'autoclave, en raison de la présence de pepsine (enzyme), afin d'éviter sa dénaturation thermique et une perte de son activité enzymatique. Un volume de 9 mL de chaque liquide artificiel acide a été recueilli dans plusieurs tubes Falcon. L'ensemble des tubes a été incubé à 37 °C, et a servi pour les différentes études *in vitro*.

### 2.1.5. Tolérance à l'acidité des bactéries non encapsulées

L'objectif de cette étude *in vitro* a été d'évaluer l'effet du pH sur la survie des différentes souches de bactéries. Toute réduction significative de la concentration bactérienne à un temps T, par rapport à la concentration initiale, a été interprétée comme une preuve de sensibilité à l'acidité. Après avoir agité au vortex l'inoculum bactérien (10 mL), 1 mL a été prélevé et ajouté dans chaque tube Falcon contenant 9 mL de liquide artificiel acide (NaCl, MRS et protéose peptone à pH 1,3; 1,8 et 3).

Il est possible que l'ajout de 1 mL de l'inoculum bactérien issu de la culture ait pu modifier le pH initial des liquides artificiels. Une vérification du pH du mélange résultant supposerait une nouvelle mesure du pH, à l'aide du pH-mètre. Cela n'a pas été réalisé en pratique. Toute nouvelle mesure du pH n'était plus adaptée aux conditions de l'expérimentation (liquide artificiel conditionné dans des tubes Falcon, volume insuffisant pour une mesure exacte du pH, difficulté d'homogénéisation du liquide au risque de briser

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

l'électrode de verre). Au regard de tous ses obstacles, il nous a semblé plus raisonnable de faire fi d'une éventuelle modification du pH. Dans tous les cas, la modification du pH qui pourrait résulter de l'ajout de 1 mL de l'inoculum bactérien dans les différents liquides artificiels ne saurait remettre en cause le comportement des bactéries au sein de ces liquides.

Ainsi, après ajout des inocula bactériens dans les différents tubes Falcon, ceux-ci ont été incubés à 37 °C, sous une agitation rotative (50 tours/min). Des prélèvements ont été réalisés après des durées d'incubation précises. Le dénombrement bactérien a permis de visualiser la présence ou non d'unités formant une colonie (UFC). Le protocole de dénombrement a consisté à réaliser des dilutions en série dans du NaCl (9 mL, 9 g/L) de chacun des prélèvements de 1 mL. Ensuite, un volume de 0,1 mL de la dilution appropriée a été étalé sur des boîtes de gélose. Ces dernières ont été incubées à 37 °C pendant 48 h. On considère qu'une UFC correspond à une bactérie. Le nombre d'UFC dénombré sur chaque boîte de gélose, connaissant le volume de l'étalement (0,1 mL), a permis de déduire la quantité approximative de bactéries dans le milieu.

Des témoins ont été traités en introduisant 1 mL de l'inoculum bactérien dans 9 mL de NaCl, MRS ou peptone à pH 6,5. Ces témoins ont servi à déterminer la population bactérienne initiale des trois inocula bactériens. Chacun des inocula a fait l'objet de trois essais indépendants. Pour chaque essai, trois dénombrements sur boîte de Pétri ont été réalisés. Des valeurs moyennes et des écarts-types ont été calculés (n=9). La comparaison des moyennes a été réalisée à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney. Le traitement des données a été effectué à l'aide du logiciel AstroResearch® (Delboy, 2003). La différence a été considérée significative pour tout  $P < 0,05$ .

## 2.2. Études des dispersions aqueuses de biopolymères

### 2.2.1. Choix des biopolymères et des réactifs

Les biopolymères utilisés ont été en majorité des polysaccharides: l'alginate de sodium (MM=71,24 KDa, Fluka®, Buchs, Suisse), la pectine sous la forme d'acide pectique (MM=76,3 KDa, Fluka®, Buchs, Suisse) et le kappa-carraghénane (lot n° 8877, Ceca®, Villacoublay, France). Les protéines de lactosérum (BiPro) ont été offertes par Davisco® Foods International (Le sueur, Minnesota, États-Unis). Les réactifs utilisés ont été l'eau milli-

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

Q (Millipore<sup>®</sup>, Mundolsheim, France), l'acide chlorhydrique (Riedel de Haen<sup>®</sup>, Seelze, Allemagne) et l'hydroxide de sodium (Panreac<sup>®</sup>, Barcelone, Espagne).

### 2.2.2. Analyse physicochimique des dispersions aqueuses de biopolymères

#### 2.2.2.1. Mesure de la turbidité des dispersions aqueuses

Le spectrophotomètre UV-Visible à double faisceau (Modèle 2401PC, Shimadzu<sup>®</sup>, Tokyo, Japon) a été utilisé pour mesurer la turbidité des différentes dispersions aqueuses des biopolymères. Un volume de 100 mL de chaque dispersion de biopolymères (0,1%, m/v) a été préparé avec de l'eau milli-Q. L'immersion de l'électrode de pH dans les 100 mL de la dispersion aqueuse a permis d'ajuster le pH à 8, à l'aide d'une solution d'hydroxide de sodium à 5 mol/L. Un volume de 5 mL de chacune des dispersions à pH 8 a été prélevé et conditionné dans des tubes Falcon de 10 mL (Corning<sup>®</sup>, New York, États-Unis). L'électrode de pH a de nouveau été plongée dans les 95 mL de dispersion aqueuse restante. Le pH a été ajusté à 7 avec de l'acide chlorhydrique molaire et un prélèvement de 5 mL a été conditionné dans des tubes Falcon.

Les autres ajustements du pH à 6, 5, 4, 3, 2 et 1 ont respectivement été suivis d'un prélèvement de 5 mL. Par la suite, un volume de 1 mL a été prélevé à partir des 5 mL de chaque dispersion. Ce volume a été introduit dans une cuve en quartz. La lecture à 600 nm à travers une cellule de trajet optique de 1 cm, a été réalisée contre un blanc constitué de 1 mL d'eau milli-Q. Trois mesures indépendantes ont été réalisées sur chaque dispersion.

La turbidité est le paramètre qui mesure le trouble dans une dispersion. Ce trouble est lié à la présence de particules colloïdales au sein de la dispersion. On la définit plus rigoureusement comme étant la réduction de la transparence d'un liquide par des matières non dissoutes (Kleizen *et al.*, 1995). Les particules gazeuses ou solides obstruent le passage de la lumière au travers du liquide. C'est donc un phénomène optique qui est mis en jeu. La turbidité ne peut donc être mesurée que par des méthodes optiques. La mesure de la turbidité d'un composé est proportionnelle à son absorbance. Une mesure de turbidité dépend de beaucoup de facteurs: angle de détection, longueur d'onde de la lumière incidente, taille des particules etc. Des mesures de turbidité ont été réalisées sous un angle de 90° par rapport à

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

l'axe du faisceau (Kleizen *et al.*, 1995). Dans notre étude, l'angle de détection a été de 180° du fait de la présence d'un double faisceau dans le spectrophotomètre.

En général, l'absorbance des dispersions aqueuses de polysaccharides est mesurée à la longueur d'onde de 600 nm (Harnsilawat *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2010). A cette longueur d'onde, les protéines comme les polysaccharides n'absorbent pas la lumière (Harnsilawat *et al.*, 2006). Une longueur d'onde fixe permet de garantir la reproductibilité des mesures portant sur le même échantillon (Xu *et al.*, 2006, 2008). Elle permet aussi de détecter toutes modifications de l'absorbance liées à l'agrégation des particules. Seules les particules de taille  $\leq 1 \mu\text{m}$  sont prises en compte dans l'évaluation de la turbidité (Xu *et al.*, 2006).

L'obtention de particules de taille  $\leq 1 \mu\text{m}$  n'est possible qu'à des concentrations très faibles, c'est-à-dire en milieu dilué. Dans ce cas, l'appareil suit alors la loi de Beer-Lambert. La turbidité, qui correspond à une perte de la lumière incidente suite à la diffusion de la lumière dans l'échantillon, est proportionnelle à la concentration des particules de l'échantillon (Kleinzen *et al.*, 1995). Dans la littérature, la turbidité s'exprime de plus en plus en  $\text{cm}^{-1}$ . Cette unité de mesure de la turbidité découle de la théorie de Rayleigh-Debye (Erbil *et Sarac*, 2002; Xu *et al.*, 2008). Cette théorie démontre qu'il existe une relation entre la turbidité ( $\tau$ ) et la transmittance (T) selon l'équation suivante:  $\tau = -\log(T)/L$ . L (exprimée en cm) est la longueur du trajet optique parcouru par la lumière dans la dispersion.

D'après la loi de Beer-Lambert, l'absorbance  $A = \log(1/T)$ . L'équation peut s'écrire à nouveau de la façon suivante:  $\tau = \log(A)/L$ . Dans le spectrophotomètre UV-Visible utilisé (Shidmazu<sup>®</sup>, 2401 PC), le trajet optique est de 1 cm, ce qui permet d'écrire que  $\tau = \log(A) \times \text{cm}^{-1}$ . On voit bien donc que la turbidité est proportionnelle à l'absorbance mesurée, et que son unité est bien le  $\text{cm}^{-1}$ . Toute augmentation de l'absorbance d'un composé, à une longueur d'onde où ce composé n'absorbe pas la lumière, signe la présence d'un trouble dans l'échantillon. Lorsque les particules dans l'échantillon sont proches les unes des autres, et que la lumière diffusée est diffractée par les autres particules (phénomène de diffusion multiple), la loi de Beer-Lambert ne s'applique plus. Le recours à un phénomène de diffraction de la lumière s'avère indispensable.

### 2.2.2.2. Mesure de la taille particulière des dispersions aqueuses

Une des applications du Nano-Zétasizer ZS (Malvern<sup>®</sup>, Worcestershire, Royaume-Uni) est la mesure des tailles particulières en utilisant le phénomène de la diffraction de la lumière. La taille des particules a été mesurée sur les dispersions aqueuses diluées (0,1%, m/v), précédemment préparées. Sur le volume de 4 mL restant, il a été prélevé 1 mL de chaque dispersion à un pH donné (pH 1, pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7 et pH 8). Ce volume de 1 mL a été introduit dans une cuve en quartz. Celle-ci a été positionnée dans le lecteur optique de l'appareil. Les conditions expérimentales de la mesure ont été les suivantes: température de la cellule fixée à 25°C, nombre de répétitions automatiques de la mesure fixé à trois. Enfin, trois analyses indépendantes ont été réalisées sur chaque dispersion. Des valeurs moyennes et des écarts-types ont été calculés (n=9).

Le Nano-Zétasizer ZS est équipé d'un laser hélium-néon d'une puissance de sortie de 4 mW fonctionnant à la longueur d'onde fixe de 633 nm (longueur d'onde d'émission du laser, dans le rouge). Cet appareil permet de mesurer des tailles comprises entre 1 nm et 10  $\mu$ m. La lumière du laser diffuse à travers les particules qui sont en mouvement dans l'échantillon. Les particules diffractent la lumière laser, les plus petites particules diffractant davantage la lumière que les grandes. La lumière diffractée est reçue par une série de photodétecteurs placés à différents endroits, couvrant un angle de 173°. Toute la lumière reçue va constituer l'image de diffraction de l'échantillon. Cette image sera utilisée pour mesurer la taille des particules via la théorie de la diffusion de la lumière.

Plusieurs théories ont été décrites dans la littérature: la théorie de Mie, la théorie de Rayleigh-Gans-Debye (RGD) et la théorie de la matrice T (Xu *et al.*, 2006). Le mécanisme d'acquisition des images de l'échantillon, avec cet appareil, repose sur la théorie de Mie. Cette théorie est la plus rigoureuse car elle repose sur les équations de champ électromagnétique de Maxwell. Deux hypothèses sont émises sur cette théorie: d'abord la particule est supposée sphérique, ce qui n'est pas le cas dans la mesure où peu de particules sont en réalité sphériques. Pour cette raison, la taille des particules est calculée à partir du volume mesuré de la particule, en imaginant une sphère ayant un volume équivalent.

Enfin, la concentration de l'échantillon est supposée faible, ce qui est réalisable en pratique en travaillant en milieu dilué, mais cela ne résout pas le problème de la diffusion

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

multiple (diffraction de la lumière par les autres particules avant d'atteindre le détecteur). Des corrections de la diffusion multiple ont été proposées par les fabricants, utilisant des algorithmes complexes, le plus souvent brevetés. D'autres techniques comme la chromatographie d'exclusion stérique, l'ultracentrifugation dynamique, auraient pu conduire à des résultats de tailles particulières, mais la possibilité qu'offre le Nano-Zétasizer ZS, de mesurer en même temps la mobilité électrophorétique, exprimée par le potentiel zêta, sur le même échantillon, a retenu toute notre attention.

### 2.2.2.3. Mesure du potentiel zêta des dispersions aqueuses

La mesure du potentiel zêta a été réalisée à l'aide du Nano-Zétasizer ZS, sur des dispersions aqueuses diluées (0,1%, m/v), à différentes valeurs de pH (pH 1, pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7 et pH 8). A l'aide d'une seringue, 1 mL de chaque dispersion a été introduit dans la cuve de mesure (cuve spéciale en forme de U à usage unique) jusqu'à remplissage complet. La cuve a ensuite été positionnée dans le lecteur optique de l'appareil. Les conditions expérimentales de la mesure étaient les suivantes: température de la cellule fixée à 25°C, intensité de la décharge appliquée réglée à 200 mV, nombre de répétitions automatiques de la mesure fixé à trois. Enfin, trois analyses indépendantes ont été réalisées sur chaque échantillon. La durée moyenne d'une analyse a été d'environ 10 min.

Le potentiel zêta mesure l'importance de la répulsion ou de l'attraction entre des particules en suspension. Il donne une description de la dispersion électrostatique. Le principe de la mesure consiste à appliquer une décharge électrique à la dispersion. Les particules chargées contenues dans la dispersion vont migrer vers l'électrode de charge opposée, selon une vitesse proportionnelle à l'amplitude de la décharge appliquée. Cette vitesse est mesurée par la technique d'anémométrie laser doppler (encore appelée granulométrie laser doppler).

La mesure du potentiel zêta doit être conduite sur des dispersions aqueuses diluées contenant des particules de tailles  $< 10 \mu\text{m}$ , condition essentielle pour une interprétation juste des valeurs (Ducel *et al.*, 2005; Narong et James, 2006). Toute modification de la fréquence d'un faisceau laser incident à l'endroit d'une particule est interprétée comme une mobilité de cette dernière. Cette mobilité électrophorétique est par la suite convertie en potentiel zêta, à l'aide des théories en vigueur, notamment l'équation de Helmholtz-Smoluchowski (Narong et James, 2006) ou l'équation de Henry (Ducel *et al.*, 2005).

### 2.3. Procédé d'élaboration des billes de biopolymères

#### 2.3.1. Conditions de l'élaboration

Plusieurs étapes ont été nécessaires dans la réalisation de ces billes, avec notamment quelques aménagements en fonction du type de biopolymère. Globalement, une première étape de pesée des échantillons a été suivie d'une étape de dispersion des échantillons dans de l'eau milli-Q. La troisième étape relative à la dissolution des échantillons, a été réalisée par chauffage et/ou agitation. La quatrième étape qui concerne la stérilisation a été très importante. En effet, l'objet à encapsuler est une bactérie et cette dernière devra évoluer dans un environnement stérile. C'est pourquoi, les dispersions aqueuses des biopolymères ont été stérilisées à l'autoclave pour les polysaccharides, et par filtration membranaire pour les protéines de lactosérum.

L'étape d'extrusion/gélification dans la solution de chlorure de calcium (Alfa Aesar<sup>®</sup>, Karlsruhe, Allemagne) s'est déroulée en conditions stériles. En effet, les seringues (Terumo<sup>®</sup>, Louvain, Belgique) dans lesquelles ont été introduites les dispersions aqueuses étaient stériles à l'ouverture de l'emballage. La solution de chlorure de calcium a été stérilisée à l'autoclave. Les manipulations sous la hotte ont été conduites dans des conditions d'asepsie rigoureuse, notamment la désinfection de l'espace de manipulation et de tous instruments exportés sous la hotte par de l'éthanol à 70% (v/v) préparé à partir de l'éthanol pur (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, Allemagne), et la désinfection fréquente des mains par le gel hydroalcoolique (Anios<sup>®</sup>, Lille, France). L'éthanol à 70% est connu pour ses propriétés bactériostatiques, voire bactéricides. En effet, la présence d'eau dans l'éthanol est nécessaire pour assurer la dénaturation des protéines bactériennes, ce qui va conduire à la mort cellulaire des bactéries. La différence de taille des aiguilles utilisées était principalement liée à la viscosité des dispersions préparées. Cette viscosité est elle-même liée à la concentration du biopolymère en solution. Les conditions expérimentales de l'élaboration des billes de biopolymères sont résumées dans le [tableau 9](#).

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

Tableau 9. Conditions expérimentales utilisées pour l'élaboration des billes à base de biopolymères.

	Types de biopolymères			
	Alginate de sodium	Acide pectique	kappa-Carraghénane	Protéines de lactosérum
Concentration testée (m/v)	1%, 2% et 3%	2%, 4% et 6%	1%, 2% et 3%	5%, 10% et 15%
Température de chauffage	60 °C	60 °C	70 °C	Pas de chauffage
Durée d'agitation	30 min	60 min	30 min	≥ 120 min
Température de refroidissement	Température ambiante (25 °C)		> 40 °C sinon solidification	Pas de refroidissement
Type de stérilisation	Autoclave (120 °C, 20 min)			Membrane filtrante (0,45 µm)
Dispositif d'extrusion	Seringue stérile			
Volume prélevé	5 mL			
Type d'aiguille	27G* Stérile 0,4×20 mm	23G Stérile (0,6×25 mm)		27G Stérile 0,4×20 mm
Concentration en CaCl <sub>2</sub>	1,5% (m/v), à stériliser à l'autoclave			
Conditions de manipulation	Hotte à flux laminaire (nécessité de travailler en conditions stériles)			

\* G : unité de mesure de la taille des aiguilles où plus particulièrement du diamètre interne (Di). On parle d'aiguille fine pour tout Di < 1 mm (à partir de 21G) et d'aiguille de gros calibre pour tout Di > 1 mm (en dessous de 21G, c'est le cas du 18G=1,6 mm, du 16G=1,8 mm ou du 14G=2,1 mm).

Les concentrations en biopolymères ont été choisies de façon arbitraire, afin d'obtenir les concentrations capables de générer des billes au contact de la solution de Ca<sup>2+</sup>. Ce cation divalent a été choisi dans cette étude pour constituer le milieu gélifiant. Il possède une affinité élevée vis-à-vis des polysaccharides de charges négatives (Draget *et al.*, 1998; Khromova, 2006; Smerdel *et al.*, 2008; Panouille et Larreta-Garde, 2009) comparativement à l'ensemble des cations monovalents. Les températures de chauffage et les délais d'agitation ont été nécessaires pour assurer la dissolution en milieu aqueux des différents polysaccharides (Fundeanu *et al.*, 1998; Mangione *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2008). Une durée minimale d'agitation de 2 h des protéines de lactosérum a été recommandée pour une bonne hydratation de leurs chaînes peptidiques (Kitabatake et Kinekawa, 1998; Harnsilawat *et al.*, 2006; Gunasekaran *et al.*, 2007).

### 2.3.2. Elaboration des billes et analyses macroscopique et microscopique

Le procédé d'élaboration des billes a fait appel à la technique du goutte à goutte, qui consiste à laisser tomber la dispersion de biopolymère contenue dans la seringue dans une solution de  $\text{Ca}^{2+}$ , à l'aide du dispositif d'extrusion (seringue surmontée d'une aiguille). Des billes de biopolymères ont pu être obtenues par ce procédé. Des images de ces billes à l'état frais ont été prises à l'aide d'un microscope optique (Leica MacroFluo<sup>®</sup>, Heerbrugg, Suisse) équipé d'un objectif de faible grossissement ( $G \times 0,8$ ). Ce microscope était également équipé d'un système de zoom à correction apochromatique (correction des aberrations de couleurs).

L'absence de cryo-microscope électronique à balayage (dont nous ne disposons pas), n'a pas permis de visualiser ces billes à l'état frais. C'est la raison pour laquelle les billes ont été lyophilisées. Après lyophilisation, les billes ont été collées sur un support adhésif, métallisées avec une couche de palladium, dans une chambre sous vide, sous un faible débit d'azote pendant 5 min, puis analysées au microscope électronique à balayage (MEB, Philips<sup>®</sup> XL 20, Oregon, États-Unis). Les images de MEB qui ont été prises ont permis d'apprécier la taille, la forme et la texture des billes. L'autre raison, non moins importante, de la lyophilisation des billes, a été leur conservation. En effet, les billes lyophilisées, comparées aux billes fraîches, ont été celles qui se sont le mieux conservées. Le phénomène de synérèse est généralement à la base de la mauvaise conservation des billes fraîches (Smidsrod et Draget, 1996; Rayment et al., 2009).

La lyophilisation a donc été réalisée sur des billes fraîches qui ont été pesées par lot de 0,2 g. Chaque lot a été introduit dans des flacons spéciaux, en verre, adaptés spécialement pour la lyophilisation. Cette dernière s'est déroulée durant 12 h dans un lyophilisateur (Christ Freeze-dryer 1-4 LSC, Fischer Bioblock<sup>®</sup>, Illkirch, France). La lyophilisation a démarré par une phase de congélation de 15 min dans de l'azote liquide, suivie d'une phase de dessiccation (dessiccation primaire de 10 h à la pression de 0,20 mbar, dessiccation secondaire de 2 h à la pression de 0,09 mbar).

### 2.4. Optimisation des propriétés des billes

L'analyse microscopique de la surface des billes a consisté à rechercher des défauts (fracture, cassure etc). Cette analyse a permis de sélectionner les billes qui présentaient le meilleur aspect morphologique. Une fois sélectionnées, ces billes ont été imprégnées par une solution de protéines de lactosérum (4%, m/v, pH 7).

#### 2.4.1. Choix des produits

Les protéines de lactosérum et leur fraction majoritaire ( $\beta$ -lactoglobuline) proviennent de chez Davisco<sup>®</sup> (Le sueur, Minnesota, États-Unis). Le Tris-Acide a été obtenu chez Usb<sup>®</sup> (Worcester, Massachusetts, États-Unis) et le Tris-Base chez Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Steinheim, Allemagne). Tris est l'abréviation de trishydroxyméthylaminométhane, encore appelé 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol selon la nomenclature chimique internationale. On parle de Tris-Acide ou Tris-Base selon que le pH du Tris ait été obtenu par acidification ou non. L'éthanol et le méthanol ont été obtenus chez Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Steinheim, Allemagne). L'acide acétique, le sulfate d'ammonium et le glycérol proviennent de chez Fluka<sup>®</sup> (Buchs, Suisse).

Le sodium dodecyl sulfate (SDS), le 2-mercaptoéthanol, l'acrylamide, le bis-acrylamide et le bleu de coomassie colloïdal G-250 ont été obtenus chez Bio-Rad<sup>®</sup> (Hercule, Californie, États-Unis). Le bleu de bromophénol provient de chez Ems<sup>®</sup> (Pasadena, Californie, États-Unis) et la glycine de chez Euromedex<sup>®</sup> (Mundolsheim, France). Des enzymes comme la pepsine d'origine porcine, la pancréatine et la trypsine d'origine bovine ont été obtenues chez Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Steinheim, Allemagne). Des sels biliaires (mélange d'acide cholique et d'acide déoxycholique) ont également été obtenus chez Fluka<sup>®</sup> (Buchs, Suisse).

#### 2.4.2. Etude de la stabilité des protéines de lactosérum

Un volume de 100 mL d'une solution aqueuse de protéines de lactosérum (0,1%, m/v) a été préparé. Son pH initial était de 7. La pureté de cette solution a été déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). La stabilité de la solution en conditions simulant un milieu gastro-intestinal artificiel a été évaluée. Pour cela, une partie de cette solution (25 mL) a été acidifiée à pH 1,8 par du HCl 3

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

mol/L, une autre partie (25 mL) en plus d'être à pH 1,8 contenait de la pepsine (0,3%, m/v), une troisième partie (25 mL) a été maintenue à pH 7 mais contenait de la pancréatine (1%, m/v), de la trypsine (1%, m/v) et des sels biliaries (0,3%, m/v). Le reste de la solution (25 mL) a servi de témoin. Chaque type de solution de départ a été incubée à 37 °C pendant 4 h (25 mL des solutions neutre, acide, acide plus pepsine, neutre plus pancréatine plus sels biliaries plus trypsine).

Après cette période, 50 µL de chacune des solutions ont été mélangés avec 50 µL du tampon de charge [tampon composé de 2,5 mL de glycérol pur; 0,5 mL de 2-mercaptoéthanol; 2 mL de solution aqueuse de SDS à 10% (m/v); 1,25 mL de solution aqueuse de Tris-Acide (0,5 mol/L, pH 6,8); 0,2 mL de solution aqueuse de bleu de bromophénol à 0,5% (m/v) et 3,55 mL d'eau milli-Q], ce qui a donné 100 µL de solution. Une dilution au 1/10 d'une partie de cette solution a été réalisée (10 µL du mélange + 90 µL d'eau milli-Q).

La préparation des gels a été la seconde étape de cette manipulation. Dans un premier temps, un gel unique à 30% (m/v) a été préparé en dissolvant 29,2 g d'acrylamide plus 0,8 g de bisacrylamide dans 100 mL d'eau milli-Q. Dans un second temps, deux gels ont été préparés à partir du gel unique. Le premier gel à 12% (v/v) était composé de 4 mL du gel unique à 30% (m/v); de 2,5 mL de solution aqueuse de Tris-Acide (0,5 mol/L, pH 6,8); de 0,1 mL de solution aqueuse de SDS à 10% (m/v) et de 3,4 mL d'eau milli-Q. Le second gel à 4% (v/v) était composé de 1,3 mL du gel unique à 30% (m/v); de 2,5 mL de solution aqueuse de Tris-Acide (0,5 mol/L, pH 6,8); de 0,1 mL de solution aqueuse de SDS à 10% (m/v) et de 6,1 mL d'eau milli-Q. Ces gels ont été coulés sur le support d'électrophorèse de type BioRad® Mini Protean II (10×8 cm).

Le premier gel à 12% (v/v) est un gel de séparation, il a été coulé en premier sur une hauteur d'environ 6 cm. Ensuite a été ajouté 1 mL d'éthanol, ce qui a permis d'obtenir une interface lisse et horizontale au cours de la polymérisation du premier gel. Après élimination de l'éthanol (par aspiration à l'aide d'une micropipette), le deuxième gel à 4% (v/v) appelé gel de concentration a été coulé au-dessus du premier, sur une hauteur d'environ 2 cm. Un peigne en téflon déposé sur le gel a permis de former dix puits. Le premier puit a été réservé pour le marqueur de taille (protéines de référence) et les autres puits pour les échantillons à analyser. Le support d'électrophorèse BioRad® Mini Protean II (10×8 cm) a été placé dans

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

une cuve contenant le tampon de migration (tampon aqueux composé de 3 g/L de Tris-Base, 14,4 g/L de glycine et 1 g/L de SDS).

Avant le dépôt des échantillons, les différentes solutions de protéines (diluée et non diluée) ont été mélangées au vortex puis incubées dans de l'eau bouillante pendant 5 min. Un dépôt de 20 µL de chaque solution a été réalisé dans les différents puits du gel. Un générateur (BioRad<sup>®</sup>, model 3000 Xi) a délivré une tension de 100 V pendant 15 min puis 150 V pendant 45 min. La migration a été contrôlée par le bleu de bromophénol qui indiquait le front de migration. La coloration au bleu de coomassie colloïdal a permis de révéler les différentes fractions des protéines de lactosérum.

A la fin de l'électrophorèse, le gel a été démoulé, fixé pendant 20 min [solution de fixation composée d'un mélange de méthanol à 45% (v/v) et d'acide acétique à 1% (v/v)] puis coloré pendant 18 h [solution de coloration composée d'un mélange de méthanol à 34% (v/v), de persulfate d'ammonium à 17% (m/v), d'acide acétique à 1% (v/v) et de bleu de coomassie G-250 à 0,1% (m/v)] sous une agitation rotative de 30 tours/min. Le gel a ensuite été décoloré avec de l'eau tiède ( $\approx 30$  à  $35^{\circ}\text{C}$ ). Quatre lavages d'une durée de 20 min par lavage ont suffi à décolorer le gel. Ce dernier a été numérisé à l'aide d'un densitomètre (Bio-Rad<sup>®</sup>, GS-800).

### 2.4.3. Encapsulation des bactéries dans des billes imprégnées et non imprégnées

Les souches bactériennes, après les phases de préculture et de culture, de lavage et de double centrifugation, ont permis d'obtenir un culot bactérien (paragraphe 2.1.2). Ce culot a servi de point de départ au procédé d'encapsulation. Ce culot, résultant de la concentration de 100 mL de bouillon bactérien, a été mélangé à 10 mL d'une suspension aqueuse d'alginate de sodium (2%, m/v, pH 7) préalablement stérilisée à l'autoclave ( $120^{\circ}\text{C}$ , 20 min), ce qui a permis d'obtenir un inoculum bactérien. Ce dernier a été introduit dans une seringue de 10 mL surmontée d'une aiguille de taille 27G (0,4 mm×20 mm). La pression manuelle exercée sur le piston de la seringue, a permis de laisser tomber goutte à goutte le contenu de la seringue dans une solution stérile de  $\text{CaCl}_2$  (1,5% m/v, 100 mL).

Après un temps de contact de 30 min, les gouttes gélifiées obtenues ont été séparées de la solution de  $\text{CaCl}_2$ . Cette dernière a été aspirée plusieurs fois à l'aide d'une micropipette de

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

5 mL (Eppendorf<sup>®</sup>, Yvelines, France). Un contrôle visuel des billes a permis d'effectuer un tri, afin de rejeter certains défauts de fabrication, notamment des défauts de forme (billes creuses, billes avec extrémité très effilée). Les billes retenues ont été des billes pleines, ressemblant plus ou moins à une sphère. Ces billes ont été rincées deux fois avec la solution stérile de  $\text{Ca}^{2+}$ . Les billes ont été pesées par lots de 0,2 g. Une partie des billes a été imprégnée en les immergeant dans 10 mL d'une solution aqueuse de protéines de lactosérum (4%, m/v, pH 7) pendant 30 min sous une agitation manuelle. L'autre partie des billes n'a subi aucun traitement. Les billes fraîches imprégnées et non imprégnées ont été congelées pendant 15 min dans de l'azote liquide puis lyophilisées pendant 12 h (10 h de dessiccation primaire à la pression de 0,20 mbar et 2 h de dessiccation secondaire à pression de 0,09 mbar). Le procédé d'encapsulation est schématisé à la [figure 12](#).

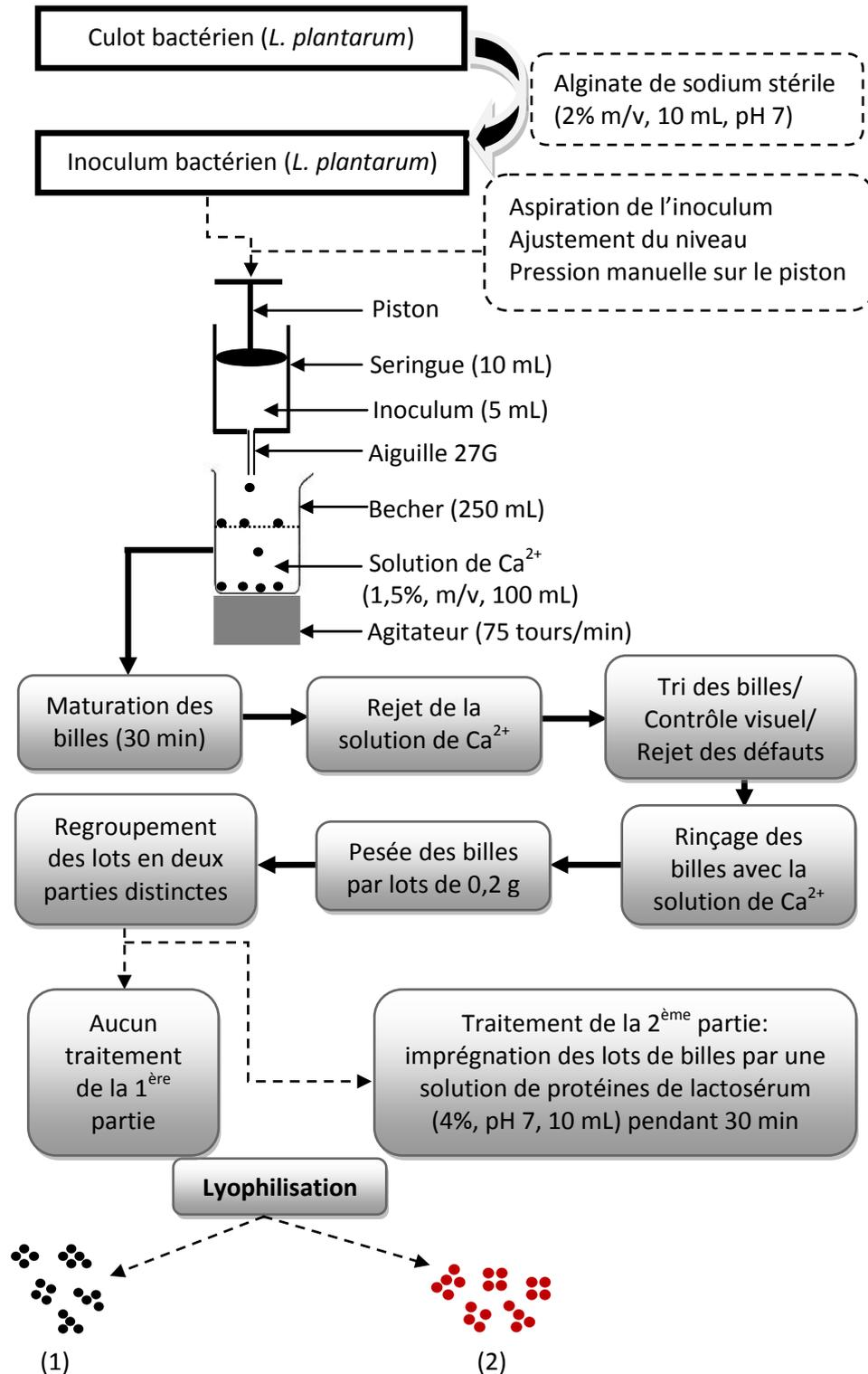


Figure 12. Schéma du procédé d'encapsulation des souches de *L. plantarum*  
 (1) Bactéries encapsulées dans des billes d'alginate non imprégnées  
 (2) Bactéries encapsulées dans des billes d'alginate imprégnées

### 2.4.4. Analyse des billes lyophilisées

Afin de s'assurer que les bactéries ont bien été encapsulées dans les billes lyophilisées, imprégnées et non imprégnées, celles-ci ont été analysées au MEB. Afin d'évaluer l'impact de l'imprégnation sur les billes, celles-ci ont été analysées par spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier (IRTF, Nicolet 380, ThermoElectron<sup>®</sup>, Courtaboeuf, France) en mode ATR (atténuation totale de la réflectance). Cette analyse n'a pas nécessité de préparation préalable de l'échantillon solide. Les billes ont été directement déposées sur le support (cristal de diamant). Un spectre à blanc du cristal de diamant a été réalisé avant l'analyse spectrale des échantillons. Les spectres infra rouges du blanc et des échantillons ont été enregistrés entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  et  $500\text{ cm}^{-1}$ . La moyenne de 32 numérisations, d'une résolution équivalente à  $4\text{ cm}^{-1}$ , a été réalisée sur chaque échantillon.

Le diamant est un minéral composé de carbone qui cristallise dans la maille élémentaire du système cubique à faces centrées. On parle de diamant lorsque tous les atomes qui composent la maille élémentaire sont identiques. Le terme de diamant est particulièrement réservé à tout métal d'une dureté infaillible. Les semi-conducteurs comme le silicium ou le germanium ont des structures de type diamant. La spectroscopie infra rouge permet d'identifier des groupements fonctionnels dans une molécule. La matière, soumise au rayonnement infra rouge, en absorbe une partie variable selon la longueur d'onde et la concentration de l'espèce absorbante.

L'analyse de la lumière transmise en fonction de la longueur d'onde (ou de la fréquence), se traduit par un spectre sur lequel chaque bande, repérée par son nombre d'onde (en  $\text{cm}^{-1}$ ), correspond à un mode de vibration de la molécule. Le spectre infra rouge est spécifique d'une molécule ou d'une structure cristallisée, et peut être considérée comme son empreinte digitale. Dans le cas d'un mélange, les spectres des constituants se combinent. On obtient alors une empreinte digitale du mélange.

### **3. Résultats et Discussion**

#### **3.1. Détermination du pH des différents liquides (liquides artificiels, dispersions aqueuses de biopolymères)**

Les valeurs de pH des différents liquides artificiels ont été mesurées à l'aide d'une électrode de pH en verre, reliée à un enregistreur de données (pH-mètre). Après avoir étalonné le pH-mètre, les trois liquides artificiels (NaCl, MRS, protéose-peptone) ont été acidifiés. Trois valeurs de pH ont été mesurées pour chaque type de liquide (pH 1,3; 1,8 et 3). S'agissant des dispersions aqueuses de biopolymères, huit valeurs de pH ont été mesurées, allant de pH 1 à pH 8.

#### **3.2. Étude de la tolérance à l'acidité des bactéries non encapsulées**

Les populations bactériennes des souches non encapsulées de *L. plantarum* ont été de  $10^9$  UFC/mL au départ (témoins non traités). Cette concentration a été obtenue en introduisant 1 mL de l'inoculum bactérien dans 9 mL de chacun des milieux témoins non traités. Rapporté au volume initial de l'inoculum bactérien (10 mL), des concentrations de l'ordre de  $10^{10}$  UFC/mL ont pu être déduites. La tolérance des bactéries à pH 1,3 a montré une absence de survie bactérienne après une durée d'incubation de 90 secondes, quelle que soit le type de milieu artificiel (résultats non présentés). Cela montre que ce pH a été préjudiciable à la survie des trois souches testées (*L. plantarum* 800, *L. plantarum* CIPA159 et *L. plantarum* 299v).

A cette valeur de pH 1,3, il n'a pas été possible de réaliser une cinétique de la concentration bactérienne en fonction de la durée d'incubation. La tolérance des bactéries à pH 1,8 a aussi été étudiée: elle a montré une absence totale de survie après une durée d'incubation de 30 min, et cela, quelle que soit le milieu artificiel. Cela nous a conduits à réduire la durée d'incubation. Cette dernière a été fixée à 15 min, et des prélèvements ont été réalisés à la 5<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> et 15<sup>ème</sup> min en vue du dénombrement des bactéries. Les concentrations bactériennes obtenues après incubation à pH 1,8 sont données dans le [tableau 10](#).

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

Tableau 10. Tolérance à l'acidité (pH 1,8) des souches non encapsulées de *L. plantarum*.

Concentrations bactériennes résiduelles après incubation à pH 1,8*					
	Témoin	5 min	10 min	15 min	
<i>L. plantarum</i> 800		2,3±1,0	1,0±0,8	0,3±0,5	milieu peptone
	9,2±0,2	2,6±0,3	1,8±0,2	0,4±0,6	milieu NaCl
		3,0±0,3	1,4±0,4	0,6±0,5	milieu MRS
<i>L. plantarum</i> CIPA159		2,7±1,2	1,2±0,8	0,4±0,6	milieu peptone
	9,3±0,1	3,7±0,4	1,8±0,4	1,1±0,1	milieu NaCl
		3,3±0,4	2,3±0,5	1,5±0,4	milieu MRS
<i>L. plantarum</i> 299v		2,6±1,3	1,2±1,2	0,9±0,7	milieu peptone
	9,1±0,1	4,0±0,1	2,3±0,8	1,1±0,2	milieu NaCl
		4,2±0,5	2,5±0,5	1,7±0,4	milieu MRS

\*La tolérance des souches bactériennes a été appréciée par l'évolution de leurs concentrations bactériennes en fonction du temps. Ces concentrations ont été exprimées en  $\log_{10}$  UFC/mL par comparaison avec un témoin non traité. Pour chaque essai indépendant, trois dénombrements sur Boîte de gélose ont été réalisés. Les moyennes  $\pm$  écarts-types de neuf déterminations sont données.

L'analyse du [tableau 10](#) montre que les souches de *L. plantarum* ont été sensibles à l'acidité. Une baisse drastique des concentrations bactériennes a été observée dès la 5<sup>ème</sup> min, comparée à la population témoin. Une perte d'au moins 5  $\log_{10}$  UFC/mL a été observée, en fonction de la souche bactérienne. La nature du milieu artificiel (peptone, NaCl et MRS) n'a pas permis de discriminer les différentes souches, si on tient compte des écarts-types calculés. A titre d'exemple, *L. plantarum* 800 a affiché dès la 5<sup>ème</sup> min d'incubation, des concentrations de 2,3±1,0  $\log_{10}$  UFC/mL en milieu peptone; 2,6±0,3  $\log_{10}$  UFC/mL en milieu NaCl et 3,0±0,3  $\log_{10}$  UFC/mL en milieu MRS.

C'est également le cas avec *L. plantarum* 299v (2,6±1,3  $\log_{10}$  UFC/mL en milieu peptone; 4,0±0,1  $\log_{10}$  UFC/mL en milieu NaCl et 4,2±0,5  $\log_{10}$  UFC/mL en milieu MRS). De la 5<sup>ème</sup> à la 15<sup>ème</sup> min, les concentrations bactériennes ont continué de baisser. A l'analyse de ce tableau, il est bien difficile d'établir un modèle cinétique de décroissance bactérienne. Dans cette étude, la tolérance des bactéries a également été évaluée à pH 3. A cette valeur de pH, la durée d'incubation a été de 120 min. Afin d'effectuer un dénombrement bactérien, des

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

prélèvements ont été réalisés après 30, 60, 90 et 120 min. Les concentrations bactériennes obtenues après incubation à pH 3 sont données dans le [tableau 11](#).

Tableau 11. Tolérance à l'acidité (pH 3) des souches non encapsulées de *L. plantarum*.

Concentrations bactériennes résiduelles après incubation à pH 3*						
	Témoin	30 min	60 min	90 min	120 min	
<i>L. plantarum</i> 800		6,8±0,4	6,4±0,5	6,0±0,3	5,5±0,3	milieu peptone
	9,3±0,2	7,2±0,2	6,5±0,2	5,8±0,3	5,6±0,3	milieu NaCl
		7,7±0,3	6,6±0,3	6,1±0,2	5,6±0,2	milieu MRS
<i>L. plantarum</i> CIPA159		7,8±0,1	7,6±0,4	6,7±0,5	5,9±0,4	milieu peptone
	9,3±0,2	8,0±0,2	7,4±0,4	6,8±0,5	6,0±0,2	milieu NaCl
		8,2±0,2	7,6±0,2	7,1±0,4	6,4±0,2	milieu MRS
<i>L. plantarum</i> 299v		8,1±0,1	7,2±0,2	7,0±0,2	6,6±0,3	milieu peptone
	9,2±0,2	8,2±0,2	7,1±0,2	6,4±0,2	6,4±0,2	milieu NaCl
		8,4±0,3	7,4±0,2	7,1±0,1	6,6±0,3	milieu MRS

\*La tolérance des souches bactériennes a été appréciée par l'évolution de leurs concentrations bactériennes en fonction du temps. Ces concentrations ont été exprimées en  $\log_{10}$  UFC/mL par comparaison avec un témoin non traité. Pour chaque essai indépendant, trois dénombrements sur Boîte de gélose ont été réalisés. Les moyennes  $\pm$  écarts-types de neuf déterminations sont données.

L'analyse du [tableau 11](#) montre que les bactéries ont été dans un état viable, après 120 min d'incubation, à des concentrations bactériennes comprises entre 5 et 7  $\log_{10}$  UFC/mL (en tenant compte des écarts-types). Quel que soit le type de milieu, les trois souches ont quasiment affiché la même tolérance à l'acidité, aux différentes durées d'incubation.

Malgré les limites du dénombrement sur boîte de gélose qui ne donne qu'une vision partielle de l'état physiologique des cellules bactériennes ([Lahtinen et al., 2006](#)), il a été possible d'évaluer la tolérance à l'acidité de *L. plantarum* 800, *L. plantarum* CIPA159 et *L. plantarum* 299v. Toutes les souches ont été rapidement détruites à pH 1,3. Elles l'ont également été à pH 1,8 en moins de 15 min. Elles ont par contre survécu à pH 3 (perte de 2 à 3  $\log_{10}$  UFC/mL en 120 min).

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

L'acidité du milieu a donc été le principal facteur de la baisse des concentrations bactériennes. Des milieux simulant différentes situations de contenu gastrique ont été utilisés, à défaut d'avoir le contenu idéal. Deux aspects ont été pris en compte dans le choix de ces milieux. Le premier aspect a été la nature et la composition des milieux, à savoir un milieu minéral (NaCl), un milieu protéique (protéose-peptone) et un milieu complexe (MRS) contenant des glucides, des protéines, des lipides et des minéraux à des concentrations diverses. Le second aspect a été l'acidité des différents milieux: trois valeurs de pH ont été utilisées pour chacun des milieux. Les effets du milieu dans la prise en compte de la tolérance des bactéries à l'acidité a été un des objectifs atteint lors de cette étude. Les écart-types calculés, reflet de la dispersion des concentrations bactériennes dans un milieu donné, ont montré des écarts parfois significatifs.

Dans le [tableau 10](#), en comparant les écart-types des concentrations bactériennes dans chaque milieu, on a remarqué que les écarts ont été plus élevés avec le milieu peptone. La différence a été moins évidente avec les milieux NaCl et MRS. Dans le [tableau 11](#), il est difficile de relever des différences, y compris avec le milieu peptone. Ces observations n'ont pas permis de rendre une conclusion définitive sur l'avantage d'un milieu par rapport à un autre. Dans un contexte de mise en place d'un protocole standardisé, le NaCl est tout à fait acceptable en tant que milieu standard pour deux raisons. Premièrement, le NaCl à 9 g/L est recommandé par la société américaine de microbiologie dans les études de sensibilité des bactéries aux substances antimicrobiennes (Gerhardt, 1981; Chapin et Lauderdale, 2003). Deuxièmement, la composition d'une solution de NaCl est connue ( $\text{Na}^+ + \text{Cl}^-$ ). L'acidification d'un tel milieu par de l'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ne modifie ni la nature ni la composition des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . Par contre, une augmentation des ions  $\text{Cl}^-$  peut être observée en cas d'acidification par de l'acide chlorhydrique (HCl).

La concentration en ions  $\text{H}^+$  (ou  $\text{H}_3\text{O}^+$ ) d'une solution de NaCl reflète le pH réel de la solution. Avec le milieu protéose-peptone constitué de divers acides aminés, il est possible que des modifications chimiques surviennent en solution acide. Une autre difficulté avec les milieux peptone et MRS est l'impossibilité d'obtenir des produits commerciaux de qualité équivalente. D'un fournisseur à un autre, où avec le même fournisseur, la nature des acides aminés qui entrent dans la composition de la peptone et du MRS peut varier (Vasquez et Murado, 2008). Plus d'une quinzaine de variétés de peptone existent dont les plus importantes sont la polypeptone, la bacto-peptone et la protéose peptone (Vasquez et Murado, 2008).

La comparaison des résultats de cette étude avec ceux d'autres auteurs est délicate. Les souches testées ne sont pas les mêmes. Seul *L. plantarum* 299v a pu faire l'objet de comparaison avec l'étude de [Del Piano et al. \(2006\)](#). Là encore, les pH utilisés ne sont pas identiques. Cette étude a montré une baisse moyenne de  $8 \log_{10}$  UFC/mL à pH 1,8 en 15 min là où [Del Piano et al. \(2006\)](#) ont mis en évidence une baisse de  $8 \log_{10}$  UFC/mL à pH 2 en 30 min. La faible tolérance à l'acidité des bactéries exige que des stratégies soient envisagées pour leur protection. L'utilisation de biopolymères sensibles aux variations de pH peut s'avérer intéressante.

### 3.3. Étude des dispersions aqueuses de biopolymères

#### 3.3.1. Mesure du potentiel zêta

La détermination de la charge électrique des dispersions aqueuses des biopolymères, mesurée par le potentiel zêta à différents pH (pH 1, pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7 et pH 8), est présentée à la [figure 13](#). Les résultats montrent que le potentiel zêta des protéines de lactosérum part des valeurs positives ( $+9,47 \pm 0,24$  mV à pH 1) pour atteindre des valeurs négatives ( $-25,8 \pm 0,42$  mV à pH 8) au fur et à mesure de l'augmentation du pH. De pH 1 à pH 4, le potentiel zêta est positif, avec des valeurs de l'ordre de  $+17,40 \pm 0,28$  mV à pH 2,  $+23,10 \pm 0,14$  mV à pH 3 et  $+0,64 \pm 0,03$  mV à pH 4. Le potentiel zêta prend une valeur négative à pH 5 ( $-5,88 \pm 0,03$  mV) et au-delà. L'observation de la [figure 13](#) montre que le potentiel zêta prend une valeur nulle entre pH 4 et 5, ce qui correspond à la zone où la charge électrique globale de la protéine est égale à zéro. Le point précis de cette zone, appelé point isoélectrique (pHi), n'a pas été déterminé dans cette étude.

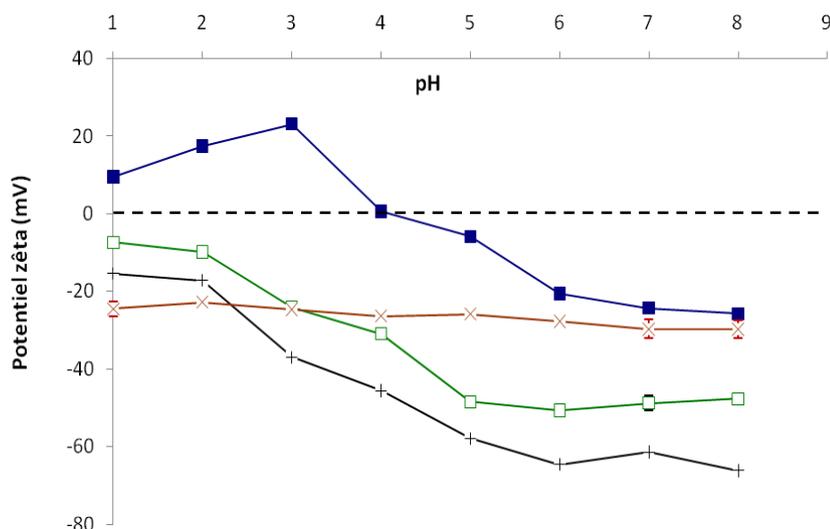


Figure 13. Influence du pH sur le potentiel zêta des dispersions aqueuses de biopolymères. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types de trois expériences indépendantes.

Protéines du lactosérum ■  
 Acide pectique □  
 Alginate de sodium +  
 kappa-Carraghénane ×

La valeur du potentiel zêta des différents polysaccharides a été négative quelle que soit le pH. Le potentiel zêta (en valeur absolue) de l'acide pectique a augmenté au fur et à mesure de l'augmentation du pH, excepté à pH 7 et 8. L'amplitude des charges électriques de l'alginate de sodium a évolué dans le même sens que celle de l'acide pectique. Le kappa-carraghénane a montré des valeurs de potentiel zêta presque constantes. Celles-ci oscillent entre  $-24,50 \pm 1,97$  mV à pH 1 et  $-29,80 \pm 2,23$  mV à pH 8. Au regard de ces résultats, il est évident que le potentiel zêta est influencé par le pH du milieu, sauf pour le kappa-carraghénane. En valeur absolue, un potentiel zêta élevé témoigne de la stabilité de la dispersion. Les particules présentes dans la dispersion ont tendance à se repousser mutuellement. Elles ne peuvent donc s'associer les unes aux autres (Le Roy-Boehm et Fessi, 2000; Narong et James, 2006). Par ailleurs, il est en général admis qu'une valeur de  $\pm 30$  mV soit considérée comme la limite au-dessus de laquelle un potentiel zêta est qualifié d'élevé (Terray, 2000).

Dans cette étude, le potentiel zêta des quatre biopolymères a montré des valeurs significativement différentes de zéro, dépassant parfois le seuil de  $-30$  mV à certains pH. A pH 7 et 8, les valeurs du potentiel zêta ont été toutes négatives et les plus élevées. Dans un

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

contexte de gélification en présence d'ions de charges positives, l'amplitude du potentiel zêta à un pH donné est très importante. En théorie, plus le potentiel zêta est élevé, meilleures seront les interactions avec les composés de charges opposées. D'où l'intérêt d'utiliser les dispersions aqueuses de ces biopolymères à pH 7 ou 8.

### 3.3.2. Mesure de la turbidité (absorbance à 600 nm)

L'absorbance à 600 nm des dispersions aqueuses des quatre biopolymères à différents pH (pH 1, pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7 et pH 8) est donnée à la [figure 14](#). Les résultats de cette figure ont montré que l'absorbance varie avec le pH des dispersions aqueuses, sauf pour le kappa-carraghénane. L'absorbance de l'acide pectique a diminué au fur et à mesure que le pH du milieu a augmenté. L'absorbance de l'alginate de sodium a évolué dans le même sens que celle de l'acide pectique. La dispersion aqueuse de kappa-carraghénane a montré une absorbance constante, à différentes valeurs de pH. L'absorbance a été quasiment nulle ( $< 0,007$ ) pour les protéines de lactosérum à certains pH (pH 1, pH 2, pH 3, pH 6, pH 7, pH 8). Par contre, cette absorbance a été de  $0,132 \pm 0,007$  à pH 4 et de  $0,084 \pm 0,001$  à pH 5.

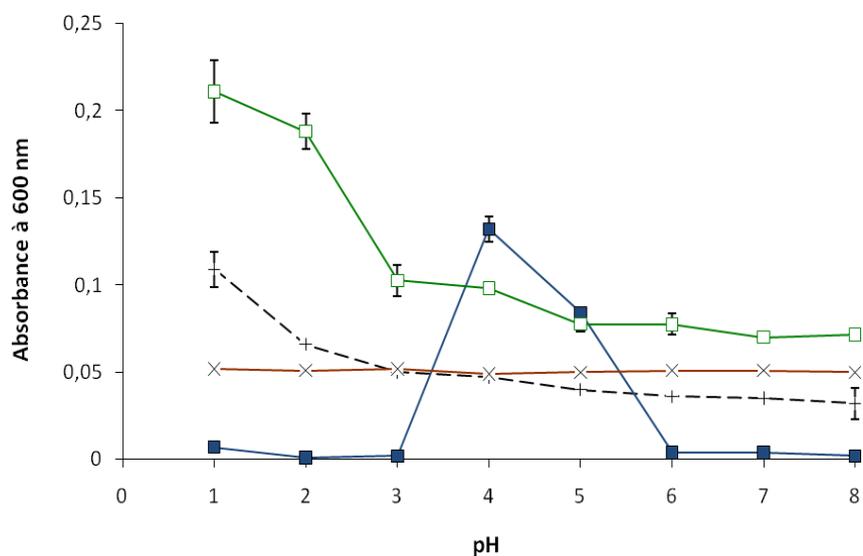


Figure 14. Influence du pH sur l'absorbance des dispersions aqueuses de biopolymères. Les barres d'erreurs représentent les écarts-type de trois expériences indépendantes.

Acide pectique	□
Alginate de sodium	+
kappa-Carraghénane	×
Protéines du lactosérum	■

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

Pour l'ensemble des dispersions aqueuses de cette étude, l'absorbance à 600 nm a été la plus faible à pH 7 et 8. Une absorbance à 600 nm faible témoigne d'une turbidité faible. L'absorbance est proportionnelle à la turbidité, cela a été démontré précédemment. Les dispersions aqueuses à pH 7 et 8 n'ont pas été turbides. Le fait que les protéines de lactosérum aient montré une absorbance élevée à pH 4 et 5 signifie qu'un trouble est présent dans la dispersion aqueuse. La présence d'agrégats dans la dispersion aqueuse peut expliquer ce trouble. Ces agrégats ne peuvent résulter que d'une insolubilisation de la dispersion. Cela suppose que ces particules se sont attirées mutuellement sur la base de leurs charges opposées.

Les résultats du potentiel zêta des protéines de lactosérum ont montré que celles-ci avaient une charge positive à pH 4 et une charge négative à pH 5. On pourrait donc imaginer, comme le souligne Verheul *et al.* (1999), qu'une synergie de forces attractives s'est manifestée aux alentours de ces pH, plus particulièrement à l'approche du point isoélectrique (pHi) de la protéine ( $4 < \text{pHi} < 5$ ). Les auteurs ont parlé de forces d'attraction hydrophobe, électrostatique et de Van der Waals. La valeur de l'absorbance des protéines de lactosérum de cette étude a été plus élevée à pH 4 qu'à pH 5. Bien que la valeur exacte du pHi n'ait pas été déterminée dans cette étude, elle serait égale à 4,7 (Bromley *et al.*, 2005) 4,8 (Harnsilawat *et al.*, 2006) ou 5,2 (Cayot et Lorient, 1998).

### 3.3.3. Mesure de la taille particulaire

La taille particulaire de l'acide pectique n'était nullement reproductible (défaut de lecture à certains pH). La dispersion aqueuse de kappa-carraghénane a montré une taille particulaire constante aux différentes valeurs de pH (tailles comprises entre 310 et 335 nm). Les protéines de lactosérum ont montré une taille de  $295 \pm 40$  nm à pH 4 et  $787 \pm 21$  nm à pH 5, confirmant la présence élevée d'agrégats à pH 4 et 5. Au niveau de l'alginate de sodium, il a été observé une double population de particules à pH 1 et 2. Les principaux résultats sont présentés dans le [tableau 12](#) et à la [figure 15](#).

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

Tableau 12. Evaluation de la taille particulaire de dispersions aqueuses diluées d'alginate de sodium et de protéines de lactosérum<sup>‡</sup>

	Dispersion d'alginate	Dispersion de protéines
pH 1	4220±286 (5%) 556±46 (95%)	58±10 (100%)
pH 2	1560±254 (3%) 207±28 (97%)	47±8 (100%)
pH 3	438±91 (100%)	168±13 (100%)
pH 4	613±53 (100%)	295±40 (100%)
pH 5	648±75 (100%)	787±21 (100%)
pH 6	558±55 (100%)	195±23 (100%)
pH 7	477±56 (100%)	107±10 (100%)
pH 8	425±28 (100%)	101±7 (100%)

<sup>‡</sup> Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±écart-type de trois expériences indépendantes.

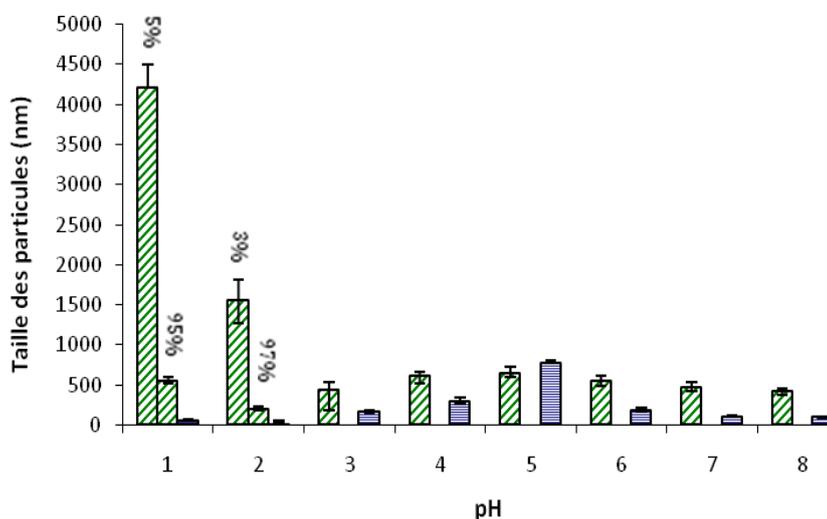


Figure 15. Représentation graphique de la taille particulaire des dispersions aqueuses d'alginate de sodium et de protéines de lactosérum. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types de trois expériences indépendantes.

Alginate de sodium   
Protéine de lactosérum 

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

A l'observation du [tableau 12](#) et de la [figure 15](#), on remarque que le pH a influencé la taille des particules des dispersions aqueuses d'alginate et de protéines de lactosérum. La dispersion d'alginate à pH 1 et 2 montre une faible proportion de particules de diamètre supérieur à 4000 nm à pH 1 (5% des particules) et 1500 nm à pH 2 (3% des particules). En dehors de pH 2 où 97% des particules avaient une taille de l'ordre de  $207 \pm 28$  nm, les plus faibles tailles de particules d'alginate ont été observées à pH 7 et 8. La dispersion aqueuse des protéines de lactosérum n'a pas mis en évidence de double population de particules, quelle que soit la valeur de pH ([tableau 12](#)). En dehors de pH 1 et 2, les plus faibles tailles de particules protéiques ont été constatées à pH 7 et 8.

La taille constitue un paramètre important qui peut affecter la stabilité, la réactivité chimique ou la fluidité des particules en suspension. Des tailles particulières ont été décrites dans la littérature pour certains biopolymères. La bêta-lactoglobuline (protéine majoritaire du lactosérum) a montré une taille particulière comprise entre 200 et 500 nm à pH 4 et 5 en milieu aqueux tamponné ([Harnsilawat et al., 2006](#)). Plus la taille d'une particule en suspension aqueuse est petite, meilleure est sa solubilité au sein de cette suspension ([Sohnel et Garside, 1992](#)). Lorsque les particules sont de petites tailles, les forces responsables de leur dispersion au sein de la suspension l'emportent sur celles de la gravitation, ce qui maintient la suspension homogène. Dans le cas des mélanges de suspension, des agrégats peuvent se former, et rendre la suspension non homogène. Dans cette étude, les pH 7 et 8 ont permis d'obtenir des suspensions homogènes. Le pH 7 a été utilisé pour la suite des travaux car, c'est à ce pH que les bactéries non encapsulées ont été cultivées (bouillon MRS, phases de préculture et de culture).

Les informations issues de l'étude des dispersions aqueuses de chaque biopolymère ont montré que le pH influence le potentiel zêta, la turbidité et la taille particulière de ces dispersions. L'objectif d'une telle étude visait à rechercher les conditions optimales de l'encapsulation. Les dispersions aqueuses où la taille particulière et la turbidité ont été les plus faibles sont celles qui ont été retenues, afin de disposer de suspensions homogènes. Les dispersions aqueuses où le potentiel zêta a été le plus élevé en valeur absolue, sont celles qui ont également été retenues, afin de disposer de suspensions très chargées.

### 3.4. Élaboration, analyse et optimisation des billes

#### 3.4.1. Élaboration et analyse des billes

Différentes formes de billes (cubique, sphérique, ovale etc) ont été obtenues à différentes concentrations. Les images macroscopiques de l'ensemble de ces billes sont données à la figure 16.

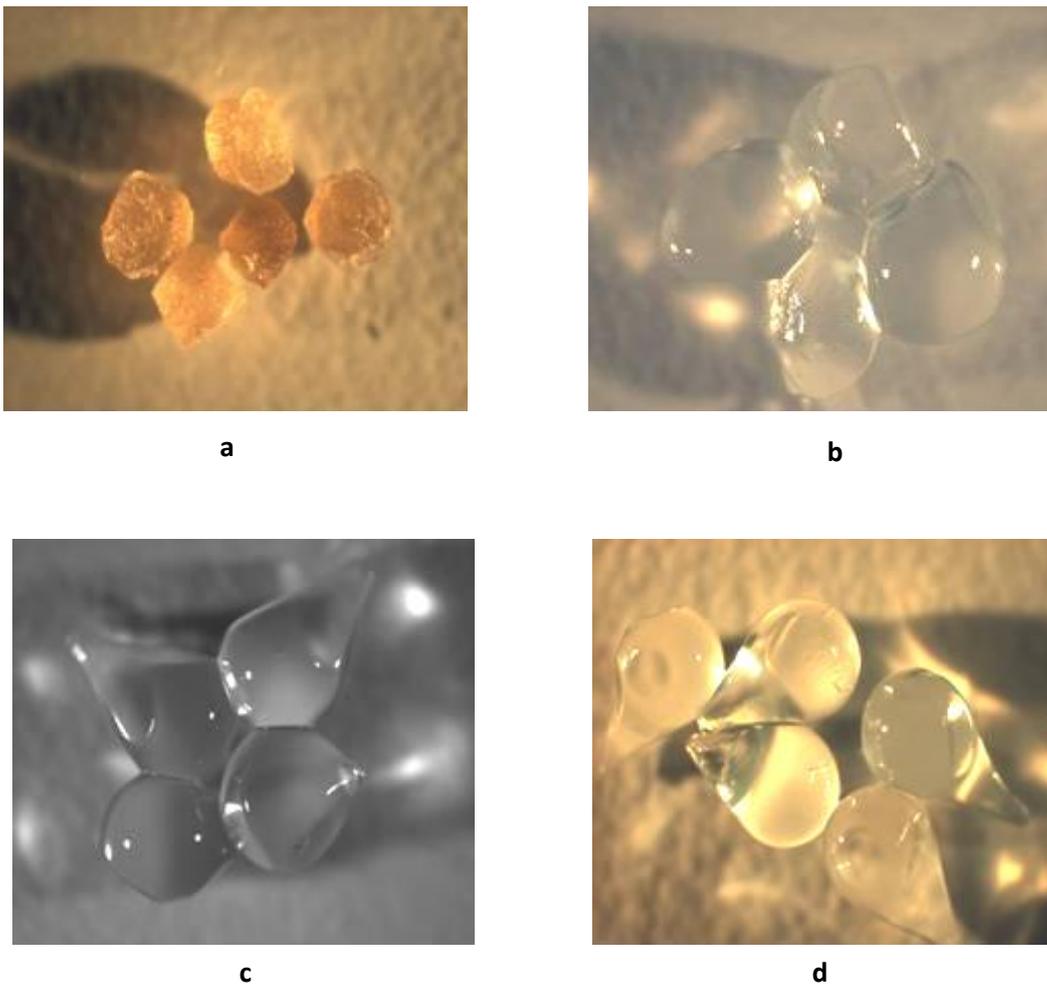


Figure 16. Images macroscopiques de billes fraîchement élaborées (grossissement  $G \times 0,8$ )

- (a) Billes d'acide pectique à 4% (m/v)
- (b) Billes de kappa-carraghénane à 3% (m/v)
- (c) Billes d'alginate de sodium à 2% (m/v)
- (d) Billes d'alginate de sodium à 2% (m/v) imprégnées par des protéines de lactosérum à 4% (m/v)

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

Des billes ont été obtenues avec le kappa-carraghénane à 3% (m/v). Aux concentrations de 1% et 2% (m/v), le kappa-carraghénane n'a pas donné de billes. Au delà de 3% (m/v), la dissolution du kappa-carraghénane a été quasiment impossible. L'acide pectique à 4% (m/v) a donné des billes. La suspension d'acide pectique à 6% (m/v) est restée insoluble. Cette insolubilité a interféré sur son écoulement, ce qui s'est traduit par une obstruction de la seringue. L'alginate de sodium a donné des billes quelle que soit sa concentration (1, 2 et 3%, m/v). A l'opposé, les protéines de lactosérum n'ont pas donné de billes quelles que soient les concentrations utilisées (5%, 10% et 15%, m/v).

Les billes à l'état frais ont été de manipulation peu aisée. La conservation des billes a été délicate. Une exposition des billes à l'air libre, à la température du laboratoire (25 °C) pendant 8 h, a permis d'observer une réduction de leur taille et de leur volume. Ce phénomène est connu sous le nom de synérèse (expulsion d'une partie du contenu liquide d'un composé gélifié). Pour une meilleure conservation des billes, nous avons dû recourir à la lyophilisation. Durant le processus de lyophilisation, il a été observé une désorganisation des billes de kappa-carraghénane. Celles-ci n'ont pas conservé leur morphologie. En lieu et place des billes, une poudre fine a été obtenue. La pression de 0,2 mbar utilisée au cours du processus de dessiccation primaire a sans doute désorganisé la structure des billes de kappa-carraghénane. Les billes lyophilisées d'alginate de sodium et d'acide pectique ont conservé leur morphologie (figure 17).

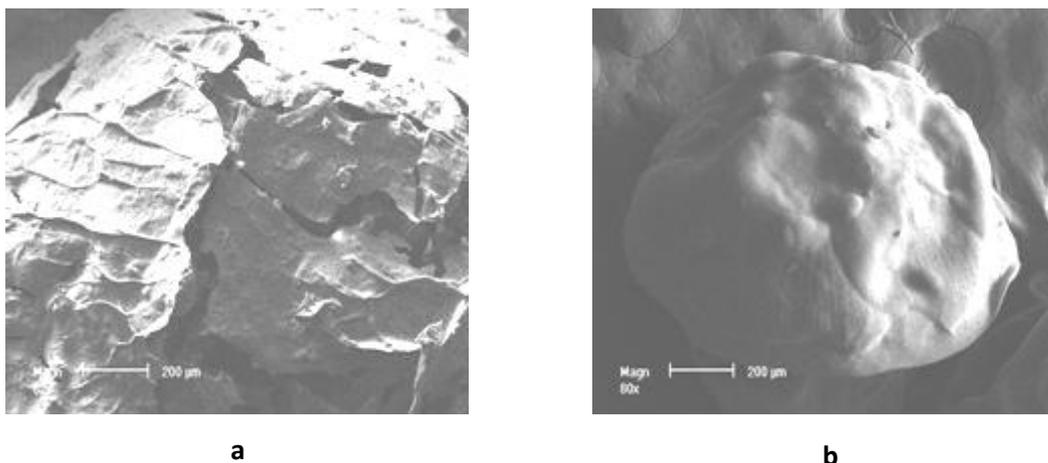


Figure 17. Images de microscopie électronique à balayage (MEB) de billes lyophilisées (grossissement G×82, échelle = 200 µm)

(a) Bille d'acide pectique

(b) Bille d'alginate de sodium

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

La bille lyophilisée d'acide pectique présente de nombreuses fissures et fractures à de multiples endroits, rendant problématique son utilisation dans les essais d'encapsulation. Par contre, la bille lyophilisée d'alginate de sodium montre une surface lisse, sans fissure apparente ni fracture. Cette observation nous a permis d'opérer un choix, celui de ne retenir que les billes d'alginate pour l'encapsulation des bactéries.

### 3.4.2. Optimisation des propriétés des billes

Les protéines de lactosérum ont été utilisées comme solution d'imprégnation. Pour cela, leur stabilité en milieu artificiel simulant des conditions gastro-intestinales a été étudiée. Différentes enzymes et sels biliaires ont été ajoutés afin de simuler un milieu gastrique et un milieu intestinal. La figure 18 présente les résultats de l'étude de stabilité en milieu acide artificiel. L'analyse de cette figure montre que les protéines de lactosérum sont constituées de trois types de protéines (A et A'). La première, moins importante, se situe aux alentours de 75 KDa. La seconde, majoritaire, se situe vers 15 KDa, et la troisième entre 10 et 15 KDa.

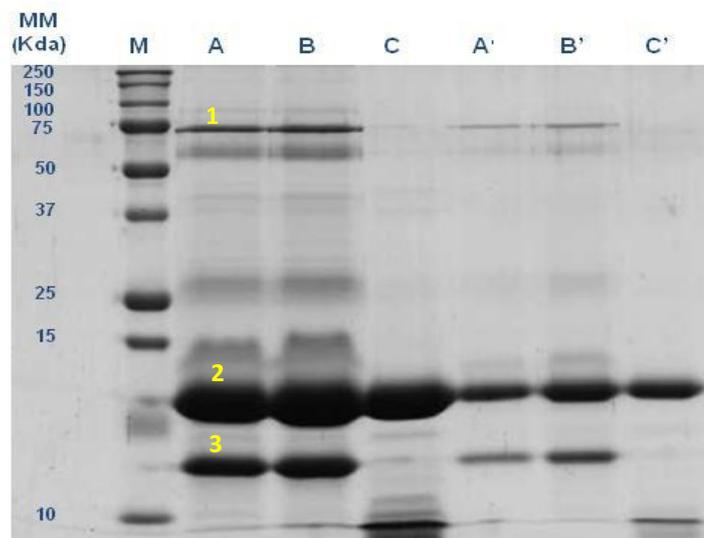


Figure 18. Profil électrophorétique (SDS-PAGE) d'un échantillon de protéines de lactosérum incubé pendant 4 h dans un liquide acide artificiel.

Volume d'échantillon déposé : 20  $\mu$ L

**MM**: Masse moléculaire **M**: Marqueur de référence

**A**: solution témoin de protéine de lactosérum à pH 7

**B**: solution de protéine de lactosérum à pH 1,8

**C**: solution de protéine de lactosérum à pH 1,8 + pepsine (3 g/L)

**A'-B'-C'**: solutions diluées au 1/10 des solutions A-B-C.

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

L'incubation des protéines de lactosérum pendant 4 h, dans un liquide acide artificiel à pH 1,8 (B et B'), a montré une absence de dégradation des trois types de protéines. Par contre, la présence de pepsine (C et C') a hydrolysé la protéine de masse moléculaire de l'ordre de 75 KDa et celle de masse moléculaire comprise entre 10 et 15 KDa. Les protéines de lactosérum ont donc montré une résistance à l'acidité à pH 1,8. En présence de pepsine et en milieu acide, seule la protéine majoritaire ( $\approx 15$  KDa) a résisté à l'hydrolyse. L'identification des différentes protéines composant le lactosérum, par comparaison aux données de la littérature (Cayot et Lorient, 1998; Perez et al., 2009), a permis d'affirmer que la protéine de masse moléculaire autour de 75 KDa est l'albumine sérique bovine, celle se situant vers 15 KDa est la bêta-lactoglobuline, et la troisième entre 10 et 15 KDa est l'alpha-lactalbumine. La bêta-lactoglobuline a donc été utilisée pour la suite des manipulations. L'analyse d'un échantillon de bêta-lactoglobuline, délivré par le même fournisseur (Davisco®), est présentée à la figure 19. L'analyse a porté sur la pureté, mais également sur la stabilité en présence d'enzymes et de sels biliaries.

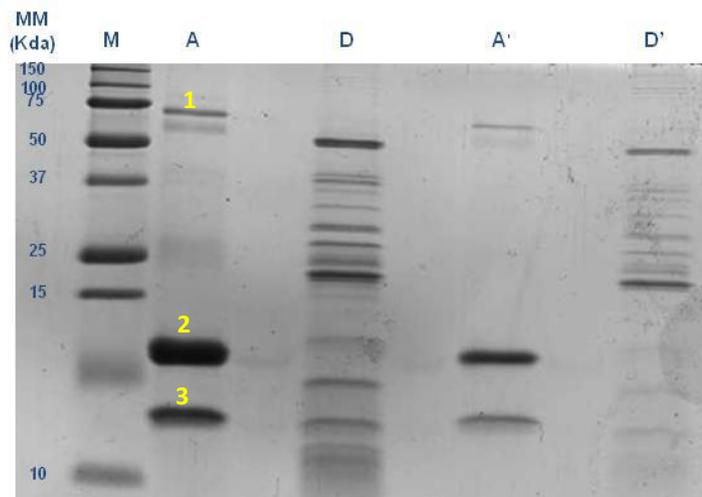


Figure 19. Profil électrophorétique (SDS-PAGE) d'un échantillon de bêta-lactoglobuline incubé pendant 4 h en présence d'enzymes et de sels biliaries. Volume d'échantillon déposé : 10  $\mu$ L  
**MM**: Masse moléculaire **M**: Marqueur de référence  
**A**: solution témoin de bêta-lactoglobuline à pH 7  
**D**: solution de bêta-lactoglobuline à pH 7 en présence de pancréatine (10 g/L), de trypsine (10 g/L) et de sels biliaries (3 g/L)  
**A' et D'**: solutions diluées au 1/10 des solutions A-D.

La figure 19 montre bien que l'échantillon de bêta-lactoglobuline (A-A') n'est pas pur. Elle montre par ailleurs que cet échantillon, à l'instar des protéines de lactosérum, contient l'albumine sérique bovine et l'alpha-lactalbumine. Elle montre enfin que les différentes

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

protéines qui composent l'échantillon ont été hydrolysées en des composés peptidiques de masses moléculaires plus faibles (D-D'). En présence d'enzymes et de sels biliaires dans un milieu intestinal, on peut s'attendre à une hydrolyse de la bêta-lactoglobuline ou des protéines de lactosérum. La capacité des protéines de lactosérum à être stable dans des conditions gastriques, et à être hydrolysée dans des conditions intestinales, a été mise à profit dans le cadre de ce travail de thèse. Les résultats de cette étude corroborent ceux des études antérieures (Kitabatake *et al.*, 1998; Uhrinova, 2000; Li *et al.*, 2004). Nous avons pu démontrer que les protéines de lactosérum ne résistent pas aux conditions intestinales *in vitro*.

### 3.4.3. Encapsulation des souches de *L. plantarum*

Les trois souches de *L. plantarum* ont été encapsulées dans des billes d'alginate dont certaines ont été imprégnées par immersion dans une solution de protéines de lactosérum (4%, m/v, pH 7). Le MEB a permis d'apprécier la morphologie des billes (taille, forme). La forme des billes est de type sphérique ou ovale. Le diamètre moyen des billes d'alginate non imprégnées est de l'ordre de  $1,77 \pm 0,11$  mm; celui des billes d'alginate imprégnées avoisine  $1,85 \pm 0,17$  mm. Les images fournies par le MEB sont présentées à la [figure 20](#).

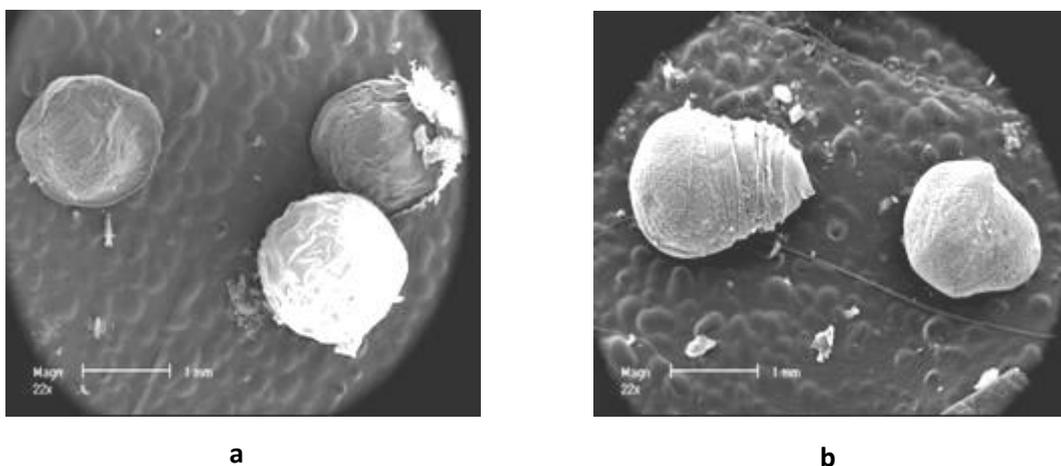


Figure 20. Morphologie des billes d'alginate (grossissement G×22, échelle = 1 mm)  
(a) Billes d'alginate non imprégnées  
(b) Billes d'alginate imprégnées par des protéines de lactosérum.

La littérature scientifique décrit différentes tailles de billes formulées à partir de biopolymères par le procédé d'extrusion/gélification. Un diamètre de 3 mm a été observé avec des billes de kappa-carraghénane (Audet *et al.*, 1991)). Un diamètre de 5 mm a été observé

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

avec des billes hybrides alginate/amidon (Jankowski *et al.*, 1997). Des diamètres moyens de 2,5 mm (Prevost *et al.*, 1985) et 2,6 mm (Prevost et Divies, 1987) ont été observés avec des billes d'alginate. Un diamètre moyen de 2 mm a été observé avec des billes hybrides alginate/chitosan (Zhou *et al.*, 1998). Des billes de diamètre compris entre 1 et 2 mm ont été obtenus dans plusieurs études (Sodini *et al.*, 1998; Lamboley *et al.*, 2001; Doleyres *et al.*, 2004; Hebrard *et al.*, 2006). Dans la figure 21 qui présente une vue interne des billes, on observe que *L. plantarum* y est immobilisée. On remarque par ailleurs une modification de la texture, en fonction du type de billes: billes d'alginate non imprégnées (c-d) et billes d'alginate imprégnées (e-f).

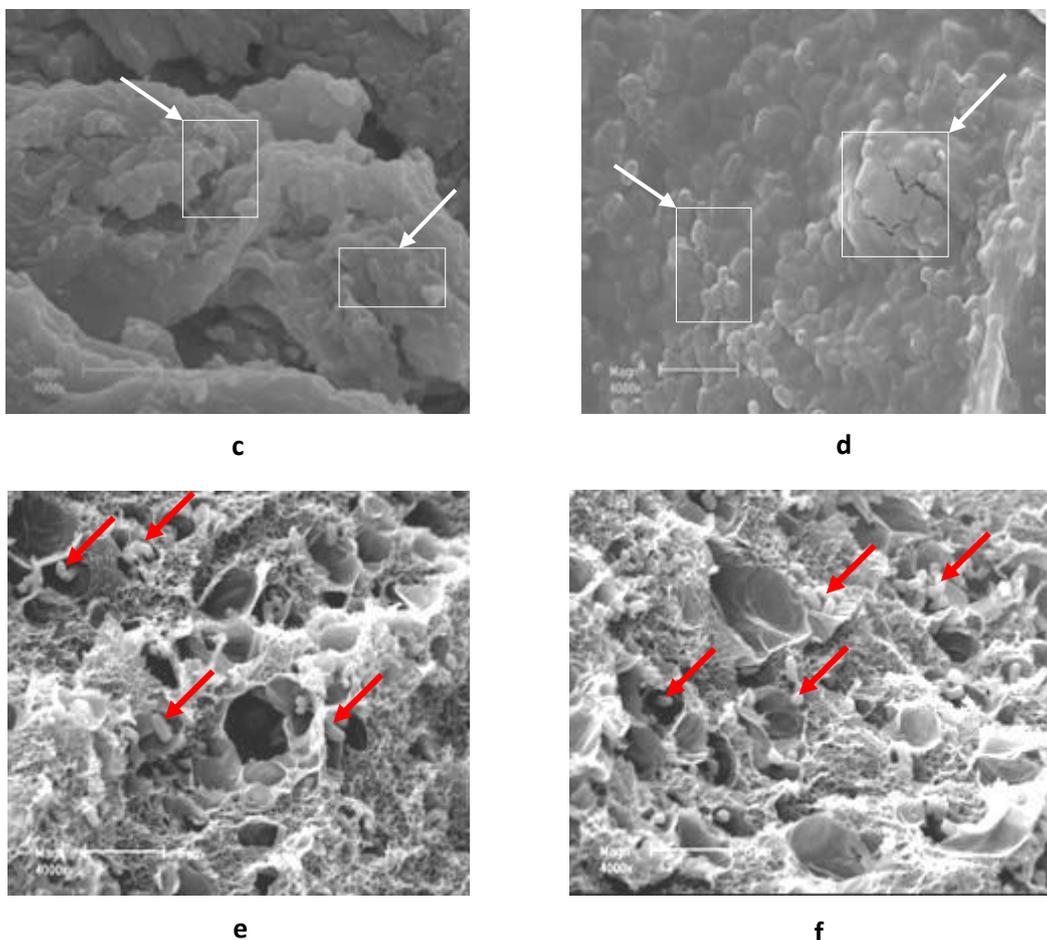


Figure 21. Vue interne des billes d'alginate (grossissement G×4000, échelle = 5 μm)  
(c-d) Billes d'alginate non imprégnées  
(e-f) Billes d'alginate imprégnées

L'intérieur des billes d'alginate non imprégnées montre un aspect opaque et condensé (c-d). Les bactéries y sont agglutinées sans réelles possibilités de mouvement. Par contre, l'intérieur des billes d'alginate imprégnées (e-f) montre un réseau d'aspect poreux. Les

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

bactéries y sont réparties de façon aléatoire. Cette différence de texture montre bien que les protéines de lactosérum (4%, m/v, pH 7) ont pénétré à l'intérieur des billes d'alginate en modifiant leur texture initiale. Des interactions physicochimiques se sont produites au cours du processus d'imprégnation. Une concentration plus élevée en protéines de lactosérum (8%, m/v, pH 7) n'a pas modifié la texture observée sur cette image.

La surface externe des billes (figure 22) montre des bactéries accrochées en surface, d'où l'intérêt de procéder au rinçage des billes après leur élaboration. La surface externe de la bille d'alginate non imprégnée a un aspect de "voile" avec des débris filamenteux (g). La surface de la bille d'alginate imprégnée présente des débris liés pour l'essentiel aux propriétés moussantes des protéines de lactosérum (h).

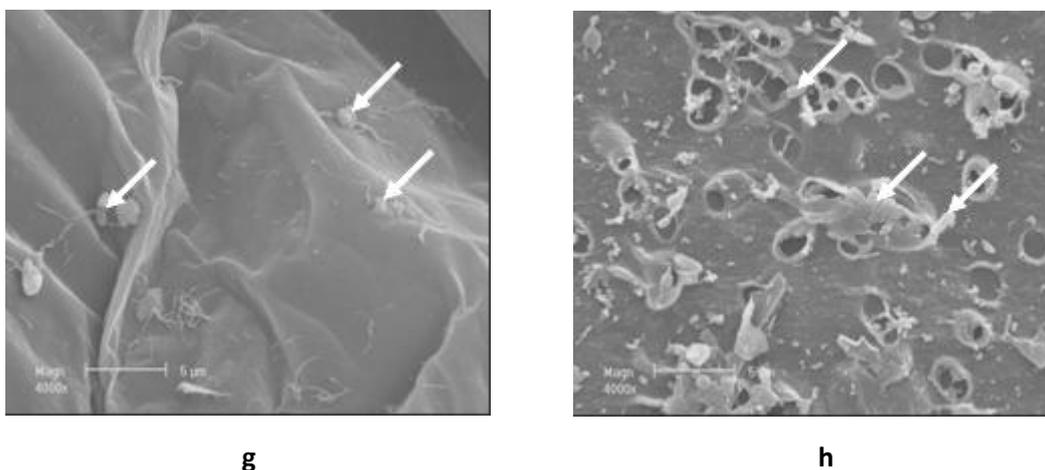


Figure 22. Vue externe des billes d'alginate (grossissement G×4000, échelle = 5 µm)  
(g) Billes d'alginate non imprégnées  
(h) Billes d'alginate imprégnées

La texture prise par les billes imprégnées et non imprégnées montre que la solution de protéines de lactosérum a pénétré à l'intérieur des billes d'alginate. Au cours de cette pénétration, des interactions entre les protéines de lactosérum et les billes d'alginate se sont produites. Des modifications de texture ont été observées, au regard des différentes images du MEB (figs. 21 et 22). Pour tenter d'expliquer cette modification, on pourrait passer en revue le processus d'élaboration de ces billes.

L'alginate de sodium est un polysaccharide de charge négative. Ces charges négatives sont liées aux groupements -COOH des monomères G et M de la macromolécule. Ces

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

monomères sont pour la plupart sous la forme  $\text{-COO}^-$  à  $\text{pH} > 4$  (Draget, 2000). Les ions  $\text{Na}^+$  sont également présents dans la suspension d'alginate de sodium pour l'équilibre des charges. La suspension d'alginate de sodium utilisée dans cette étude avait un  $\text{pH}$  de 7, ce qui signifie que les monomères G et M étaient en majorité sous la forme  $\text{-COO}^-$ . Les gouttes d'alginate de sodium au contact de la solution de  $\text{Ca}^{2+}$  ont gélifié, suite à la pénétration des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , de la surface des billes vers le centre, neutralisant au passage les ions  $\text{-COO}^-$  (Kim, 1990).

L'avantage des ions  $\text{Ca}^{2+}$  est leur double charge, contrairement aux ions  $\text{Na}^+$ . Cette double charge établit deux ponts ioniques avec les ions  $\text{-COO}^-$ : un pont avec le monomère G de l'alginate, et un autre avec le monomère M. L'établissement des deux ponts ioniques aboutit à un réseau tridimensionnel formé par cet assemblage. Ce réseau est celui que nous avons obtenu avec les billes d'alginate non imprégnées (figs. 21-c-d et 22-g). Vu que les gouttes d'alginate de sodium ont été immergées dans 100 mL de solution de  $\text{Ca}^{2+}$ , on peut s'attendre à ce que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  soient en excès dans les billes d'alginate formées à l'issue de la gélification. En immergeant par la suite les billes d'alginate de  $\text{Ca}^{2+}$  dans une solution de protéines de lactosérum chargée négativement ( $\text{pH}$  7), on peut imaginer qu'il s'est produit un déplacement de l'équilibre dans le réseau tridimensionnel.

Les protéines sont constituées de divers acides aminés ayant deux groupements ionisables ( $\text{COOH}$  et  $\text{NH}_2$ ). En fonction du  $\text{pH}$ , les protéines de lactosérum sont soit sous la forme  $\text{-COO}^-$  soit sous la forme  $\text{NH}_4^+$ . A  $\text{pH}$  7, les protéines de lactosérum étaient majoritairement sous la forme  $\text{-COO}^-$ . Les ions  $\text{-COO}^-$  ont donc interagit avec le  $\text{Ca}^{2+}$  en excès contenu dans les billes d'alginate, et ont probablement déplacé les précédentes liaisons du  $\text{Ca}^{2+}$  avec les ions  $\text{-COO}^-$  des monomères G et M de l'alginate. La texture des billes d'alginate imprégnées par les protéines de lactosérum (figs. 21-e-f et 22-h) est donc le résultat d'interactions électrostatiques. En plus de la microscopie électronique à balayage, la spectroscopie d'absorption infra rouge à transformée de Fourier (IRTF) en mode ATR (atténuation totale de la reflectance) a été utilisée, afin de détecter d'éventuelles interactions des groupements fonctionnels des molécules en présence. L'analyse par IRTF a été réalisée à la surface des billes lyophilisées, imprégnées et non imprégnées. Les spectres IRTF-ATR des différentes billes sont représentés à la figure 23.

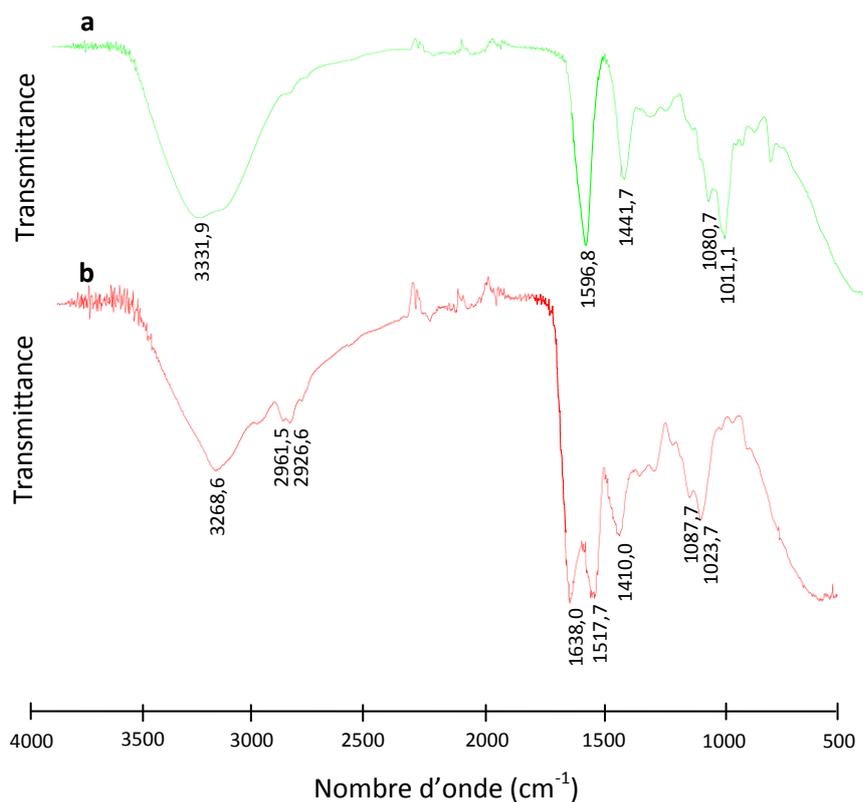


Figure 23. Spectres IRTF-ATR des billes d'alginate de calcium lyophilisées  
 (a) Billes d'alginate non imprégnées  
 (b) Billes d'alginate imprégnées

Dans la figure 23a qui correspond au spectre infra rouge des billes d'alginate non imprégnées, il a été observé plusieurs bandes caractéristiques. La bande large à  $3331,9 \text{ cm}^{-1}$  est due à la vibration d'élongation du groupement -OH. Les deux bandes à  $1596,8 \text{ cm}^{-1}$  et  $1441,7 \text{ cm}^{-1}$  sont spécifiques des vibrations d'élongation du groupement -COO, l'une est la vibration d'élongation asymétrique ( $1596,8 \text{ cm}^{-1}$ ), l'autre est la vibration d'élongation symétrique ( $1441,7 \text{ cm}^{-1}$ ). Les bandes à  $1080,7 \text{ cm}^{-1}$  et  $1011,1 \text{ cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations d'élongation -C-O des acides uroniques G et M. Les groupements fonctionnels correspondant à ces différentes bandes ont été confirmés par la récente étude de Papageorgiou *et al.* (2010) dans laquelle les auteurs ont analysé par IRTF l'acide alginique dans sa forme complexée à divers cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$ ). Les bandes à  $1596,8 \text{ cm}^{-1}$  et  $1441,7 \text{ cm}^{-1}$  sont celles qui caractérisent au mieux l'alginate de calcium (Dong *et al.*, 2006; Thanos *et al.*, 2006). La région aux alentours de ces deux bandes marque donc l'empreinte digitale de l'alginate de calcium.

Dans la figure 23b qui correspond au spectre infra rouge des billes d'alginate imprégnées par les protéines de lactosérum, plusieurs bandes caractéristiques ont été

## Chapitre 2 : Encapsulation des probiotiques

observées. La bande à  $3268,6 \text{ cm}^{-1}$  correspond aux vibrations d'élongation  $-\text{OH}$  liées à  $-\text{NH}$ . Les bandes à  $2961,5 \text{ cm}^{-1}$  et  $2926,6 \text{ cm}^{-1}$  correspondent aux groupements  $-\text{CH}_2$  des protéines de lactosérum. La bande à  $1638,0 \text{ cm}^{-1}$  est une bande caractéristique du groupement amide primaire ( $-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) des protéines de lactosérum. Par contre, les bandes à  $1517,7 \text{ cm}^{-1}$  et  $1410,0 \text{ cm}^{-1}$  correspondent aux groupements  $-\text{COO}$  de l'alginate de calcium.

Il faut noter que les valeurs du nombre d'onde de l'alginate de calcium ont baissé, par comparaison aux valeurs précédentes ( $1596,8 \text{ cm}^{-1}$  et  $1441,7 \text{ cm}^{-1}$ ). La baisse des nombres d'ondes des groupements fonctionnels  $-\text{COO}$  de l'alginate de calcium est liée à la présence de nouvelles liaisons électrostatiques (Dong *et al.*, 2006). C'est de la même façon qu'en général, une baisse des nombres d'ondes des vibrations  $-\text{OH}$  et  $-\text{NH}$  témoigne d'une augmentation des liaisons hydrogènes. La baisse du nombre d'onde de la vibration  $-\text{OH}$  de l'alginate de calcium (passage de  $3331,9 \text{ cm}^{-1}$  à  $3268,6 \text{ cm}^{-1}$ ) est un signe de l'établissement de liaisons hydrogènes supplémentaires. Les autres bandes aux alentours de  $1000 \text{ cm}^{-1}$  correspondent aux groupements  $-\text{C}-\text{O}$ ,  $-\text{C}-\text{C}$  et  $-\text{C}-\text{OH}$ . Ces groupements sont à la fois retrouvés dans les protéines de lactosérum et dans l'alginate de calcium (Thanos *et al.*, 2006). L'étude par IRTF-ATR des billes lyophilisées, imprégnées et non imprégnées, a permis de mettre en évidence des interactions moléculaires entre l'alginate de calcium et les protéines de lactosérum.

La calorimétrie par titration isotherme (ITC) a été envisagée, afin de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre les billes d'alginate de Calcium et les protéines de lactosérum. En réalité, cette technique est très souvent réalisée en milieu liquide. L'un des liquides (liquide à titrer) se trouve dans la cellule de mesure du calorimètre. Le liquide à titrer est progressivement saturé par le second liquide (liquide titrant) qui est injecté par fraction dans la cellule de mesure (Tellinghuisen, 2008; Wilcox, 2008). La technique permet de mettre en évidence des interactions entre molécules par détermination de la constante d'affinité. La configuration du calorimètre a été adaptée pour la titration des billes d'alginate de Calcium. Celles-ci ont été progressivement saturées par la solution de protéines de lactosérum, mais aucun signal n'a été obtenu.

Des études récentes ont fait mention d'une hypothèse permettant d'expliquer les interactions entre les protéines et les polysaccharides au niveau interfacial (Baeza *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2009). Les auteurs ont proposé un mécanisme en 3 étapes pour soutenir cette hypothèse:

*étape 1: diffusion de la protéine de la phase aqueuse vers l'interface,*

*étape 2: pénétration, adsorption compétitive et dépliement des protéines à l'interface,*

*étape 3: Agrégation, réarrangement et gélification à l'intérieur de la couche interfaciale.*

Le mécanisme proposé donne un début de réponse aux images de MEB des billes imprégnées et non imprégnées de notre étude. L'étape 1 est vérifiée: si les billes d'alginate ont changé de texture, c'est bien parce que leur interface a été au contact des protéines de lactosérum qui y ont diffusé. L'étape 2 est confirmée: la nouvelle texture des billes imprégnées résulte d'une pénétration de la protéine à l'intérieur des couches interfaciales, certainement par adsorption compétitive. Un dépliement des protéines est envisageable en ce sens que ce dépliement expose l'ensemble des motifs structuraux de la protéine, ce qui la prédispose à interagir avec d'autres groupements fonctionnels.

Dans l'étape 3, seul le réarrangement à l'intérieur de la couche interfaciale peut expliquer la texture définitive prise par les billes imprégnées. Toutefois, des agrégats ont pu se former au cours de la pénétration de la solution de protéines de lactosérum. La gélification à l'intérieur des couches demeure possible, bien que les billes d'alginate soient déjà le résultat d'un processus de gélification de la suspension d'alginate dans une solution de calcium. Dans tous les cas, les interactions protéines-polysaccharides font intervenir plusieurs paramètres, et selon Weinbreck *et al.*, (2004) et de Kruif (2004), la charge électrique, la masse moléculaire, la concentration et la nature chimique du biopolymère sont des paramètres dont il faut tenir compte.

### 4. Conclusion

Dans cette étude, l'extrusion suivie de gélification dans une solution de  $\text{Ca}^{2+}$  a permis de mettre au point des billes à base de biopolymères. L'examen des images de microscopie électronique à balayage a montré que les billes d'alginate offraient les meilleures garanties sur le plan morphologique (absence de fracture, surface homogène). Les billes d'alginate ont donc été celles autour desquelles une imprégnation a été réalisée, grâce aux protéines de lactosérum. Ces dernières ont montré des capacités de résistance en milieu acide, attestées par les résultats de l'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Les billes d'alginate imprégnées et non imprégnées ont servi à l'encapsulation de probiotiques. L'examen microscopique de coupes transversales de ces billes, a montré des bactéries immobilisées au sein des différentes matrices. Ces dernières avaient notamment une texture différente selon le type de billes. Le désir d'encapsuler des probiotiques répondait au souci de les protéger d'un environnement hostile, à l'image de celui rencontré dans le tractus gastro-intestinal. Trois types de liquides aqueux (NaCl, MRS, peptone) simulant des conditions d'acidité gastrique ont été utilisés.

Quel que soit le type de liquide, les souches de *L. plantarum* ont montré une sensibilité à l'acidité, aux valeurs de pH utilisées (1,3; 1,8 et 3). Cette sensibilité à l'acidité a été préjudiciable à la survie des souches non encapsulées, au regard de la baisse des concentrations bactériennes observées. C'est la raison pour laquelle une méthode d'encapsulation a été proposée, et qui a abouti à l'élaboration de billes qui ont permis d'encapsuler chacune des trois souches de probiotiques.

Cette partie du travail de thèse a contribué à la connaissance de la morphologie et de la microstructure des billes. Ce travail tire son originalité de ce qu'aucune publication ne fait mention de l'imprégnation des billes d'alginate par des protéines de lactosérum, en dehors de la nôtre (Gbassi *et al.*, 2009). Cette thèse apporte donc un complément de connaissance sur ces billes, particulièrement intéressante pour des applications dans le domaine de la bioencapsulation. L'évaluation de la protection conférée par ces billes sera traitée au chapitre suivant.

**CHAPÎTRE 3:**  
**DÉSENCAPSULATION ET**  
**DEVENIR DES PROBIOTIQUES**

### 1. Introduction

Les probiotiques sont le plus souvent incorporés dans des aliments, à des concentrations variables. Le niveau de concentration dépend du type de probiotique et de la nature de l'aliment. Des concentrations minimales ont été admises dans certains aliments, mais des variations subsistent d'un pays à un autre. Un minimum de  $10^6$  UFC/g a été fixé pour les bifidobactéries dans les produits laitiers fermentés, par l'ensemble des pays du MERCOSUR (marché commun de libre échange sud-américain comprenant le Brésil, l'Argentine, l'Uruguay, le Paraguay, la Bolivie et le Chili) (Pagano, 1998).

Au Japon, l'association "Fermented Milks and Lactic Acid Bacteria" a recommandé un minimum de  $10^7$  UFC/g dans les produits laitiers frais (Stanton *et al.*, 2001). Au niveau européen, la réglementation a fixé des concentrations minimales de  $10^9$  UFC/g pour certains microorganismes utilisés en tant qu'additif alimentaire (JOUE, 2004). C'est le cas par exemple de *S. cerevisiae* NCYC 47 ( $5.10^9$  UFC/g) ou de *L. rhamnosus* DSMZ 7133 ( $3.10^9$  UFC/g). Ces microorganismes, après absorption orale, doivent pouvoir atteindre la lumière intestinale et y survivre (Stanton *et al.*, 2001). Toutefois, le tube digestif humain, qui est le siège d'intenses activités biologiques et mécaniques, présente des zones défavorables à la survie de ces microorganismes, notamment la zone de l'estomac à cause de son contenu acide (Del Piano *et al.*, 2006, 2008). Des protocoles expérimentaux ont simulé les conditions pouvant régner dans cette zone, mais une grande variabilité inter-protocole subsiste (Minekus *et al.*, 1995; Sultana *et al.*, 2000; Mainville *et al.*, 2005).

La tolérance à l'acidité fait partie des tests *in vitro* censés fournir des informations utiles sur les potentialités des probiotiques (FAO/WHO, 2002; FSA, 2005). La zone de l'intestin grêle est aussi considérée comme une zone défavorable à cause de la bile qui y est présente. La tolérance à la bile fait également partie des tests *in vitro* (FAO/WHO, 2002; FSA, 2005). Récemment a été proposée la tolérance aux enzymes pancréatiques (Del Piano *et al.*, 2008). Dans ce travail, nous présentons plusieurs résultats concernant le devenir des bactéries encapsulées, après une incubation préalable de ces bactéries dans des conditions simulant le tractus gastro-intestinal et diverses matrices alimentaires.

## **2. Matériel et Méthodes**

### **2.1. Détermination des concentrations résiduelles des bactéries après incubation des billes imprégnées et non imprégnées dans différents liquides acides artificiels**

#### **2.1.1. Choix des liquides acides artificiels**

Les liquides artificiels utilisés ont été les mêmes que ceux décrits précédemment, avec les bactéries non encapsulées (Chapitre 2, paragraphe 2.1.3). Il s'agit des liquides aqueux à base de NaCl (9 g/L), de MRS (55 g/L) et de peptone (7,5 g/L), additionné de pepsine (3 g/L). Ces liquides ont été acidifiés à pH 1,8 et 3 à l'aide d'un pH-mètre puis stérilisés par filtration sur membrane de 0,45 µm (Macherey-Nagel<sup>®</sup>, Hoerd, France).

#### **2.1.2. Incubation des billes dans les liquides artificiels et dénombrement des bactéries**

Chaque lot de billes lyophilisées, imprégnées et non imprégnées, d'une masse initiale de 0,2 g (ce qui correspond à environ  $44 \pm 1$  billes), a été introduit dans des tubes Falcon contenant 10 mL de chacun des liquides artificiels (NaCl, MRS, protéose-peptone) à pH 1,8 et à pH 3. Après des périodes d'incubation indépendantes de 30, 60, 90 et 120 min à 37 °C, le liquide artificiel a été aspiré à l'aide d'une micropipette de 5 mL (deux aspirations), puis remplacé par du TPS (10 mL, pH 7). Après une nouvelle incubation à 37 °C pendant 60 min, les différents tubes Falcon ont été agités au vortex.

Des prélèvements de 1 mL ont été dilués en série dans du NaCl (9 mL, 9 g/L, pH 7). Un étalement de 0,1 mL de la dilution appropriée sur des boîtes de gélose, a permis, après 48 h d'incubation à 37 °C, de visualiser la présence ou non d'UFC. Le nombre d'UFC pour 0,1 mL étalé, a été converti en UFC par gramme (UFC/g) en tenant compte du facteur de dilution. La masse des billes (0,2 g) et le volume de liquide artificiel (10 mL) ont intervenu dans cette conversion. Des témoins ont été constitués de billes immergées directement dans du TPS (10 mL, pH 7).

### 2.1.3. Analyse statistique des données

Le nombre d'UFC/g, résultat de trois expériences indépendantes, a été exprimé sous forme de moyennes  $\pm$  écarts-types. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été appliqué pour comparer les valeurs moyennes. Le traitement des données a été réalisé à l'aide du programme AstroResearch sous Excel<sup>®</sup> (Delboy, 2003). La différence a été considérée significative pour tout  $P < 0,05$ .

## 2.2. Détermination des concentrations résiduelles des bactéries après incubation des billes imprégnées dans un modèle expérimental de simulation gastro-intestinale

### 2.2.1. Description du modèle expérimental

Le modèle expérimental proposé dans cette étude est représenté à la figure 24.

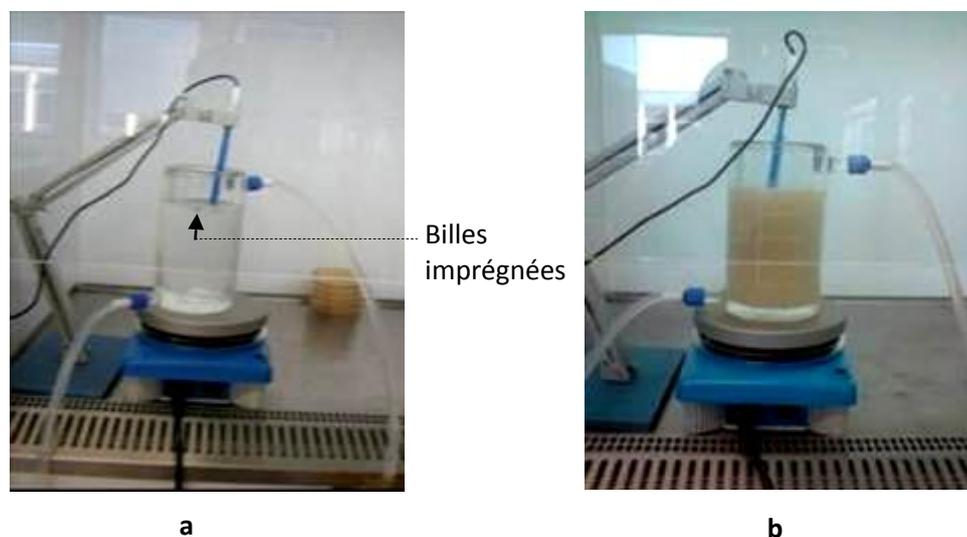


Figure 24. Dispositif expérimental de simulation gastro-intestinale

Le dispositif expérimental est constitué de plusieurs éléments. Un bécher en verre double paroi thermostaté, d'une capacité de 500 mL, a servi de réservoir. Une pompe péristaltique (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Karlsruhe, Allemagne) a fait circuler de l'eau à 37 °C dans la paroi du bécher, par le biais de deux tuyaux connectant la pompe au bécher. Un pH-mètre (Selecta<sup>®</sup>, Barcelone, Espagne) a permis de mesurer le pH du liquide contenu dans le bécher.

### Chapitre 3 : Désencapsulation et devenir des probiotiques

Un agitateur magnétique (Sartorius<sup>®</sup>, Palaiseau, France) a agité le liquide du bécher grâce à un barreau aimanté. L'agitateur magnétique et le pH-mètre ont été désinfectés par de l'éthanol à 70% (v/v). Le bécher a été stérilisé à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min. L'ensemble du dispositif expérimental stérile a été exporté sous la hotte à flux laminaire (Bioblock scientific<sup>®</sup>, Illkirch, France). Il n'y a pas de conditions d'anaérobiose à respecter car les souches de lactobacilles se développent en présence ou non d'oxygène.

Le liquide artificiel de la [figure 24a](#) est dépourvu d'enzymes et de sels biliaries. Dans ce liquide surnagent des billes imprégnées. Le liquide artificiel de la [figure 24b](#) contient la pepsine, la pancréatine et des sels biliaries. La coloration prise par le liquide est essentiellement due à la présence de pancréatine. Cette coloration n'a pas permis de visualiser la présence des billes imprégnées.

#### 2.2.2. Détermination du pH du liquide contenu dans le becher

L'électrode de pH (Schott<sup>®</sup>, Mainz, Allemagne) a combiné dans le même verre l'électrode de référence, l'électrode de mesure et un capteur automatique de température (allant de 5 à 100 °C). Un étalonnage manuel du pH-mètre a été réalisé avant chaque expérimentation. Deux solutions tamponnées par du tetroxalate de potassium à 0,05 mol/L ont été utilisées (pH 4,01 et 6,87). L'électrode a été plongée dans le liquide afin de déterminer la valeur de pH mesurée au départ de l'expérimentation. Le liquide est une solution de NaCl (8 g/L) tamponnée par du phosphate (0,2 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 1,44 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Ce liquide a été baptisé tampon phosphate de sodium (TPS).

#### 2.2.3. Conditions de l'expérimentation

Le tractus gastro-intestinal a été virtuellement subdivisé en cinq compartiments (estomac, duodénum, jéjunum, iléon, caecum). Les durées d'incubation affectées à chaque compartiment l'ont été sur la base de travaux de recherche, dont les résultats ont déterminé le temps moyen de transit gastro-intestinal chez l'homme ([Graff et al., 2000](#)). Ces durées ont été fixées à 2 h pour l'estomac, à 0,25 h pour le duodénum, à 3 h pour le jéjunum, à 4 h pour l'iléon et à 1 h pour le caecum. Les valeurs de pH attribuées à chaque compartiment ont tenu compte des variations de pH observées en période de jeûne ou de repas ([Vandamme et al., 2002](#)). Trois situations de contenu gastro-intestinal ont été définies.

### Chapitre 3 : Désencapsulation et devenir des probiotiques

La première situation correspond à un sujet à jeun (sans prise de nourriture). Les valeurs de pH dans le tractus gastro-intestinal d'un tel sujet ont été fixées à 1,8 au niveau de l'estomac; à 4 à l'entrée du duodénum; à 6 dans le jéjunum; et à 7 dans l'iléon et le caecum. La seconde situation correspond aux conditions de la prise d'un repas standard: les pH ont été fixés à 2,5 (Estomac); 5,5 (Duodénum); 6,5 (Jéjunum) et 7,5 (Iléon et Caecum). La troisième situation correspond aux conditions de la prise d'un repas copieux. Dans ce dernier cas, les valeurs de pH ont été les plus élevées au niveau de l'estomac (pH 3); du duodénum (pH 6); du jéjunum (pH 7); de l'iléon (pH 8) et du caecum (pH 8). Les conditions expérimentales de ce modèle gastro-intestinal sont résumées dans le [tableau 13](#).

Tableau 13. Conditions expérimentales dans le modèle gastro-intestinal<sup>Ψ</sup>.

Conditions <i>in vitro</i>						
Compartiments	Estomac (EST)	Duodénum (DUO)	Jéjunum (JEJ)	Iléon (IL)	Caecum (CC)	
Durée d'incubation	2 h	0,25 h	3 h	4 h	1 h	
Valeurs de pH	1,8	4	6	7	7	(Sans repas)
	2,5	5,5	6,5	7,5	7,5	(Repas standard)
	3	6	7	8	8	(Repas copieux)
Liquide artificiel	TPS servant à la fois de liquide gastrique et intestinal. Le TPS est une solution de NaCl (8 g/L) tamponnée par du Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2 g/L) et du KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,44 g/L).					
Enzymes	Pepsine	Pancréatine				
Sels biliaires	Absence	Présence				

<sup>Ψ</sup>Le repas copieux est un repas plus abondant en quantité et en qualité que le repas standard. Les enzymes et les sels biliaires ont été présents dans les autres compartiments de l'intestin grêle (JEJ, IL et CC). Le pouvoir tampon du Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> se manifeste à pH compris entre 6 et 7,5; celui du KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> se manifeste à pH compris entre 5,8 et 8. En dessous de pH 5,8; le liquide n'est plus tamponé. L'électrode de verre a été maintenue dans le liquide tout au long de l'expérimentation, même après ajustement du pH à la valeur souhaitée. TPS signifie tampon phosphate de sodium.

Le TPS est couramment utilisé pour simuler la partie intestinale du tractus digestif (Duc *et al.*, 2004; FSA, 2005; Michida *et al.*, 2006). Dans ce travail, la partie intestinale représente plus de 80% de la durée totale d'incubation (8,25 h sur 10,25 h). Pour cette raison,

### Chapitre 3 : Désencapsulation et devenir des probiotiques

le TPS a servi comme liquide de simulation de l'ensemble du tractus gastro-intestinal (parties gastrique et intestinale). Les concentrations en enzymes et sels biliaires ont été fixées à 3 g/L pour la pepsine, 10 g/L pour la pancréatine et 3 g/L pour les sels biliaires (mélange d'acide cholique et d'acide deoxycholique). Le becher thermostaté a permis de maintenir une température de 37 °C, température équivalente à celle du corps humain.

#### **2.2.4. Concentrations résiduelles des bactéries après incubation des billes imprégnées dans le modèle gastro-intestinal**

Plusieurs expériences ont été conduites avec les billes imprégnées. Nous avons dans un premier temps cherché à dénombrer la quantité de bactéries contenues dans les billes après incubation dans l'estomac et le duodénum. Pour cela, les billes ont été toutes récupérées à l'aide d'une spatule creuse. Ces billes ont été introduites dans un tube Falcon contenant 10 mL de tampon phosphate. Après 60 min d'incubation à 37 °C, le tube a été agité au vortex. Des dilutions en série ont été réalisées. La quantité de bactéries a été déterminée sur boîte de gélose. Dans une seconde étape, nous avons étudié les conditions de libération et de viabilité des bactéries dans le modèle expérimental. Pour cela, nous avons premièrement fait varier le pH du liquide artificiel, en l'absence d'enzymes et de sels biliaires. Deuxièmement, nous avons fait varier le pH du liquide artificiel en présence de concentrations connues d'enzymes et de sels biliaires. Dans un volume de 500 mL de liquide artificiel a été plongée une électrode de pH, sous une agitation de 120 tours/min. Le pH du liquide a été ajusté avec de l'acide chlorydrique à 37% (v/v), afin d'obtenir la valeur correspondante au pH de l'estomac (1,8; 2,5 ou 3). Après stabilisation de la valeur, 1 g de billes imprégnées ( $\approx 220 \pm 5$  billes) a été introduit dans le bécher. Après une incubation de 2 h, 1 mL du liquide artificiel a été prélevé dans le bécher en vue du dénombrement bactérien.

La valeur du pH a aussitôt été modifiée pour atteindre celle du duodénum (4; 5,5 ou 6) à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (10 mol/L). Après 0,25 h d'incubation duodénale, 1 mL a encore été prélevé dans le bécher pour un dénombrement bactérien. Le pH du liquide a ensuite été ajusté à la valeur du jejunum (6; 6,5 ou 7). Le liquide a été maintenu en incubation pendant 3 h. Après cette période, 1 mL a de nouveau été prélevé dans le bécher pour un dénombrement bactérien. Un dernier ajustement du pH a maintenu des valeurs correspondantes à celles de l'iléon et du caecum (7; 7,5 ou 8), pour des durées d'incubation respectives de 4 h et 1 h. Le liquide artificiel a été prélevé (1 mL) après les durées

### Chapitre 3 : Désencapsulation et devenir des probiotiques

d'incubation dans l'iléon et le caecum. Des dilutions en série ont été réalisées dans du NaCl (9 mL, 9 g/L, pH 7) à partir de chaque prélèvement de 1 mL. Un étalement de 0,1 mL de la dilution appropriée sur des boîtes de gélose, a permis, après 48 h d'incubation à 37 °C, de visualiser la présence ou non d'UFC. Le nombre d'UFC pour 0,1 mL étalé, a été converti en UFC/g, en tenant compte de plusieurs paramètres, notamment le facteur de dilution, la masse des billes (1 g) et le volume de liquide artificiel (500 mL). Des témoins ont été constitués de billes introduites directement dans du TPS (500 mL, pH 7) durant 10,25 h (durée d'incubation totale).

L'expérimentation a été reconduite en présence d'enzymes et de sels biliaires. La pepsine a d'abord été ajoutée dans le liquide artificiel, puis ce liquide a été acidifié aux valeurs de pH de l'estomac (1,8; 2,5 ou 3). Après une durée d'incubation de 2 h, le liquide artificiel a été prélevé pour un dénombrement bactérien. La pancréatine et les sels biliaires ont été ajoutés au démarrage de l'incubation duodénale, et le pH a aussitôt été ajusté (4; 5,5 ou 6). La composition du liquide artificiel n'a plus varié, excepté les modifications de pH au niveau des autres compartiments (jéjunum, iléon et caecum). L'agitation du liquide (120 tours/min) a été maintenue tout au long de l'expérimentation. Dans cette deuxième phase expérimentale, le volume du TPS a par la suite été réduit à 100 mL. Cette baisse du volume répondait au souci de réduire la quantité d'enzymes et de sels biliaires utilisés, du fait de leur coût élevé. La même masse de billes (1 g) a été introduite dans le becher.

#### 2.2.5. Analyse statistique des données

Le nombre d'UFC/g, résultat de trois expériences indépendantes, a été exprimé sous forme de moyennes  $\pm$  écarts-types. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été appliqué pour comparer les valeurs moyennes. Le traitement des données a été réalisé à l'aide du programme AstroResearch sous Excel<sup>®</sup> (Delboy, 2003). La différence a été considérée significative pour tout  $P < 0,05$ .

## 2.3. Détermination des concentrations résiduelles des bactéries après conservation des billes imprégnées dans des aliments: exemple de *L. plantarum* 299v

### 2.3.1. Choix de l'aliment

Deux types d'aliments ont été utilisés dans cette étude. Le premier aliment a été du chocolat noir d'origine vénézuélienne (pâtisserie Kubler, Strasbourg, France). Le terme "chocolat noir" est réservé à tout chocolat qui contient un minimum de 35% de composants secs de cacao au niveau de la matière sèche (au moins 18% de beurre de cacao et 17% de composés secs dégraissés de cacao) (Codex alimentarius, 2003). Plusieurs types de chocolat ont été décrits du point de vue de la réglementation (Codex alimentarius, 2003). Le chocolat solubilisé possède un pH compris entre 6,5 et 8 (MSDA, 2002).

Le deuxième aliment retenu a été la confiture de fraise. L'acidité normale des confitures est comprise entre 2,8 et 3,5 (Codex alimentarius, 2009). Le terme "confiture" désigne le produit préparé à partir de fruits entiers, de morceaux de fruits, de pulpe et/ou de purée concentrée ou non, d'une ou plusieurs variétés de fruits, additionné de sucres, avec ou sans adjonction d'eau, jusqu'à l'obtention d'une consistance adéquate (Codex alimentarius, 2009). Le chocolat et la confiture ont été choisis pour leur consistance semi-solide, mais surtout pour leurs pH différents. L'un à un pH acide, l'autre à un pH voisin de la neutralité. Des aliments semi-solides ou solides limitent la réhydratation des billes, comparativement à des aliments liquides.

Dans cette étude, la confiture de fraise a été préparée à partir de fruits de fraise selon le protocole de Maceiras *et al.* (2007) qui a été adapté. La préparation de la confiture a été réalisée à domicile pour des raisons pratiques (disponibilité du matériel de cuisine). Globalement, les étapes suivantes ont été respectées: 1) lavage et égouttage des fruits 2) triage et équeutage des fruits 3) pesée des fruits 4) Saupoudrage des fruits avec de la poudre de pectine 5) broyage des fruits 6) homogénéisation de la préparation 7) sucrage de la préparation 8) cuisson à ébullition durant dix minutes 9) conditionnement dans des pots à vis.

Le broyage a été possible grâce à un mixeur (Seb<sup>®</sup>, Faucogney, France). La préparation a été homogénéisée à l'aide d'une spatule en bois. Le sucre utilisé a été le saccharose cristallisé (Sucrerie d'Erstein<sup>®</sup>, Erstein, France). De la poudre de pectine (Vitpris<sup>®</sup>,

### Chapitre 3 : Désencapsulation et devenir des probiotiques

Unilever, France) a été utilisée car les fraises sont des fruits naturellement pauvres en pectine. La pectine permet d'éviter d'avoir des confitures liquides. En pratique, la préparation de 7 pots de confiture de fraise (d'une masse moyenne de 350 g par pot) nécessite 1600 g de fraises, 1800 g de sucre cristallisé et 100 g de pectine.

#### 2.3.2. Détermination du pH des aliments

La mesure du pH de certains aliments a été décrite dans la littérature. C'est le cas notamment des produits laitiers, et de certaines variétés de fromage (Upreti *et al.*, 2004). Des électrodes de verre ont été utilisées pour la mesure de ces pH. L'encrassement de la surface du verre par des composés lipidiques ou protéiques a été rapporté (Simon *et al.*, 1984). Des recommandations pour une élimination correcte des composés adsorbés à la surface du verre ont également été formulées (Maas *et al.*, 1987). Selon le protocole proposé par Nestlé (MSDA, 2002), il est possible de déterminer le pH du chocolat.

Dans cette étude, deux carreaux de chocolat noir (masse unitaire de 4,2 g) ont été morcelés de façon indépendante. Chaque carreau morcelé a été introduit dans un tube Falcon de 50 mL. Les deux tubes ont été incubés à 37 °C pendant 1 h. Un volume de 25 mL d'eau milli-Q a été introduit dans chaque tube. Après agitation au vortex pendant 1 min, les deux tubes ont été incubés à 37 °C pendant 30 min. Le volume de chacun des tubes a été introduit dans un bécher de 50 mL. Après avoir laissé reposer à la température du laboratoire, l'électrode de verre a été plongée dans la dispersion aqueuse de chocolat, sous une agitation de 50 tours/min. Grâce à l'enregistreur de données (pH-mètre), une valeur de pH a été déterminée. Quant à la confiture de fraise, il a fallu disperser 10 g dans 50 mL d'eau milli-Q. La valeur du pH a été déterminée à l'aide du pH-mètre.

#### 2.3.3. Conditions de conservation des billes imprégnées

Une masse de 4,2 g de chacun des aliments a été introduite dans plusieurs tubes Falcon. L'ensemble des tubes a été pasteurisé (90 °C, 1 min). Après refroidissement, les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 1 h. Des lots de billes (0,2 g) contenant *L. plantarum* 299v ont été introduits dans chaque tube Falcon. Les tubes ont été mélangés au vortex pendant 1 min, puis disposés dans deux portoirs. L'un des portoirs a été conservé à la température du laboratoire (25 °C) et l'autre au réfrigérateur (5 °C). Des durées de

### **Chapitre 3 : Désencapsulation et devenir des probiotiques**

conservation ont été fixées à 1, 4, 8 et 12 semaines. Des billes témoins (billes lyophilisées non incorporées dans un aliment) ont été conservées pendant 12 et 24 semaines au réfrigérateur, et à la température du laboratoire.

#### **2.3.4. Désencapsulation et dénombrement des bactéries**

Après les différentes durées de conservation (1, 4, 8 et 12 semaines), les tubes ont été récupérés puis incubés à 37 °C pendant 1 h. Un volume de 10 mL de TPS (pH 7) a été introduit dans chaque tube. Les tubes ont été mélangés au vortex pendant 1 min, puis incubés à nouveau pendant 1 h. Plusieurs prélèvements de 1 mL ont été dilués en série dans du NaCl (9 mL, 9 g/L, pH 7). Un étalement de 0,1 mL de la dilution appropriée sur des boîtes de gélose a permis, après 48 h d'incubation à 37 °C, de visualiser la présence ou non d'UFC. Le nombre d'UFC pour 0,1 mL étalé, a été converti en UFC/g, en tenant compte de plusieurs paramètres, notamment le facteur de dilution, la masse des billes (0,2 g) et le volume de TPS (10 mL). Le dénombrement des bactéries a aussi été réalisé avec les billes témoins.

#### **2.3.5. Analyse statistique des données**

Le nombre d'UFC/g, résultat de trois expériences indépendantes, a été exprimé sous forme de moyennes  $\pm$  écarts-types. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été appliqué pour comparer les valeurs moyennes. Le traitement des données a été réalisé à l'aide du programme AstroResearch sous Excel<sup>®</sup> (Delboy, 2003). La différence a été considérée significative pour tout  $P < 0,05$ .

## **3. Résultats et Discussion**

### **3.1. Concentrations résiduelles des bactéries après incubation des billes imprégnées et non imprégnées**

Cette partie du travail a été consacrée aux bactéries vivantes, encore présentes dans les billes imprégnées et non imprégnées, après que ces billes aient été incubées dans 10 mL de liquides artificiels (NaCl, MRS et protéose-peptone à pH 1,8 et 3) contenus dans des tubes Falcon. L'incubation s'est faite de façon séquentielle, par période de 30 min, sur une durée totale de 120 min. Après chaque durée d'incubation, les liquides artificiels ont été aspirés par une micropipette, puis remplacés par du TPS (pH 7). Le TPS a permis la dissolution des billes, et les concentrations résiduelles des bactéries ont été déterminées après 30, 60, 90 et 120 min d'incubation.

#### **3.1.1. Concentrations résiduelles des bactéries dans les billes non imprégnées**

Les concentrations des bactéries dans les billes non imprégnées, après incubation à pH 1,8 et 3, sont données dans les [tableaux 14](#) et [15](#). Le [tableau 14](#) se rapporte aux concentrations résiduelles des bactéries, après incubation des billes non imprégnées à pH 1,8. Il a été observé une baisse des concentrations bactériennes d'au moins 5 log<sub>10</sub> UFC/g après la 30<sup>ème</sup> min d'incubation. Aucune survie des bactéries n'a été observée après la 90<sup>ème</sup> min quelle que soit la souche bactérienne, et quel que soit le type de liquide artificiel.

Le [tableau 15](#) se rapporte aux concentrations résiduelles des bactéries, après incubation des billes non imprégnées à pH 3. Il a été observé après la 120<sup>ème</sup> min d'incubation, une baisse substantielle des concentrations bactériennes, de l'ordre de 1,6 à 2,6 log<sub>10</sub> UFC/g, en fonction de la souche bactérienne et du liquide artificiel. On retiendra de ces résultats que les billes non imprégnées, ont été incapables d'assurer la protection des bactéries au-delà d'1 h d'incubation à pH 1,8.

### Chapitre 3 : Désencapsulation et devenir des probiotiques

Tableau 14. Concentrations résiduelles de *L. plantarum* dans les billes non imprégnées (pH 1,8)

Concentrations bactériennes résiduelles à pH 1,8*						
	Témoin	30 min	60 min	90 min	120 min	
<i>L. plantarum</i> 800		5,4±0,3	4,1±0,7	0,0	0,0	milieu peptone
	9,8±0,1	4,3±0,1	3,7±0,3	0,0	0,0	milieu NaCl
		4,7±0,1	3,9±0,4	0,0	0,0	milieu MRS
<i>L. plantarum</i> CIPA159		5,6±0,5	3,9±0,5	0,0	0,0	milieu peptone
	10,2±0,2	5,2±0,4	4,0±0,6	0,0	0,0	milieu NaCl
		5,5±0,3	4,0±1,0	0,0	0,0	milieu MRS
<i>L. plantarum</i> 299v		5,8±0,5	4,3±0,4	0,0	0,0	milieu peptone
	10,0±0,1	5,5±0,1	4,9±0,1	0,0	0,0	milieu NaCl
		5,6±0,1	4,4±0,5	0,0	0,0	milieu MRS

\* Les résultats sont exprimés en log<sub>10</sub> UFC/g après conversion des UFC dénombrées sur les boîtes de gélose. Les moyennes ± écarts-types de trois essais indépendants sont données. Pour chaque essai, trois dénombrements sur boîte de gélose ont été réalisés. Les résultats sont comparés à un témoin non traité.

Tableau 15. Concentrations résiduelles de *L. plantarum* dans les billes non imprégnées (pH 3)

Concentrations bactériennes résiduelles à pH 3*						
	Témoin	30 min	60 min	90 min	120 min	
<i>L. plantarum</i> 800		9,5±0,2	8,8±0,3	7,9±0,3	7,4±0,2	milieu peptone
	9,8±0,1	9,8±0,2	8,8±0,2	7,9±0,3	7,5±0,1	milieu NaCl
		9,8±0,1	9,1±0,2	8,4±0,2	7,6±0,2	milieu MRS
<i>L. plantarum</i> CIPA159		10,0±0,1	9,4±0,3	8,7±0,4	7,9±0,6	milieu peptone
	10,2±0,2	10,0±0,2	9,8±0,2	9,1±0,2	8,0±0,2	milieu NaCl
		10,1±0,1	9,7±0,1	9,1±0,2	8,6±0,1	milieu MRS
<i>L. plantarum</i> 299v		9,9±0,1	9,6±0,2	8,9±0,2	7,7±0,4	milieu peptone
	10,0±0,1	10,0±0,1	9,7±0,1	8,5±0,2	7,9±0,3	milieu NaCl
		10,0±0,1	9,7±0,10	9,1±0,1	8,5±0,2	milieu MRS

\* Les résultats sont exprimés en log<sub>10</sub> UFC/g après conversion des UFC dénombrées sur les boîtes de gélose. Les moyennes ± écarts-types de trois essais indépendants sont données. Pour chaque essai, trois dénombrements sur boîte de gélose ont été réalisés. Les résultats sont comparés à un témoin non traité.

### 3.1.2. Concentrations résiduelles des bactéries dans les billes imprégnées

Les concentrations bactériennes dans les billes imprégnées, après incubation à pH 1,8 et 3, sont données dans les tableaux 16 et 17. Le tableau 16 se rapporte aux concentrations résiduelles des bactéries, après incubation des billes imprégnées à pH 1,8. Des concentrations bactériennes comprises entre 4 et 6,9 log<sub>10</sub> UFC/g ont été obtenues après la 120<sup>ème</sup> min d'incubation. Le tableau 17 se rapporte aux concentrations résiduelles des bactéries, après incubation des billes imprégnées à pH 3. Ces concentrations résiduelles ne sont pas si différentes de celles du témoin non traité, en tenant compte des écarts-types (moins de 1 log<sub>10</sub> UFC/g de différence).

On retiendra de ces résultats que les billes imprégnées ont maintenu les bactéries viables bien au-delà des 2 h d'incubation à pH 1,8 et 3, contrairement aux billes non imprégnées qui ont montré leurs limites à pH 1,8.

Tableau 16. Concentrations résiduelles de *L. plantarum* dans les billes imprégnées (pH 1,8)

Concentrations bactériennes résiduelles à pH 1,8*						
	Témoin	30 min	60 min	90 min	120 min	
<i>L. plantarum</i> 800		7,8±0,1	6,3±0,7	5,5±0,2	4,3±0,3	milieu peptone
	10,0±0,2	8,0±0,3	5,8±0,4	5,6±0,4	4,9±0,3	milieu NaCl
		7,7±0,6	6,8±0,2	6,6±0,2	5,8±0,1	milieu MRS
<i>L. plantarum</i> CIPA159		8,1±0,1	7,1±0,8	6,5±1,1	5,3±0,3	milieu peptone
	10,2±0,2	9,1±0,3	6,7±0,2	6,0±0,3	5,2±0,4	milieu NaCl
		8,5±0,5	6,7±0,2	6,1±0,01	5,1±0,1	milieu MRS
<i>L. plantarum</i> 299v		7,8±0,5	7,2±0,5	6,3±0,7	5,3±0,4	milieu peptone
	10,1±0,1	8,1±0,3	7,8±0,1	7,3±0,4	6,6±0,1	milieu NaCl
		8,1±0,1	7,5±0,2	7,5±0,4	6,3±0,6	milieu MRS

\* Les résultats sont exprimés en log<sub>10</sub> UFC/g après conversion des UFC dénombrées sur les boîtes de gélose. Les moyennes ± écarts-types de trois essais indépendants sont données. Pour chaque essai, trois dénombrements sur boîte de gélose ont été réalisés. Les résultats sont comparés à un témoin non traité.

Tableau 17. Concentrations résiduelles de *L. plantarum* dans les billes imprégnées (pH 3)

Concentrations bactériennes résiduelles à pH 3*						
	Témoin	30 min	60 min	90 min	120 min	
<i>L. plantarum</i> 800		9,7±0,5	9,8±0,3	9,6±0,4	9,4±0,4	milieu peptone
	10,0±0,2	10,0±0,1	9,8±0,2	9,8±0,3	9,7±0,2	milieu NaCl
		9,9±0,2	9,8±0,3	9,8±0,2	9,7±0,1	milieu MRS
<i>L. plantarum</i> CIPA159		10,1±0,2	10,0±0,2	9,8±0,3	9,8±0,2	milieu peptone
	10,2±0,2	10,0±0,2	9,9±0,2	9,9±0,3	9,8±0,4	milieu NaCl
		10,2±0,2	10,1±0,1	9,9±0,3	9,9±0,2	milieu MRS
<i>L. plantarum</i> 299v		10,0±0,1	9,9±0,2	9,7±0,3	9,7±0,2	milieu peptone
	10,1±0,1	10,0±0,1	9,9±0,1	9,8±0,2	9,7±0,2	milieu NaCl
		9,9±0,1	9,9±0,1	9,8±0,2	9,7±0,2	milieu MRS

\* Les résultats sont exprimés en  $\log_{10}$  UFC/g après conversion des UFC dénombrées sur les boîtes de gélose. Les moyennes  $\pm$  écarts-types de trois essais indépendants sont données. Pour chaque essai, trois dénombrements sur boîte de gélose ont été réalisés. Les résultats sont comparés à un témoin non traité.

La comparaison des concentrations bactériennes issues des billes imprégnées et non imprégnées a montré des différences. Les bactéries encapsulées dans les billes imprégnées ont survécu durant les 2 h d'incubation en milieu acide. La désencapsulation des bactéries dans le TPS et leur dénombrement ont permis d'évaluer la capacité réelle des billes à protéger de façon efficace les bactéries qui y ont été piégées. Cette étude montre que la survie des bactéries, même protégées, a été influencée par les conditions du milieu.

L'acidité du milieu a été le principal facteur de la baisse des concentrations bactériennes. Toutefois, les bactéries immobilisées dans les billes imprégnées ont été mieux protégées contre les effets de l'acidité. Ce constat montre l'intérêt d'une protection supplémentaire des billes non imprégnées. La double protection a permis de maintenir un niveau élevé de concentration bactérienne, jusqu'au terme de la durée d'incubation de 120 min. Les bactéries encapsulées dans les billes imprégnées pourront donc survivre si un pH acide de l'ordre de 1,8 était retrouvé au niveau gastrique chez l'homme.

Dans un contexte de mise en place de systèmes de protection capables de résister à l'acidité gastrique, la double protection présentée dans cette étude est une alternative intéressante, comparée à la protection unique avec les billes d'alginate non imprégnées. L'originalité de ce travail repose sur cette double protection, notamment avec les protéines de lactosérum qui ont été utilisées pour la première fois comme solution d'imprégnation des billes d'alginate (Gbassi *et al.*, 2009). Seuls nos résultats obtenus avec les billes d'alginate non imprégnées peuvent faire l'objet de comparaison avec des résultats d'autres auteurs. Toutefois, cette comparaison n'est pas objective car elle se heurte à de nombreux obstacles: souches bactériennes différentes, milieux gastriques artificiels différents, degré d'acidité des milieux différents etc. Tout ceci pose le problème du manque de standardisation des protocoles d'études *in vitro*.

#### **3.2. Devenir des billes imprégnées et concentrations résiduelles des bactéries après incubation des billes dans un modèle expérimental de simulation gastro-intestinale**

Cette partie du travail de thèse a été consacrée aux bactéries vivantes uniquement immobilisées dans les billes imprégnées. Ces billes ont démontré leur capacité à protéger les bactéries à pH 1,8 et 3. La simulation d'un modèle expérimental de tractus gastro-intestinal a été initiée, afin de déterminer dans quelles conditions les bactéries piégées dans les billes pouvaient être libérées dans le liquide intestinal. Dans ce modèle, le TPS a été choisi comme liquide gastro-intestinal artificiel. Cinq compartiments virtuels ont été définis (estomac, duodénum, jéjunum, iléon et caecum).

Des durées d'incubation fixes et des valeurs de pH variables ont été affectées à chaque compartiment. Trois situations de contenu gastro-intestinal ont été définies en tenant compte du pH dans les cinq compartiments. La première situation (pH 1,8-4-6-7-7) se rapporte au contenu gastro-intestinal d'un sujet à jeun. La seconde situation (pH 2,5-5,5-6,5-7,5-7,5) définit le contenu d'un sujet après un repas standard. La troisième situation est celle d'un sujet après un repas copieux (pH 3-6-7-8-8). Les concentrations résiduelles des bactéries ont été déterminées après 2 h d'incubation dans l'estomac, 0,25 h dans le duodénum, 3 h dans le jéjunum, 4 h dans l'iléon et 1 h dans caecum, en présence ou non d'enzymes et de sels biliaires.

### 3.2.1. Effets du pH sur le devenir des billes et sur la survie des bactéries libérées

Après avoir introduit les billes imprégnées dans le liquide artificiel, on a constaté durant l'incubation que les billes se réhydrataient. Elles tendaient à reprendre la forme initiale qu'elles avaient avant la lyophilisation. Le niveau de réhydratation était toutefois lié au pH du liquide artificiel. En dessous de pH 6, les billes étaient toujours visibles dans le liquide. Les phases d'incubation dans l'estomac (2 h à pH 1,8; 2,5 ou 3) et le duodénum (0,25 h à pH 4 et 5,5) n'ont pas conduit à la dissolution des billes dans le liquide artificiel. Dès l'ajustement du pH à 6 et au delà, les billes ont amorcé leur désintégration. Elles ont été totalement dissoutes dans le liquide au fur et à mesure que la durée d'incubation augmentait (figure 25). Les figures 25A, 25B et 25C ont été assimilées aux trois situations de contenu gastro-intestinal précédemment définies: situation à jeun (fig. 25A), situation après un repas standard (fig. 25B) et situation après un repas copieux (fig. 25C).

En observant la figure 25, on constate que des bactéries ont été dénombrées dans le compartiment intestinal, attestant que celles-ci ont survécu durant les 2 h d'incubation dans l'estomac. Les concentrations bactériennes les plus importantes ont été obtenues dans le jéjunum. C'est le cas par exemple de la figure 25A où il a été obtenu  $6,8 \pm 0,3 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* 800,  $7,3 \pm 0,3 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* CIPA159 et  $7,5 \pm 0,4 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* 299v. Dans la figure 25B, les concentrations bactériennes ont été de  $9,3 \pm 0,4 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* 800;  $9,7 \pm 0,4 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* CIPA159 et  $9,8 \pm 0,3 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* 299v. Dans la figure 25C, les concentrations obtenues dans le jéjunum ont été semblables à celles du témoin (CTL). Le témoin correspond aux bactéries désencapsulées après l'incubation des billes dans le liquide artificiel (pH 6,5) pendant 10,25 h. Les concentrations bactériennes dans l'iléon et le caecum sont restées similaires à celles du jéjunum, en tenant compte des écarts-types.

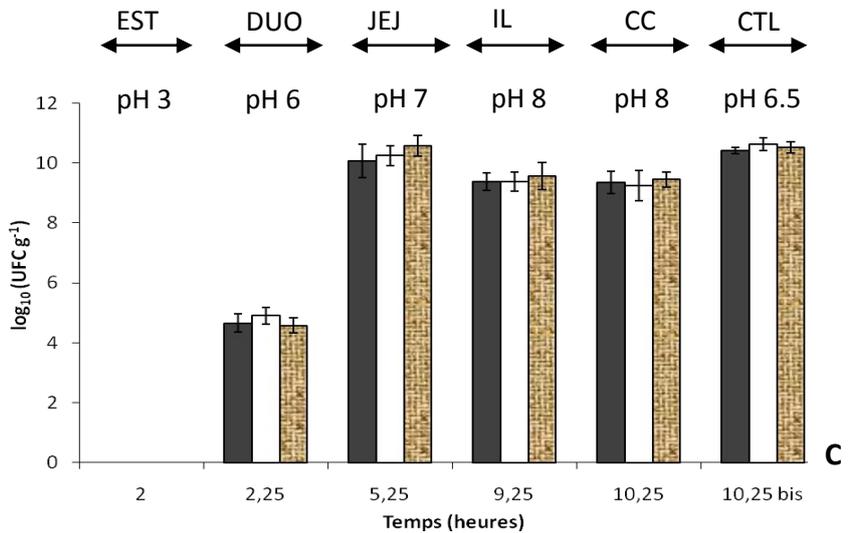
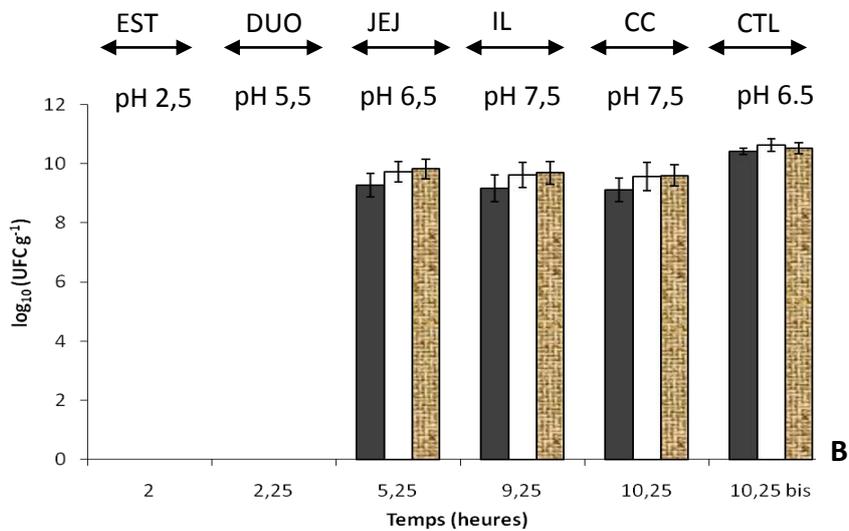
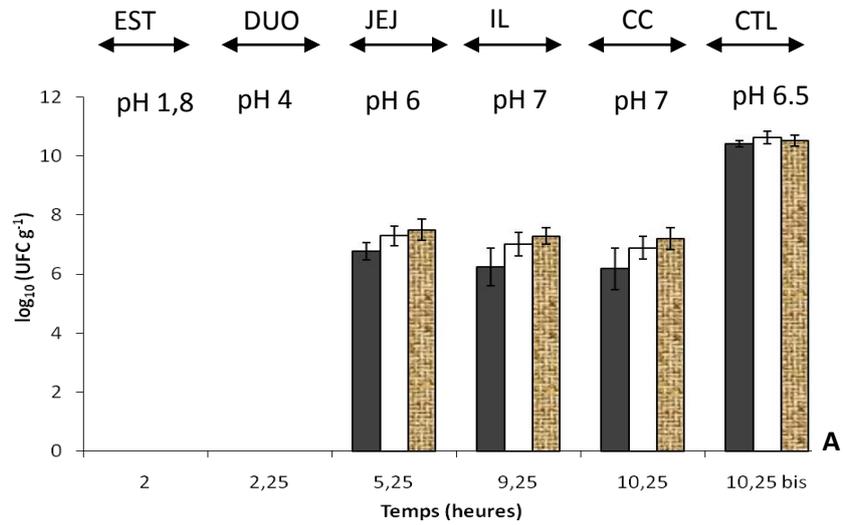


Figure 25. Effet du pH sur la survie des bactéries libérées

■ *L. plantarum* 800 □ *L. plantarum* CIPA159 ▤ *L. plantarum* 299v

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  écarts types de neuf répliques sur boîte de gélose. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. EST (estomac) DUO (duodenum) JEJ (jejunum) IL (iléon) CC (caecum) CTL (contrôle). Le contrôle correspond au témoin exposé au tampon phosphate pendant 10,25 h.

### Chapitre 3 : Désencapsulation et devenir des probiotiques

Dans cette étude, nous avons dénombré les bactéries libérées dans les différents compartiments virtuels du modèle *in vitro*. Les plus faibles concentrations bactériennes déterminées dans le jéjunum sont celles qui correspondent à la situation d'un sujet à jeun (fig. 25A). Les pH appliqués dans l'estomac et le duodénum étaient respectivement de 1,8 et 4. Dans la situation postérieure à un repas standard (fig. 25B) ou copieux (fig. 25C), on a constaté que les concentrations bactériennes déterminées dans le jéjunum étaient quasiment similaires. Ce constat montre que les bactéries tolèrent mieux les pH 2,5 ou 3 appliqués au niveau de l'estomac, et 5,5 ou 6 appliqués au niveau du duodénum, contrairement aux pH 1,8 (estomac) et 4 (duodénum). La baisse des concentrations serait liée à la mort des bactéries, du fait de la pénétration du liquide dans les billes imprégnées. Pour vérifier une telle hypothèse, nous avons refait les manipulations et récupéré les billes après une durée d'incubation de 2 h pour l'estomac, puis de 2,25 h pour l'estomac et le duodénum. Les billes récupérées ont ensuite été désencapsulées dans du TPS. La quantité de bactéries libérées dans le TPS a été déterminée sur boîte de gélose. Les concentrations bactériennes obtenues sont présentées dans les tableaux 18 et 19.

Tableau 18. Vérification de la viabilité des bactéries après incubation des billes durant 2 h

Concentrations bactériennes ( $\log_{10}$ UFC/g) après désencapsulation des billes				
	Témoin	pH 1,8 & 2 h	pH 2,5 & 2 h	pH 3 & 2 h
<i>L. plantarum</i> 800	10,2±0,1	7,1±0,2	9,4±0,2	10,0±0,2
<i>L. plantarum</i> CIPA159	10,8±0,2	7,7±0,2	9,9±0,2	10,4±0,2
<i>L. plantarum</i> 299v	10,7±0,1	7,6±0,3	10,0±0,3	10,5±0,1

Tableau 19. Vérification de la viabilité des bactéries après incubation des billes durant 2,25 h

Concentrations bactériennes ( $\log_{10}$ UFC/g) après désencapsulation des billes				
	Témoin	pH 1,8 et 4 2,25 h	pH 2,5 et 5,5 2,25 h	pH 3 et 6 2,25 h
<i>L. plantarum</i> 800	10,2±0,1	7,2±0,3	9,5±0,4	9,7±0,3
<i>L. plantarum</i> CIPA159	10,8±0,2	7,9±0,1	9,7±0,3	10,3±0,1
<i>L. plantarum</i> 299v	10,7±0,1	7,6±0,2	9,9±0,1	10,4±0,2

A l'analyse des [tableaux 18 et 19](#), il est évident que les souches de *L. plantarum* sont restées viables à l'intérieur des billes. Les pertes constatées surtout à pH 1,8 confirment la pénétration du liquide à l'intérieur des billes. La faible durée d'incubation dans le duodénum (0,25 h) n'a pas considérablement affecté les concentrations bactériennes obtenues. Les résultats de ces tableaux sont en accord avec ceux de la [figure 25](#). Les bactéries ne sont pas libérées dans les compartiments de l'estomac et du duodénum ([figs. 25A et 25B](#)). Toutefois, une faible quantité de bactéries a été libérée dans le duodénum ([fig. 25C](#)) comparée à la quantité encore présente dans les billes ([tableau 19](#)). Cela peut s'expliquer par un début de désagrégation des billes dans le milieu à pH 6.

#### 3.2.2. Effets du pH, des enzymes et des sels biliaires sur la survie des bactéries libérées

Les pH appliqués dans les différents compartiments de l'expérience précédente ont été maintenus. Les situations de contenu gastro-intestinal ont été les mêmes que celles décrites précédemment. En observant la [figure 26 \(A, B et C\)](#), on constate que des bactéries ont été dénombrées dans le compartiment intestinal, attestant que celles-ci ont survécu malgré la présence d'enzymes et de sels biliaires. Aucune bactérie n'a été dénombrée durant les phases d'incubation de l'estomac et du duodénum ([figs. 26A et B](#)), ce qui confirme que les bactéries restent emprisonnées dans les billes à des pH  $\leq 5,5$ . Dans la [figure 26C](#), on a pu dénombrer des bactéries dans le duodénum, à des concentrations très faibles, ce qui confirme à nouveau une désagrégation partielle des billes.

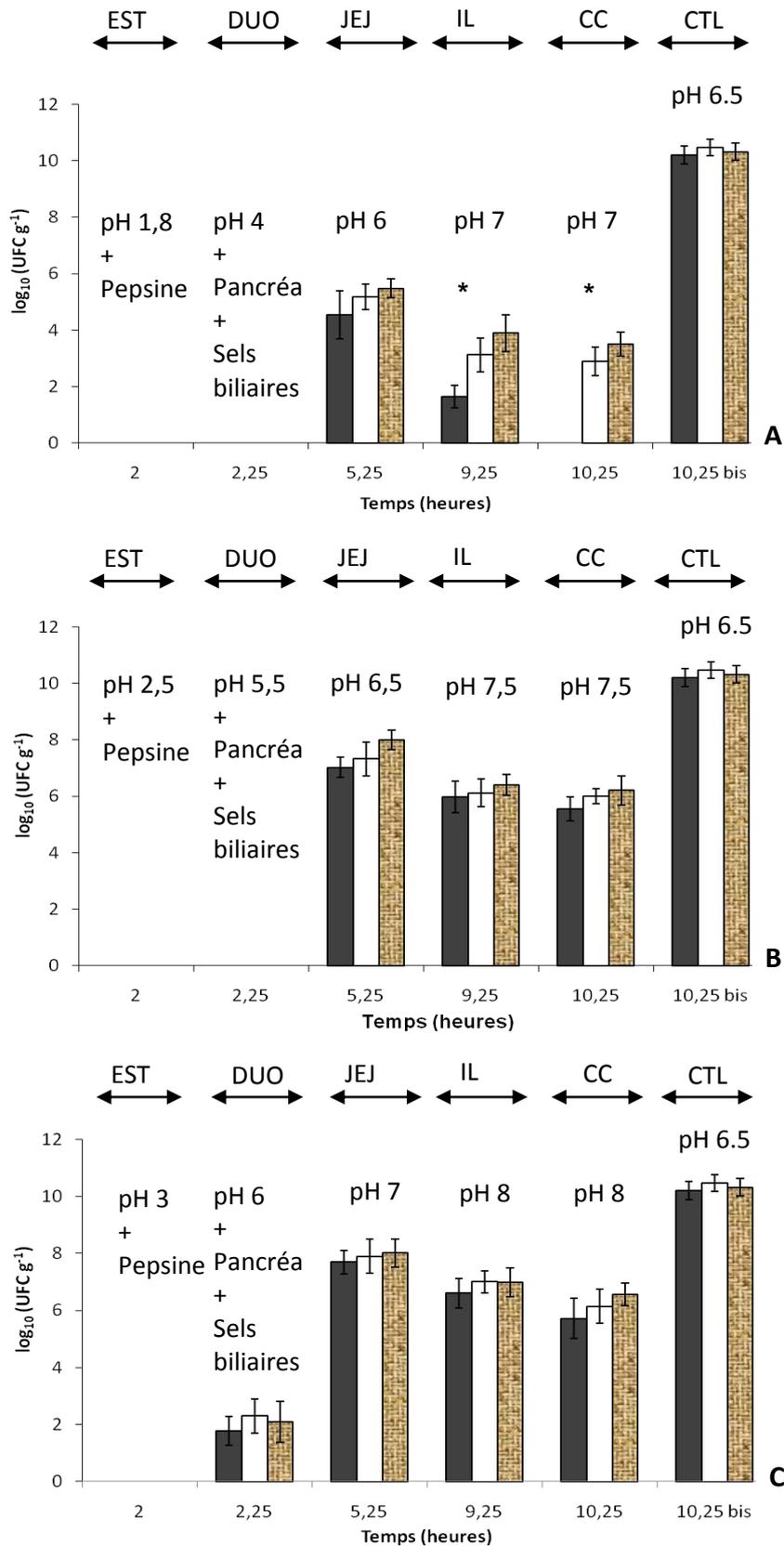


Figure 26. Effet du pH, des enzymes et des sels biliaires sur la survie des bactéries

■ *L. plantarum* 800 □ *L. plantarum* CIPA159 ▤ *L. plantarum* 299v

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écarts types de neuf replications sur boîte de gélose. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. EST (estomac) DUO (duodenum) JEJ (jejunum) IL (iléon) CC (caecum) CTL (contrôle). Le contrôle correspond au témoin traité dans du PBS. \*Les moyennes obtenues sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ) selon le test de Mann-Whitney.

### Chapitre 3 : Désencapsulation et devenir des probiotiques

Les concentrations bactériennes déterminées dans le jéjunum (fig. 26A, situation à jeun) ont été de  $4,5 \pm 0,9 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* 800;  $5,2 \pm 0,5 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* CIPA159 et  $5,5 \pm 0,3 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* 299v. Dans la figure 26B (situation postérieure à un repas standard), il a été obtenu dans le jéjunum une concentration de  $7,1 \pm 0,4 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* 800;  $7,3 \pm 0,6 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* CIPA159 et  $8,0 \pm 0,3 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* 299v. Dans la figure 26C (situation postérieure à un repas copieux), les concentrations bactériennes dans le jéjunum ont été de  $7,7 \pm 0,4 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* 800;  $7,9 \pm 0,6 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* CIPA159 et  $8,1 \pm 0,5 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* 299v. En présence du témoin (CTL), il a été obtenu des concentrations de  $10,2 \pm 0,3 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* 800;  $10,5 \pm 0,3 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* CIPA159 et  $10,3 \pm 0,3 \log_{10}$  UFC/g avec *L. plantarum* 299v. L'observation de la figure 26 montre que les bactéries ont été majoritairement libérées dans le jéjunum. Des concentrations bactériennes n'ont pu être obtenues dans le caecum avec *L. plantarum* 800, après 10,25 h d'incubation (fig. 26A) là où des concentrations bactériennes ont été obtenues avec *L. plantarum* CIPA159 ( $2,9 \pm 0,5 \log_{10}$  UFC/g) et *L. plantarum* 299v ( $3,5 \pm 0,4 \log_{10}$  UFC/g).

Dans cette expérimentation, les effets des enzymes et des sels biliaires sur la survie des bactéries ont été évalués. Les résultats ont montré que les souches de *L. plantarum* ont été sensibles à cet environnement. En comparant les figures 25 et 26, on note une plus faible concentration résiduelle de bactéries à la figure 26. Une baisse supplémentaire de l'ordre de 1 à  $2 \log_{10}$  UFC/g a été constatée. Cette baisse est d'autant plus prononcée que les valeurs de pH appliquées ont été les plus faibles (fig. 26A). En plus du pH, les enzymes et les sels biliaires ont contribué à cette baisse. En comparant les données de la littérature sur la survie des bactéries encapsulées dans des conditions gastro-intestinales artificielles, cette étude est la première qui présente un tel modèle *in vitro*, et qui utilise une si longue durée d'incubation (10,25 h). Des durées d'incubation maximales de 6 h et de 6,5 h ont respectivement été constatées dans les études de Michida *et al.* (2006) et de Picot et Lacroix (2004). En résumé, on notera que le protocole proposé dans cette étude est une première dans l'évaluation de la survie des microorganismes. Le dispositif expérimental proposé est simple et original. Le changement continu du pH tout au long de l'expérimentation, en présence d'enzymes et de sels biliaires, est une approche réaliste de la simulation d'un tractus gastro-intestinal.

### 3.3. Concentrations résiduelles des bactéries après conservation des billes imprégnées dans des aliments: cas de *L. plantarum* 299v

Cette partie du travail a été consacrée aux applications possibles des billes imprégnées. Le domaine alimentaire a été retenu car les probiotiques sont le plus souvent incorporés dans des aliments. Des présentations relevant plus de formes galéniques (gélules, ampoules, poudres à diluer etc) existent et portent le nom de compléments alimentaires. Le choix de l'aliment a reposé sur deux critères: sa texture (semi-solide ou solide) et son pH. La confiture a été retenue pour son aspect gélifiant (semi-solide) et son pH acide. La dispersion aqueuse de confiture a donné un pH de 3,1.

Le chocolat a été retenu pour son aspect solide et son pH proche de la neutralité. Le chocolat fond à 37 °C. La dispersion aqueuse de chocolat a donné un pH de 7,2. L'expérimentation a été conduite avec *L. plantarum* 299v qui est une souche commerciale. Les billes imprégnées ont été incorporées dans ces deux aliments, puis conservées durant plusieurs semaines. La désencapsulation des lots de billes témoins a montré une densité bactérienne de  $9,9 \pm 0,3 \log_{10}$  UFC/g. Les billes témoins sont les billes lyophilisées non incorporées dans un aliment. Ces billes ont été introduites dans du tampon phosphate jusqu'à leur dissolution. Après dilution en série et dénombrement sur boîte de gélose, on a remarqué que la concentration bactérienne est restée constante même après 24 semaines de conservation.

La figure 27 présente les concentrations bactériennes de *L. plantarum* 299v, après conservation dans le chocolat et la confiture, à 25 °C et à 5 °C. Une bonne survie de la bactérie a été constatée dans le chocolat jusqu'à la 12<sup>ème</sup> semaine de conservation, à 25 °C et à 5 °C ( $9,4 \pm 0,3 \log_{10}$  UFC/g à 25 °C contre  $9,2 \pm 0,2 \log_{10}$  UFC/g à 5 °C). Avec la confiture, la concentration bactérienne a chuté dès la 1<sup>ère</sup> semaine de conservation (perte de 1,8 à 3,2  $\log_{10}$  UFC/g selon la température de conservation) pour atteindre à la 4<sup>ème</sup> semaine une concentration de  $5,2 \pm 0,2 \log_{10}$  UFC/g à 5 °C et  $4,6 \pm 0,5 \log_{10}$  UFC/g à 25 °C. Après 8 semaines de conservation dans la confiture, aucune survie n'a été obtenue.

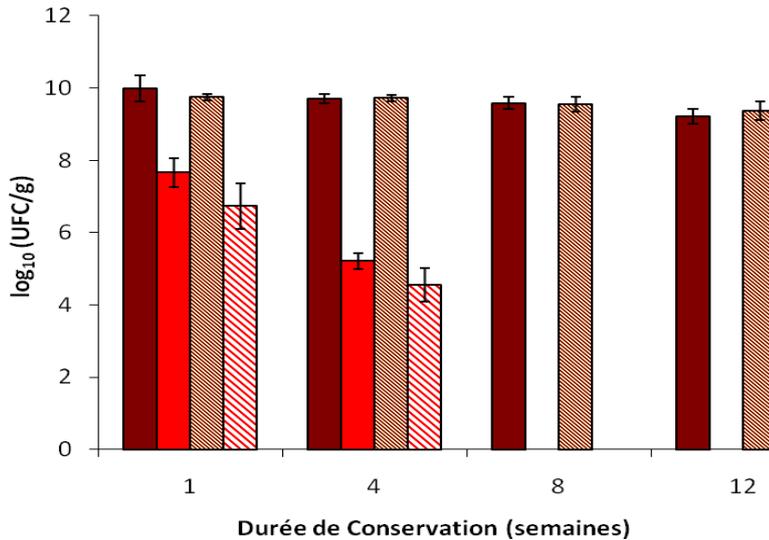


Figure 27. Influence de la matrice alimentaire sur la survie de *L. plantarum* 299v encapsulée. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types de trois expériences indépendantes.

- Chocolat 25°C
- ▨ Chocolat 5°C
- ▤ Confiture 25°C
- Confiture 5°C

Dans cette expérience, il a été question d'évaluer l'influence de l'aliment (chocolat et confiture) sur la survie des bactéries encapsulées. Sous leur forme lyophilisée, les probiotiques peuvent se conserver plusieurs années. Certaines espèces lyophilisées ont pu se conserver durant 15 ans (*L. acidophilus*), 16 ans (*E. faecium*) voire 20 ans (*S. cerevisiae*) (Miyamoto-Shinohara et al., 2006). Toutefois, aucune étude n'est disponible sur la conservation à long terme de *L. plantarum* lyophilisée. Des billes lyophilisées contenant *L. plantarum* 299v ont été incorporées dans chacun des aliments.

Dans le cas de la confiture, le pH acide (3,1) est responsable de la baisse des concentrations de *L. plantarum* 299v. Le niveau de concentration de cette bactérie dans la confiture pose le problème du délai de consommation des aliments contenant des probiotiques. L'acidité normale des confitures est comprise entre 2,8 et 3,5 (Maceiras et al., 2007; Codex alimentarius, 2009). A de tels pH, il est difficile de voir survivre des bactéries sur une longue période, même si elles sont protégées. En présence de conditions défavorables, la protection conférée par l'encapsulation est limitée dans le temps. La perte en survie de *L. plantarum* 299v dans la confiture de fraises est donc la conséquence de l'acidité de cet aliment.

### Chapitre 3 : Désencapsulation et devenir des probiotiques

Les bactéries encapsulées et incorporées dans le chocolat ont survécu durant les 12 semaines de conservation. Cette excellente survie est essentiellement liée au pH du chocolat (7,2). A ce pH, les bactéries sont en général bien adaptées à leur environnement. [Nebesny et al. \(2007\)](#) ont rapporté une bonne adaptation des bifidobactéries et des lactobacilles (sous forme de poudre lyophilisée) dans le chocolat noir à pH 6,8. L'incorporation de probiotiques viables, en nombre suffisant dans les aliments, représente un challenge technologique. Selon [Champagne et al. \(2005\)](#), cette incorporation se heurte à plusieurs difficultés, notamment le choix de l'aliment (nature de l'aliment, forme de présentation), la quantité de probiotiques censée apporter un effet bénéfique, la modification des propriétés organoleptiques liée à cette incorporation etc. Des voies de recherche restent cependant ouvertes. Il est de plus en plus question d'évaluer l'efficacité du probiotique au sein de la matrice alimentaire censée le contenir.

## 4. Conclusion

Ce chapitre de thèse a été consacré à la désencapsulation des bactéries immobilisées dans les billes d'alginate imprégnées et non imprégnées. Les billes imprégnées ont mieux protégé les bactéries contre l'acidité des liquides artificiels, comparées aux billes non imprégnées. Les billes imprégnées ont donc été utilisées lors de la simulation du tractus gastro-intestinal. Le modèle expérimental proposé était simple et original.

Des situations différentes de contenu gastro-intestinal ont été définies, en fonction du pH, étant entendu qu'il n'existe pas de situation de contenu idéal. Les trois situations proposées (situation à jeun, situations postérieures à un repas standard et à un repas copieux) sont une approche réaliste. Cette approche s'est basée sur des données de la physiologie digestive (pH dans le tractus digestif, durée des vidanges gastrique et intestinale). Les billes imprégnées ont été testées dans le modèle expérimental. Elles ont également été conservées dans deux types de matrices alimentaires. Le chocolat et la confiture ont été les aliments choisis.

L'approche qui a consisté à évaluer la survie des bactéries dans un modèle expérimental de tractus gastro-intestinal, et dans une matrice alimentaire, montre à quel point il est important de maintenir une quantité suffisante de bactéries au sein de l'aliment, jusqu'au moment de sa consommation. Les conditions dans le tractus gastro-intestinal, comme il a été démontré dans cette étude, sont un obstacle à la survie des bactéries. C'est pour cette raison qu'il est important de bien choisir l'aliment à compléter, afin de minimiser dès le départ d'éventuelles pertes en viabilité. Les résultats de cette étude pourraient être étendus à d'autres matrices alimentaires, afin de déterminer les applications potentielles des billes que nous avons élaborées.

# CONCLUSION GÉNÉRALE

---

## Conclusion générale

Ce travail de thèse de doctorat s'est inscrit dans une démarche de développement de méthodes d'encapsulation en vue de protéger des probiotiques contre les effets de l'acidité. Cette acidité est très souvent observée au niveau du passage gastrique. Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO/WHO, 2002). Cette définition est assez générale et montre que tout probiotique est avant tout un microorganisme. Les notions de "quantités adéquates" et "d'effet bénéfique sur la santé" se précisent de plus en plus.

Au niveau Européen, la réglementation a prévu un minimum d'au moins  $10^9$  UFC/g quel que soit le type de microorganismes (JOUE, 2004). Le bénéfice santé présumé des probiotiques a été clarifié par la récente réglementation Européenne sur les allégations nutritionnelles et de santé (JOUE, 2007). Dans cette réglementation, il est fait allusion à des notions comme l'amaigrissement, le contrôle du poids, la croissance, le développement, la diminution d'un facteur de risque de maladie humaine, les fonctions biologiques ou physiologiques de l'organisme. Il est même fait allusion à des fonctions psychologiques et comportementales. Dans ce dernier cas, il est possible de retrouver des allégations du genre "tel aliment entretient l'anorexie mentale" ou "telle substance a des effets sur la satiété".

Dans le cas des probiotiques, l'autorité Européenne de sécurité des aliments (EFSA, European Food Safety Authority) a discrédité toutes les allégations revendiquées par les produits probiotiques. Dans sa décision rendue publique en octobre 2009, l'EFSA a estimé qu'aucune information pertinente n'était disponible à ce jour sur le ou les probiotiques faisant l'objet d'allégations (caractérisations insuffisantes des souches). Les experts de l'EFSA n'ont pas réussi à établir de preuves scientifiques associées aux probiotiques pour lesquels des avantages sur la santé ont été revendiqués. Les probiotiques ont parfois été évalués dans des conditions différentes de celles rencontrées par exemple dans le tractus digestif de l'homme. Par exemple, une évaluation de la tolérance des probiotiques à la bile, sans une exposition préalable de ces microorganismes dans des conditions acides, n'est pas envisageable. Elle ne reflète pas la réalité dans le système gastro-intestinal.

Dans ce travail de thèse, trois souches bactériennes du genre *Lactobacillus* (*L. plantarum* 299v, *L. plantarum* CIPA159, *L. plantarum* 800) ont été étudiées. Des méthodes de protection de ces bactéries ont été mises au point. Les conditions de libération des bactéries protégées par encapsulation ont aussi été étudiées. Si on admet que les probiotiques doivent

## Conclusion générale

être libérés dans l'intestin, zone dans laquelle ceux-ci déploient leurs effets bénéfiques, il apparaît donc judicieux de les évaluer d'abord au niveau de l'estomac (première barrière à franchir), ensuite dans l'intestin (zone où ils sont censés se maintenir).

Dans la première partie expérimentale de ce travail de thèse (Chapitre 2), la tolérance à l'acidité des trois souches bactériennes a été évaluée. Trois liquides de composition différente ont été utilisés comme liquide gastrique artificiel (liquide à base de NaCl, MRS ou protéose-peptone à divers pH: 1,3; 1,8 et 3). Les trois souches de *L. plantarum* ont montré une sensibilité à l'acidité au contact de ces liquides. Elles n'ont pas survécu à pH 1,3 (destruction complète des bactéries en 1,5 min). Elles n'ont pas non plus survécu à pH 1,8 au-delà de 15 min. Elles ont par contre vu leurs concentrations chuter à pH 3 après 120 min d'incubation (perte comprise entre 3 et 5 log<sub>10</sub> UFC/mL). Ces observations ont été à la base de leur encapsulation.

La technique d'encapsulation par extrusion/gélification a été retenue, au détriment de la technique d'émulsification qui a été moins avantageuse. Différents matériaux d'encapsulation, principalement des polysaccharides (alginate de sodium, acide pectique, kappa-carraghénane) et des protéines (protéines de lactosérum) ont été étudiés. Les conditions d'une encapsulation réussie ont été recherchées. Pour cela, plusieurs paramètres ont été étudiés sur les dispersions aqueuses de ces biopolymères (charge électrique, turbidité, taille particulaire, concentration idéale, pH, températures de dissolution et de refroidissement etc). Seuls les polysaccharides ont été capables de gélifier en présence de calcium.

Grâce au procédé d'extrusion, la gélification a conduit à la formation de billes de tailles de l'ordre du millimètre. La taille millimétrique des billes a été un excellent compromis car elle a permis d'incorporer un maximum de bactéries dans ces billes, atteignant des concentrations bactériennes comprises entre 10<sup>9</sup> et 10<sup>10</sup> UFC par gramme de billes. L'analyse des conditions d'élaboration des billes, de même que les études de microscopie électronique à balayage (MEB) réalisées sur ces billes, ont permis de ne retenir que les billes d'alginate pour l'encapsulation des souches bactériennes.

Les protéines de lactosérum ont par la suite été utilisées comme solution d'imprégnation, afin d'optimiser les propriétés des billes d'alginate. La stabilité des protéines de lactosérum en conditions acides (étudiée par SDS-PAGE) a été la raison principale de leur

## Conclusion générale

choix. Les bactéries ont finalement été encapsulées dans des billes d'alginate dont certaines ont subi une imprégnation par des protéines de lactosérum (4%, m/v, pH 7). La lyophilisation a permis de sécher les différentes billes imprégnées et non imprégnées, afin de leur assurer une bonne conservation. La MEB a mis en évidence des différences morphologiques entre billes imprégnées et billes non imprégnées. La spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier (IRTF), réalisée sur les billes imprégnées et non imprégnées, a montré des différences spectrales. Il a été conclu sur la base des différences morphologique et spectrale que les protéines de lactosérum ont interagi avec les billes d'alginate.

Dans la deuxième partie expérimentale de ce travail de thèse (Chapitre 3), la capacité des billes à protéger les bactéries qui y ont été immobilisées a été évaluée. Ces billes ont été incubées à différents pH dans trois liquides artificiels, les mêmes qui ont été utilisés pour évaluer la tolérance à l'acidité des bactéries non encapsulées (liquide à base de NaCl, MRS ou peptone). La désencapsulation des bactéries, après incubation des billes en milieu acide, a montré une protection satisfaisante avec les billes imprégnées au terme de la durée d'incubation de 2 h, contrairement aux billes non imprégnées (protection jusqu'à 1 h d'incubation). Ce constat a été à la base du choix des billes imprégnées.

Le devenir des billes imprégnées, ainsi que les bactéries qui y ont été piégées, a été évalué à l'aide d'un modèle expérimental de simulation gastro-intestinale. L'originalité de ce dispositif expérimental a été avant tout sa simplicité. Il a permis de simuler à la fois l'estomac et l'intestin grêle. L'originalité du travail en lui-même a reposé sur les innovations apportées dans la mise en œuvre du protocole. Il a été proposé une durée d'incubation totale de 10,25 h par comparaison aux autres études qui se sont limitées à 6,5 h (Picot et Lacroix, 2004) ou à 6 h (Michida *et al.*, 2006). Il a également été proposé une modification du pH du milieu au cours des étapes de l'incubation gastrique et intestinale.

Les différents pH appliqués dans les cinq compartiments virtuels (estomac, duodénum, jéjunum, iléon et caecum) du modèle expérimental ont permis de définir trois situations de contenu gastro-intestinal. Il s'agit d'un sujet à jeun (pH 1,8-4-6-7-7), d'un sujet recevant un repas normal (pH 2,5-5,5-6,5-7,5-7,5) et d'un sujet recevant un repas copieux (pH 3-6-7-8-8). De telles situations de contenu gastro-intestinal sont normalement retrouvées chez l'homme, avec parfois des variations interindividuelles. La situation du contenu idéal ne saurait exister. Le dénombrement des bactéries dans les différents compartiments du modèle expérimental a

## Conclusion générale

permis de déterminer le compartiment dans lequel les bactéries ont été libérées, après désagrégation et dissolution des billes. Les billes ont également été conservées dans des aliments, de nature différente, afin d'évaluer l'influence de la matrice alimentaire sur la survie des bactéries. Le chocolat s'est révélé être une bonne matrice alimentaire, en terme de protection des bactéries encapsulées, comparé à la confiture.

Cette étude confirme l'utilisation de l'encapsulation comme moyen de protection des probiotiques, afin de garantir à ces microorganismes le passage de la barrière gastrique, premier obstacle à franchir avant d'atteindre l'intestin grêle. La double protection proposée dans cette étude (encapsulation suivie de l'imprégnation) est une approche nouvelle qui, au vu des résultats obtenus, s'est montrée bien prometteuse. Le protocole expérimental mis en place, qui s'est inspiré des données sur la physiologie digestive d'une part, et des résultats de l'évaluation de la vidange gastro-intestinale d'autre part, a permis d'évaluer la tolérance des souches de *L. plantarum* vis-à-vis de conditions gastro-intestinales simulées.

Dans la recherche actuelle sur les probiotiques, Il n'existe aucun substitut aux tests *in vitro*. La première condition pour qu'un microorganisme soit déclaré probiotique, en se référant à la définition donnée par le comité mixte d'experts [FAO/WHO \(2002\)](#), est sa viabilité. Le probiotique doit donc être vivant au cours du passage gastrique et durant son séjour dans l'intestin. Les tests de viabilité aux conditions gastro-intestinales sont donc d'une grande utilité, et elles le seront toujours, tant que le critère de viabilité sera celui en vigueur. Le modèle expérimental de simulation gastro-intestinale proposé dans ce travail et son application à l'étude de la viabilité des probiotiques représentent une voie de progrès dans la recherche et la mise en place d'un protocole standardisé.

En guise de perspectives pour ce travail de recherche, il serait souhaitable de conduire plusieurs études. Au plan microbiologique, il faut réaliser des tests d'adhésion sur les souches bactériennes vivantes, recueillies après la phase d'incubation totale de 10,25 h, afin d'évaluer leur bioactivité. Au plan physicochimique, il faudra élucider les interactions moléculaires entre polysaccharides/protéines, ainsi que le mécanisme de dissolution des billes dans le liquide artificiel. Au plan biogalénique, il nous faudra rechercher de nouveaux biopolymères à propriété gastrorésistante.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

## Références bibliographiques

1. Acharya KR, Stuart DI, Walker NP, Lewis M, Phillips DC. **1989**. Refined structure of baboon alpha-lactalbumin at 1.7 Å resolution. Comparison with C-type lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 208(1), 99-127.
2. Ammor MS, Mayo B. **2007**. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, 76, 138-146.
3. Ammor MS, Rachman C, Chaillou S, Prevost H, Dousset X, Zagorec et al. **2005**. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, 22, 373-382.
4. Anal AK, Singh H. **2007**. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Sciences and Technology*, 18, 240-251.
5. Andrew NC. **1999**. Disorders of iron metabolism. *New England Journal of Medicine*, 341(26), 1986-1995.
6. Annan NT, Borza AD, Hansen LT. **2008**. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, 41, 184-193.
7. Apperloo-Renkema HZ, Jagt TG, Tonk RH, Van Der Waaij D. **1993**. Healthy individual possess circulating antibodies against their indigenous faecal microflora as well as against allogeneous faecal microflora: an immunomorphometrical study. *Epidemiology and Infection*, 111, 273-285.
8. Armand M. **2008**. Digestibilité des matières grasses chez l'homme. *Sciences des Aliments*, 28(1-2), 84-98.
9. Arnaud JP, Lacroix C, Choplin L. **1992**. Effect of agitation rate on cell release rate and metabolism during continuous fermentation with entrapped growing. *Biotechnology Techniques*, 6(3), 263-270.
10. Audet P, Paquin C, Lacroix C. **1988**. Immobilized growing lactic acid bacteria with kappa-carrageenan-locust bean gum gel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29(1), 11-18.
11. Audet P, Lacroix C, Paquin C. **1991**. Continuous fermentation of a supplemented whey medium with immobilized *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *International Dairy Journal*, 2, 1-15.
12. Azaïs-Braesco V. **2007**. Les exigences des dossiers scientifiques et réglementaires. *Cahier de Nutrition Diététique*, 42(2), S87-S92.
13. Baelde D. **2008**. Actualités de la législation européenne en matière d'aliments et d'allégations santé. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 66(5-6), 296-299.
14. Baeza RI, Carrera C, Pilosof AMR, Rodriguez-Patino JM. **2006**. Adsorption and rheological properties of biopolymers at the air-water interface. *AIChE Journal*, 52(7), 2627-2638.
15. Ballongue J, Grill JP, Baratte-Euloge P. **1993**. Probiotiques, bactéries probiotiques, levains: action sur la flore intestinale de laits fermentés au *Bifidobacterium*. *Lait*, 73, 249-256.
16. Barmpalia-Davis IM, Geornaras I, Kendall PA, Sofos JN. **2008**. Differences in survival among 13 *Listeria monocytogenes* strains in a dynamic model of the stomach and small intestine. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), 5563-5567.
17. Baron JH. **1963**. Studies of basal and peak acid output with an augmented histamine test. *Gastroenterology*, 45, 188.

## Références bibliographiques

18. Bassotti G, Iantorno G, Fiorella S, Bustos-Fernandez L, Bilder CR. **1999**. Colonic motility in man: features in normal subjects and in patients with chronic idiopathic constipation. *American Journal of Gastroenterology*, 94(7), 1760-1770.
19. Baucke FGK. **1994**. Differential potentiometric cell for the restandardization of pH reference materials. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 368(1-2), 67-75.
20. Belton PS, Chilvers GR, Morris VJ, Tanner SF. **1984**. Effects of group I cations on the gelation of iota carrageenan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 6(6), 303-308.
21. Blanco-Prieto MJ, Fattal E, Puisieux F, Couvreur P. **1998**. Nouvelles approches pour l'encapsulation de peptides au sein de microsphères de PLG. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 56(6), 256-263.
22. Blandino A, Macias M, Cantero D. **1999**. Formation of calcium alginate gel capsules: influence of NaCl and CaCl<sub>2</sub> concentration on gelation kinetics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(6), 686-689.
23. Bock OAA. **1962**. The concepts of free acid and total acid of the gastric juice. *Lancet*, 2, 1101.
24. Boh B. **2007**. Développements et applications industrielles des microcapsules. In Vandamme T, Poncelet D, Subra-Paternault P. Microencapsulation. Edition Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp. 9-22.
25. Bourlioux P. **2008**. Aliments, allégations santé et médicaments. Conclusions-Recommandations. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 66, e5-e7.
26. Braccini I, Perez S. **2001**. Molecular basis of Ca<sup>2+</sup> induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2, 1089-1096.
27. Brandenberger H, Widmer F. **1998**. A new multinozzle encapsulation/immobilisation system to produce uniform beads of alginate. *Journal of Biotechnology*, 63(1), 73-80.
28. Bromley EHC, Krebs MRH, Donald AM. **2005**. Aggregation across the length-scale in  $\beta$ -lactoglobulin. *Faraday Discussions*, 128, 13-27.
29. Brownlow S, Cabral JHM, Cooper R, Flower DR, Yewdall SJ, Polikarpov I et al. **1997**. Bovine  $\beta$ -lactoglobulin at 1.8 Å resolution still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5(4), 481-495.
30. Bukowska H, Pieczul-Mroz J, Jastrzebska M, Chelstowski K, Naruszewicz M. **1998**. Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis*, 137(2), 437-438.
31. Camilleri M, Ford MJ. **1998**. Colonic sensorimotor physiology in health and its alteration in constipation and diarrhoeal disorders. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 12(4), 287-302.
32. Canaan S, Roussel A, Verger R, Cambillau C. **1999**. Gastric lipase: crystal structure and activity. *Biochimica Biophysica Acta*, 23, 197-204.
33. Carriere C, Renou C, Lopez V, de Caro J, Ferrato F, Lengsfeld H, et al. **2000**. The specific activities of human digestive lipases measured from the *in vivo* and *in vitro* lipolysis of test meals. *Gastroenterology*, 119, 949-960.
34. Casal HL, Kohler U, Mantsch HH. **1988**. Structural and conformational changes of  $\beta$ -lactoglobulin B: an infrared and spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochimica Biophysica Acta*, 957, 11-20.

## Références bibliographiques

35. Cayot P, Lorient D. **1998**. Modifications chimiques (biochimiques) de l'environnement des protéines du lait. *In* Lorient D. Structures et technofonctions des protéines du lait. Arilait Recherches, Editions Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp.159-178.
36. Cellier C, Cerf-Bensussan N, Brousse N, Marteau P. **2000**. Le système immunitaire intestinal. *In* Rampal P, Beaugerie L, Marteau P, Gorthier G. Colites infectieuses de l'adulte. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 27-39.
37. Chabance B, Marteau P, Rambaud JC *et al.* **1998**. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie*, 80, 155-165.
38. Champagne CP, Gaudy C, Poncelet D, Neufeld RJ. **1992a**. *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1429-1434.
39. Champagne CP, Gardner NG, Roy D. **2005**. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(5), 1429-1434.
40. Champagne CP, Gardner NJ. **2008**. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 41, 539-543.
41. Chandramouli V, Kailasapathy K, Peiris P, Jones M. **2004**. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 27-35.
42. Chapin KC, Lauderdale TL. **2003**. Reagents, stains and media: bacteriology. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of clinical microbiology, 8th edition. American Society for Microbiology, Washington DC, USA.
43. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. **1997**. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 1-27.
44. Chen KN, Chen MJ, Lin CW. **2006**. Optimal combination of the encapsulating materials for probiotics microcapsules and its experimental verification. *Journal of Food Engineering*, 76, 313-320.
45. Cheong SH, Park JK, Kim BS, Chang HN. **1993**. Microencapsulation of yeast cells in the calcium alginate membrane. *Biotechnology Techniques*, 7, 879-884.
46. Christiansen PM. **1967**. Measurement of gastric acidity. *Lancet*, 290(7519), 778-779.
47. Coan MH, Travis J. **1972**. Human pancreatic enzymes: properties of two minor forms of chymotrypsin. *Biochimica Biophysica Acta*, 268(1), 207-211.
48. Codex alimentarius. **2003**. Norme du codex pour le chocolat et les produits de chocolat. CODEX STAN 87, pp 1-8.
49. Codex alimentarius. **2009**. Norme du codex pour les confitures, gelées et marmelades. CODEX STAN 296, pp 1-8.
50. Comer J. **1978**. *In* Kings RD editions. Developments in food analysis techniques. pp. 197-222.
51. Cook DI, Van-Lennep EW, Roberts ML, Young JA. **1994**. Secretion of the major salivary glands. *In* Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobsen ED, Walsh JH. Physiology of the gastrointestinal tract. Raven Press, New York, pp. 1061-1118.

## Références bibliographiques

52. Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. **2005**. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 3060-3067.
53. Creamer LK, Parry DAD, Malcolm GN. **1983**. Secondary structure of bovine  $\beta$ -lactoglobulin B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 227(1), 98-105.
54. Cuillerier E, Marteau P. **2002**. Physiologie gastrointestinale de l'homme. In Roberfroid MB. *Aliments fonctionnels*. Editions Tec et Doc, Paris, pp. 21-39.
55. Cummings JH, Gibson GR, Macfarlane GT. **1989**. Quantitative estimates of fermentation in the hind gut of man. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 86, 76-82.
56. Cummings JH. **1995**. Short chain fatty acids. In Ginson GR, Macfarlane GT. *Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology*. Florida CRC Press, pp. 101-130.
57. Cynober L. **2006**. Amalgame, confusion et législation inadéquate. *Cahier de Nutrition Diététique*, 41, 65-66.
58. Cynober L. **2008**. Complément alimentaire, aliment, médicament : qui est qui ? *Cahier de Nutrition Diététique*, 43(1), 15-21.
59. de Giulio B, Orlando P, Barba G, Coppola R, de Rosa M, de Prisco PP, Nazzaro F. **2005**. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 739-746.
60. de Kruif CG, Weinbreck F, de Vries R. **2004**. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9, 340-349.
61. de Roos NM, Katan MB. **2000**. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 405-411.
62. de Vos P, de Haan BJ, Van-Schilfgaarde R. **1997**. Upscaling the production of microencapsulated pancreatic islets. *Biomaterials*, 18, 1085-1090.
63. de Vries MC, Vaughan EE, Kleerebezem M, de Vos WM. **2006**. *Lactobacillus plantarum*: survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16, 1018-1028.
64. Delboy H. **2003**. Tests non paramétriques sous Microsoft Excel. 111 p.
65. Del Piano M, Morelli L, Strozzi GP, Allesina S, Barba M, Deida F. **2006**. Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, 38, 248-255.
66. Del Piano M, Strozzi P, Barba M, Allesina S, Deida F, Lorenzini P, et al. **2008**. *In vitro* sensitivity of probiotics to human pancreatic juice. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42(3), S170-S173.
67. Dent J, Holloway RH. **1996**. Esophageal motility and reflux testing: state-of-the-art and clinical role in the twenty-first century. *Gastroenterology Clinics of North America*, 25(1), 51-73.
68. Desesso JM, Jacobson CF. **2001**. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 209-228.

## Références bibliographiques

69. Ding WK, Shah NP. **2007**. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 72(9), M446-M450.
70. Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Bornef F, Fern EB, Roberfroid MB. **1999**. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81(1), S1-S27.
71. Divies C, Lenzi P, Beaujeu J, Herault F. **1990**. Process to prepare microorganisms entrapped with dehydrated gels, gels obtained thereby, and their use for the preparation of fermented drinks. Patent: WO1990000602. 1990-01-10.
72. Doleyres Y, Fliss I, Lacroix C. **2002**. Quantitative determination of the spatial distribution of pure and mixed-strain immobilized cells in gels beads by immunofluorescence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 297-302.
73. Doleyres Y, Fliss I, Lacroix C. **2004**. Continuous production of mixed lactic starters containing probiotics using immobilized cell technology. *Biotechnology Progress*, 20, 145-150.
74. Doleyres Y, Lacroix C. **2005**. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal*, 15, 973-988.
75. Donati I, Holtan S, Morch YA, Borgogna M, Dentini M, Skjak-Braek G. **2005**. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromolecules*, 6, 1031-1040.
76. Dong Z, Wang Q, Du Y. **2006**. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. *Journal of Membrane Science*, 280, 37-44.
77. Draget KI. **2000**. Alginates. In Phillips GO, Williams PA. Handbook of hydrocolloids. CRC Press, Floride, USA, pp. 379-395.
78. Draget KI, Steinsvag K, Onsoyen E, Smidsrod O. **1998**. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>-alginate effect on Ca<sup>2+</sup> gelation. *Carbohydrate Polymers*, 35, 1-6.
79. Draget KI, Taylor C. **2009**. Chemical, Physical and biological properties of alginates and their biomedical applications. *Foods Hydrocolloids*, xxx, 1-6. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.10.007
80. Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM. **2004**. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2161-2171.
81. Ducel V, Saulnier P, Richard J, Boury F. **2005**. Plant protein-polysaccharide interactions in solutions: application of soft particle analysis and light scattering measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 41, 95-102.
82. Ducrotte P, Gourcerol G. **2005**. Motricité du colon et du rectum. *EMC-Hepato-Gastroenterologie*, 2, 177-188.
83. Erbil C, Sarac AS. **2002**. Description of the turbidity measurements near the phase transition temperature of poly(N-isopropyl acrylamide) copolymers: the effect of pH, concentration, hydrophilic and hydrophobic content on the turbidity. *European Polymer Journal*, 38, 1305-1310.
84. Fang Y, Al-Assaf S, Phillips GO, Nishinari K, Funami T, Williams PA. **2008**. Binding behaviour of calcium to polyuronates: comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*, 72, 334-341.
85. FAO/WHO. **2002**. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. In Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, pp.1-11.

## Références bibliographiques

86. Favaro-Trindade CS, Grosso CRF. **2002**. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, 19(4), 485-494.
87. Fox PF. **2003**. Milk proteins: general and historical aspects. *In*. Advanced Dairy Chemistry. Proteins. Fox PF, McSweeney PLH. Kluwer Academic editions, New York, pp 1-41.
88. FSA protocol. **2005**. An evaluation of probiotic effects in the human gut: microbial aspects. *In* Final technical report for Food Safety Agency (FSA) project ref G01022. Greenwood, United Kingdom.
89. Fuller R. **1989**. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
90. Funami T, Fang Y, Noda S, Ishihara S, Nakauma M, Draget KI et al. **2009**. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca<sup>2+</sup> binding. *Food Hydrocolloids*, 23, 1746-1755.
91. Fundueanu G, Esposito E, Mihai D, Carpov A, Desbrieres J, Rinaudo M et al. **1998**. Preparation and characterization of Ca<sup>2+</sup>-alginate microspheres by a new emulsification method. *International Journal of Pharmaceutics*, 170, 11-21.
92. Gaaloul S, Turgeon SL, Corredig M. **2009**. Influence of shearing on the physical characteristics and rheological behaviour of an aqueous whey protein isolate-kappa-carrageenan mixture. *Food Hydrocolloids*, 23, 1243-1252.
93. Gardner ML. **1994**. Absorption of intact proteins and peptides. *In* Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobsen ED, Walsh JH. Physiology of the gastrointestinal tract. Raven Press, New York, pp. 1795-1820.
94. Gbassi KG, Vandamme T, Ennahar S, Marchioni E. **2009**. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*, 129(1), 103-105.
95. Gentile FT, Doherty EJ, Rein DH, Shoichet MS, Winn SR. **1995**. Polymer science for macroencapsulation of cells for central nervous system transplantation. *Reactive Polymers*, 25, 207-227.
96. Gerhardt P. **1981**. Manual of methods for general microbiology. American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
97. Gibson GR, Roberfroid MB. **1995**. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401-1412.
98. Gilliland SE, Speck ML. **1977**. Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt. *Journal of Dairy Science*, 60(9), 1394-1398.
99. Gionchetti P, Rizello F, Helvig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P et al. **2003**. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 124, 1202-1209.
100. Goldberg I. **1994**. Functional foods, designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. Chapman and Hall, London, pp. 1-13.

## Références bibliographiques

101. Goossens D, Jonkers D, Russel M, Thijs A, Bogaard AVD, Stobberingh E et al. **2005**. Survival of the probiotic *L. plantarum* 299v and its effects on the faecal bacterial flora, with and without gastric acid inhibition. *Digestive and Liver Disease*, 37, 44-50.
102. Gössinger M, Moritz S, Hermes M, Wendelin S, Scherbichler H, Halbwirth H et al. **2009**. Effects of processing parameters on colour stability of strawberry nectar from puree. *Journal of Food Engineering*, 90, 171-178.
103. Gouin S. **2004**. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Sciences and Technology*, 15, 330-347.
104. Gournier-château N, Larpent JP, Castillanos MI, Larpent JL. **1994**. Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Editions Tec et doc, Lavoisier, Paris, pp. 1-192.
105. Graff J, Brinch K, Madsen JL. **2000**. Simplified scintigraphic methods for measuring gastrointestinal transit times. *Clinical Physiology*, 20(4), 262-266.
106. Graff S, Chaumeil JC, Boy P, Lai-Kuen R, Charrueau C. **2008**. Formulations for protecting the probiotic *Saccharomyces boulardii* from degradation in acidic condition. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(2), 266-272.
107. Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D. **1975**. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg box model. *FEBS Letters*, 32(1), 195-198.
108. Griggs MA, Johnstin R. **1926**. Preparation and colloidal properties of pectin. *Industrial and Engineering chemistry*, 18(6), 623-625.
109. Groboillot AF, Champagne CP, Darling GD, Poncelet D. **1993**. Membrane formation by interfacial crosslinking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(10), 1157-1163. .
110. Gunasekaran S, Xiao L, Ould-Eleya MM. **2006**. Whey proteins concentrate hydrogels as bioactive carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 99, 2470-2476.
111. Gunasekaran S, Ko S, Xiao L. **2007**. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Food Engineering*, 83, 31-40.
112. Hansen LT, Allan-Wojtas PM, Jin YL, Paulson AT. **2002**. Survival of Ca<sup>2+</sup>-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19, 35-45.
113. Harnsilawat T, Pongsawatmanit R, McClements DJ. **2006**. Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: a calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 577-585.
114. Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, et al. **2001**. Effect of a long term consumption of probiotic milk on infection in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *British Medical Journal*, 322, 1327-1329.
115. Hebrard G, Blanquet S, Beyssac E, Remondetto G, Subirade M, Alric M. **2006**. Use of whey protein beads as a new carrier system for recombinant yeasts in human digestive tract. *Journal of Biotechnology*, 127, 151-160.

## Références bibliographiques

116. Hersey SJ. **1994**. Gastric secretion of pepsins. *In* Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobsen ED, Walsh JH. Physiology of the gastrointestinal tract. Raven Press, New York, pp. 1227-1238.
117. Hoffmann AF. **1994a**. Biliary secretion and excretion: the hepatobiliary component of the enterohepatic circulation of bile acids. *In* Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobsen ED, Walsh JH. Physiology of the gastrointestinal tract. Raven Press, New York, pp. 1555-1576.
118. Hoffmann AF. **1994b**. Biliary secretion and excretion: the intestinal component of the enterohepatic circulation of bile acids. *In* Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobsen ED, Walsh JH. Physiology of the gastrointestinal tract. Raven Press, New York, pp. 1845-1866.
119. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis Veld JH. **1998**. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85-101.
120. Homayouni A, Azizi A, Ehsani MR, Yarmand MS, Razavi SH. **2008**. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111, 50-55.
121. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. **2002**. Variation in human intestinal microbiota with age. *Digestive and Liver Diseases*, 34, 12-18.
122. Horton B. **1998**. The whey processing industry into the 21<sup>st</sup> century. *In* whey special issue 9804. International Dairy Federation, Brussels, pp. 12-25.
123. Hovgaard L, Brondsted H. **1996**. Current applications of polysaccharide in colon targeting. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 13(3-4), 185-223.
124. Hyndman CL, Groboillot AF, Poncelet D. **1993**. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within crosslinked gelatine membranes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 56(3), 259-263.
125. Hunik JH, Tramper J. **1993**. Large-scale production of  $\kappa$ -carrageenan droplets for gel bead production: theoretical and practical limitations of size and production rate. *Biotechnology Progress*, 9, 186-192.
126. Izquierdo E, Medina M, Ennahar S, Marchioni E, Sanz Y. **2008**. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. *Current Microbiology*, 56, 613-618.
127. Jankowski T, Zielinska M, Wysakowska A. **1997**. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. *Biotechnology Techniques*, 11, 31-34.
128. Johanson ML, Nobaek S, Berggren A, Nyman M, Bjorck I. **1998**. Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v) and effect on the short-chains fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 29-38.
129. Jones O, Decker EA, McClements DJ. **2010**. Thermal analysis of  $\beta$ -lactoglobulin complexes with pectins or garrageenan for production of stable biopolymers particles. *Food Hydrocolloids*, 24, 239-248.
130. Jones PJ, Varady KA. **2008**. Are functional foods redefining nutritional requirements? *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*, 33(1), 118-123.
131. Jorgensen TE, Sletmoen M, Draget KI, Stokke BT. **2007**. Influence of oligoguluronates on alginate gelation, kinetics and polymer organization. *Biomacromolecules*, 8, 2388-2397.

## Références bibliographiques

132. JOCE. **1999**. N° L91 du 7 avril publiant la directive 1991/21/CE du 25 mars 1999 relative aux aliments diététiques à des fins médicales spéciales.
133. JOCE. **2002**. N° L183 du 12 juillet publiant la directive 2002/46/CE du 10 juin 2002 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les compléments alimentaires.
134. JOUE. **2004**. N° L370 du 17 décembre publiant le règlement 2004/2148/CE du 16 décembre 2004, portant autorisation permanente ou provisoire de certains additifs, et autorisation de nouveaux usages d'un additif déjà autorisé dans l'alimentation.
135. JOUE. **2007**. N° L12 du 18 janvier publiant le rectificatif au règlement 2006/1924/CE du 20 décembre 2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé.
136. Kearney L, Upton M, Loughli A. **1990**. Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* by immobilizing the cells in calcium alginate beads. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(10), 3112-3116.
137. Kebary KMK, Hussein SA, Badawi RM. **1998**. Improving viability of Bifidobacteria and their effect on frozen ice milk. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 26(2), 319-337.
138. Kher A, Udabage P, McKinnon I, McNaughton D, Augustin MA. **2007**. FTIR investigation of spray-dried milk protein concentrate powders. *Vibrational Spectroscopy*, 44, 375-381.
139. Khromova YL. **2006**. The effect of chlorides on alginate gelation in the presence of calcium sulfate. *Colloid Journal*, 68(1), 115-119.
140. Kim HS. **1990**. A kinetic study on calcium alginate bead formation. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 7(1), 1-6.
141. King AH. **1995**. Encapsulation of food ingredients: a review of available technology focusing on hydrocolloids. In Risch SJ, Reineccius GA. Encapsulation and controlled release of food ingredients. American Chemical Society, Washington DC, pp. 213-220.
142. Kinsella JE, Whitehead DM. **1989**. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, 33, 343-438.
143. Kitabatake N, Kinekawa YI. **1998**. Digestibility of bovine milk whey protein and bêta-lactoglobulin *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4917-4923.
144. Kleizen HH, de Putter AB, van der Beek M, Huynink SJ. **1995**. Particle concentration, size and turbidity. *Filtration and Separation*, October, 897-901.
145. Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. **2004**. Bêta-lactoglobulin: binding properties, structure and function. *Journal of Dairy Science*, 87, 785-796.
146. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. **2003**. Evaluation of encapsulation techniques of probiotic for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13, 3-13.
147. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. **2004**. The influence of coating on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14, 737-743.
148. Labas MD, Brandi RJ, Martin CA, Cassano AE. **2006**. Kinetics of bacteria inactivation employing UV radiation under clear water conditions. *Chemical Engineering Journal*, 121, 135-145.

## Références bibliographiques

149. Lacroix C, Paquin C, Arnaud JP. **1990**. Batch fermentation with entrapped growing cells of *Lactobacillus casei*. Optimisation of the rheological properties of the entrapment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(4), 403-408.
150. Lai VMF, Wong PAL, Li CY. **2000**. Effects of cation properties on sol-gel transition and gel properties of kappa carrageenan. *Journal of Food Science*, 65(8), 1332-1337.
151. Lambole L, Lacroix C, Sodini I, Lemay MJ. **2001**. Effect of inoculum composition and low KCl supplementation on the biological and rheological stability of an immobilized-cell system for mesophilic lactic starter production. *Biotechnology Progress*, 17, 1071-1078.
152. Lankaputhra WEV, Shah NP. **1995**. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cultured Dairy Products Journal*, 30(3), 2-7.
153. Lahtinen SJ, Gueimonde M, Ouwehand AC, Reinikainen JP, Salminen SJ. **2006**. Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiology*, 23, 571-577.
154. Le Roy-Boehm AL, Fessi H. **2000**. Applications pharmaceutiques du potentiel zêta: intérêt pour la caractérisation des vecteurs colloïdaux. *Journal de pharmacie de Belgique*, 55(2), 40-48.
155. Lee JS, Cha DS, Park HJ. **2004**. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7300-7305.
156. Lee KY, Heo TR. **2000**. Survival of *Bifidobacterium longum* in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and environmental microbiology*, 66(2), 869-873.
157. Leverve X. **1999**. Rôle du foie dans le métabolisme des nutriments en nutrition artificielle. *Nutrition Clinique et Métabolique*, 13, 225-31.
158. Levigne S, Thomas M, Ralet MC, Quemener B, Thibault JF. **2002**. Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins using C<sub>18</sub> column and internal standards. *Foods Hydrocolloids*, 16, 547-550.
159. Li L, Fang Y, Vreeker R, Appelqvist I. **2007**. Reexamining the egg-box model in calcium-alginate gels with X-ray diffraction. *Biomacromolecules*, 8, 464-468.
160. Li Y, Dong J, Li J, Wang D. **2004**. Stability of protein to digestion *in vitro*. *Journal of Hygiene Research*, 33(4), 433-437.
161. Lian WC, Hsiao HC, Chou CC. **2003**. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 293-301.
162. Lilly DM, Stillwell RH. **1965**. Probiotics growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748.
163. Lubran M. **1966**. Measurement of gastric acidity. *Lancet*, 288(7472), 1070-1071.
164. Luhovy BL, Akhavan T, Anderson GH. **2007**. Whey proteins in the regulation of food intake and satiety. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(6), 704S-712S.
165. Lutz R, Aserin A, Wicker L, Garti N. **2009**. Structure and physical properties of pectins with block-wise distribution of carboxylic acid groups. *Food Hydrocolloids*, 23, 786-794.

## Références bibliographiques

166. Maas AHJ, Weisberg HF, Burnett RW, Muller-Plathe O, Wimberley PD, Zijlstra WG et al. **1987**. Reference method for pH measurement in blood. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 25(4), 281.
167. Maceiras R, Alvarez E, Cancela M. **2007**. Rheological properties of fruit purees: effect of cooking. *Journal of Food Engineering*, 80, 763-769.
168. Macfarlane GT, Macfarlane S, Gibson GR. **1998**. Validation of a three stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microbial Ecology*, 35(2), 180-187.
169. Macartain P, Jacquier JC, Dawson KA. **2003**. Physical characteristics of calcium induced kappa-carrageenan networks. *Carbohydrate Polymers*, 53, 395-400.
170. Madureira AR, Pereira CI, Truszkowska K, Gomes AM, Pintado ME, Malcata FX. **2005**. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 15, 921-927.
171. Mahida YR, Rose F, Chan WC. **1997**. Antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *Gut*, 40, 161-163.
172. Mainville I, Arcand Y, Farnworth ER. **2005**. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 287-296.
173. Majaama H, Isolauri E. **1997**. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99, 179-185.
174. Malinen E, Matto J, Salmitie M, Alander M, Saarela M, Palva A. **2002**. Analysis of *Bifidobacterium* populations in human faecal samples from consumption trial with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and a galacto-oligosaccharide preparation. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 249-258.
175. Malmud LS, Fisher RS, Knight LC, Rock E. **1982**. Scintigraphic evaluation of gastric emptying. *Seminars in Nuclear Medicine*, 12(2), 116-125.
176. Mangione MR, Giacomazza D, Bulone D, Martorana V, San-Biagio PL. **2003**. Thermoreversible gelation of kappa-Carrageenan: relation between conformational transition and aggregation. *Biophysical Chemistry*, 104, 95-105.
177. Mangione MR, Giacomazza D, Bulone D, Martorana V, Cavallaro G, San-Biagio PL. **2005**.  $K^+$  and  $Na^+$  effects on the gelation of kappa-Carrageenan. *Biophysical Chemistry*, 113, 129-135.
178. Marmonier A, Teyssou R. **2002**. Bactériologie : taxonomie et autres actualités. *Revue Francophone des Laboratoires*, 343, 21-22.
179. Marteau P. **2000b**. Moyens de défense du tube digestif contre les agents infectieux. In Rampal P, Beaugerie L, Marteau P, Gortier G. Colites infectieuses de l'adulte. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 40-52.
180. Marteau P. **2000c**. *Clostridium difficile*. In Rampal P, Beaugerie L, Marteau P, Gortier G. Colites infectieuses de l'adulte. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 127-142.
181. Masco L, Ventura M, Zink R, Huys G, Swings J. **2004**. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level:

## Références bibliographiques

reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1137-1143.

182. Matsumoto T, Mashiko K. **1990**. Viscoelastic properties of alginate aqueous solutions in the presence of salts. *Biopolymers*, 29(14), 1707-1713.

183. Mattison KW, Dubin PL, Brittain LJ. **1998**. Complex formation between bovine serum albumin and strong polyelectrolytes: effects of polymer charge density. *Journal of Physical Chemistry B*, 102, 3830-3836.

184. McFarland LV. **2006**. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *American Journal of Gastroenterology*, 101(4), 812-822.

185. McKenzie HA, Ralston GB, Shaw DC. **1972**. Location of sulfhydryl and disulfide groups in bovine  $\beta$ -lactoglobulin and effects of urea. *Biochemistry*, 11, 4539-4547.

186. Mestecky J. **1998**. Organization and regulation of intestinal immunity. In Rampal P, Boquet P. Recent advances in the pathogenesis of gastrointestinal bacterial infections. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 39-45.

187. Michida H, Tamalampudi S, Pandiella SS, Webb C, Fukuda H, Kondo A. **2006**. Effect of cereals extract and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 28, 73-78.

188. Minekus M, Marteau P, Havenaar R, Huis-In't-Veld JHJ. **1995**. A multicompartamental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and the small intestine. *Alternatives to Laboratory Animals*, 23, 197-209.

189. Mitchell ME, Guiry MD. **1983**. Carrageen: a local habitation or a name. *Journal of Ethnopharmacology*, 9, 347-351.

190. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. **2006**. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. *Cryobiology*, 52, 27-32.

191. Mladenovska K, Raicki RS, Janevik EI, Ristoski T, Pavlova MJ, Kavrakovski Z, et al. **2007**. Colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid from chitosan-Ca<sup>2+</sup>-alginate microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 342, 124-136.

192. Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Schmidt S, Mueller M, Possner M et al. **2006**. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 4025-4031.

193. Molly K, Woestyne VM, Verstraete W. **1993**. Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 254-258.

194. Monaco HL, Zanotti G, Spadon P, Bolognesi M, Sawyer L, Eliopoulos EE. **1987**. Crystal structure of the trigonal form of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and its complex with retinol at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 197, 695-706.

195. Moresi M, Mancini M, Bruno M, Rancini R. **2001**. Viscoelastic properties of alginate gel by oscillatory dynamic tests. *Journal of Texture Studies*, 32(5-6), 375-396.

## Références bibliographiques

196. Morr CV, Ha EYW. **1993**. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 431-476.
197. Morris ER, Rees DA, Robinson G. **1980**. Cation-specific aggregation of carrageenan helices: domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology*, 138, 349-362.
198. MSDA, **2002**. Cacao, pâte de cacao, poudre de cacao, chocolat en poudre. In Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (MSDA), chapitre 36A.
199. Narong P, James AE. **2006**. Effect of pH on the zeta-potential and turbidity of yeast suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry and Engineering Aspects*, 274, 130-137.
200. Naruszewicz M, Johanson ML, Zapolska-Downar D, Bukowska H. **2002**. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 1249-1255.
201. NCCLS. **2000**. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 7th edition, Wayne, Pennsylvania, USA.
202. Nebesny E, Zyzelewicz D, Motyl I, Libudzist Z. **2007**. Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. *European Food Research and Technology*, 225, 33-42.
203. Nicaise P, Gleizes A, Forestier F, Queno AM, Labarre C. **1993**. Influence of intestinal bacterial flora on cytokine (IL-1, IL-6, TNF-alpha) production by mouse peritoneal macrophages. *European Cytokine Network*, 4, 133-138.
204. Nicaise P, Gleizes A, Sandre C, Kergot R, Lebrec H, Forestier F et al. **1999**. The intestinal microflora regulates cytokine production positively in spleen-derived macrophages but negatively in bone marrow-derived macrophages. *European Cytokine Network*, 10, 365-372.
205. Niedziellin K, Kordecki H, Birkenfeld B. **2001**. A controlled double-blind randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299v in patients with irritable bowel syndrome. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 13(10), 1143-1147.
206. Nobaek S, Johansson ML, Molin G, Ahrne S, Jeppsson B. **2000**. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *American Journal of Gastroenterology*, 95(5), 1231-1238.
207. Ouwehand AC, Vesterlund S. **2003**. Health aspects of probiotics. *Drugs*, 6, 573-580.
208. Pagano JC. **1998**. Nueva legislacion del MERCOSUR para leches fermentadas. *Industria Lechera*, 7(13), 8-13.
209. Panouille M, Larreta-Garde V. **2009**. Gelation behaviour of gelatin and alginate mixtures. *Food Hydrocolloids*, 23, 1074-1080.
210. Papageorgiou SK, Kouvelos EP, Favvas EP, Sapalidis AA, Romanos GE, Katsaros FK. **2010**. Metal-carboxylate interactions in metal-alginate complexes studied with FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 345, 469-473.
211. Papiz MZ, Sawyer L, Eliopoulos EE, North ACT, Findlay JBC, Sivaprasadarao R et al. **1986**. The structure of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Letters to Nature*, 342, 383-385.

## Références bibliographiques

212. Pascal G, Mareschi JP, Contor L, Antoine JM, **2008**. Démonstration scientifique des fonctions des aliments associées à la santé. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 43(1), 31-36.
213. Perez AA, Carrara CR, Sanchez CC, Santiago LG, Rodriguez-Patino JM. **2009**. Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/polysaccharide mixtures at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 23, 1253-1262.
214. Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. **2000**. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clinical Expert Allergy*, 30, 1804-1808.
215. Picot A, Lacroix C. **2004**. Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, 14, 505-515.
216. Picullel L. **1998**. Gelling polysaccharides. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 3(6), 643-650.
217. Poncelet D, Babak V, Dulieu C, Picot A. **1999**. A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 155, 171-176.
218. Poncelet D, Dreffier C, Subra-Paternault P, Vandamme T. **2007**. Introduction aux techniques de microencapsulation. In Vandamme T, Poncelet D, Subra-Paternault P. Microencapsulation. Edition Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp. 3-7.
219. Poncelet D, Dreffier C. **2007**. Les méthodes de microencapsulation de A à Z. In Vandamme T, Poncelet D, Subra-Paternault P. Microencapsulation. Edition Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp. 23-33.
220. Pongjanyakul T. **2009**. Alginate-magnesium aluminum silicate films: importance of alginate block structures. *International Journal of Pharmaceutics*, 365, 100-108.
221. Pratha V, Karlstadt R, Lynn RB, Lane JR, Hogan DL. **2001**. Gastric pH may not be an accurate indicator of gastric acidity. *American Journal of Gastroenterology*, 96(9), S66.
222. Prevost H, Divies C, Rousseau E. **1985**. Continuous yoghurt production with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* entrapped in Ca<sup>2+</sup>-alginate. *Biotechnology Letters*, 7(4), 247-252.
223. Prevost H, Divies C. **1987**. Fresh fermented cheese production with continuous pre-fermented milk by a mixed culture of mesophilic lactic streptococci entrapped in Ca<sup>2+</sup>-alginate. *Biotechnology Letters*, 9(11), 789-794.
224. Prevost H, Divies C. **1988a**. Continuous pre-fermentation of milk by entrapped yoghurt bacteria, data for optimization of the process. *Milchwissenschaft*, 43, 716-719.
225. Ralet MC, Dronnet V, Buchholt HC, Thibault JF. **2001**. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterization. *Carbohydrate Research*, 336(1), 17-25.
226. Rao SSC. **2009**. Constipation: evaluation and treatment of colonic and anorectal motility disorders. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 19(1), 117-139.
227. Rayment P, Wright P, Hoad C, Ciampi E, Haydock D, Gowland P et al. **2009**. Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality, Part 1: *In vitro* characterization. *Food Hydrocolloids*, 23, 816-822.

## Références bibliographiques

228. Renard D, Reddy T. **2007**. Polymères d'origine biologique pour la microencapsulation. *In* Vandamme T, Poncelet D, Subra-Paternault P. Microencapsulation. Edition Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp. 175-188.
229. Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. **2001**. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signalling. *Phytochemistry*, 57, 929-967.
230. Ringer-Kulka T, Palsson OS, Galanko J, Maier DM, Ringel Y. **2009**. Clinical and physiological effects of yogurt drink containing the probiotic bacteria *Bifidobacterium lactis* Bb 12 and prebiotic inulin in subjects with functional bowel symptoms. *Gastroenterology*, 136(5), A166.
231. Roberfroid MB, Bornet F, Bouley C, Cummings JH. **1995**. Colonic microflora: nutrition and health. Summary and conclusions of an international life science institute (ILSI), workshop held in Barcelona, Spain. *Nutrition Review*, 53, 127-130.
232. Roberts NB, Sheers R, Taylor WH. **2007**. Secretion of total pepsin and pepsin 1 in healthy volunteers in response to pentagastrin and to insulin-induced hypoglycaemia. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 42(5), 555-561.
233. Rochas C, Rinaudo M. **1984**. Mechanism of gel formation in kappa-carrageenan. *Biopolymers*, 23, 735-745.
234. Rombouts FM, Thibault JF. **1986**. Feruloylated pectic substances from sugar beet pulp. *Carbohydrate Research*, 154, 177-187.
235. Rose NL, Palcic MM, Shapiro AMJ, Lakey JRT. **2003**. An evaluation of the activation of endogenous pancreatic enzymes during human islet isolations. *Transplantation Proceedings*, 35, 2455-2457.
235. Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. **2000**. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197-215.
236. Saarela M, Virkajärvi I, Alakomi HL, Sigvart-Mattila P, Mätto J. **2006**. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, 16, 1477-1482.
237. Sakurai K, Oobatake M, Goto Y. **2001**. Salt-dependent monomer-dimer equilibrium of bovine beta-lactoglobulin at pH 3. *Protein Science*, 10, 2325-2335.
238. Sanders ME, Huis-Veld J. **1999**. Bringing a probiotic containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labelling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 293-315.
246. Sarett HP. **1981**. Safety of carrageenan used in foods. *The Lancet*, 317(8212), 151-152.
239. Sawyer L. **2003**. beta-lactoglobulin. *In* Fox PF, McSweeney PLH. Advanced Dairy Chemistry 1: proteins. Plenum Publishers, New York, 603 p.
240. Segarra-Newnham, M. **2007**. Probiotics for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: focus on *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii*. *The annals of pharmacotherapy*, 41(7-8), 1212-1221.
241. Seifert DB, Philips JA. **1997a**. Production of small, monodispersed alginate beads for cell immobilisation. *Biotechnology Progress*, 13, 562-568.

## Références bibliographiques

242. Sen S, Mullan MM, Parker TJ, Woolner JT, Tarry SA, Hunter JO. **2002**. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. *Digestive Diseases and Sciences*, 47(11), 2615-2620.
243. Serp D, Cantana E, Heinzen C, Stockar UV, Marison IW. **2000**. Physicochemical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(1), 41-53.
244. Shah NP. **2004**. Probiotics and prebiotics. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 15, 13-16.
245. Shah NP. **2007**. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, 1262-1277.
246. Sheu TY, Marshall RT, Heymann H. **1993**. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, 76(7), 1902-1907.
247. Shima M, Morita Y, Yamashita M, Adachi S. **2006**. Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. *Food Hydrocolloids*, 20, 1164-1169.
248. Sikorski P, Mo F, Skjak-Bræk G, Stokke BT. **2007**. Evidence for egg-box-compatible interactions in calcium-alginate gels from fiber X-ray diffraction. *Biomacromolecules*, 8, 2098-2103.
249. Simon W, Ammann D, Anker P, Oesch U, Band DM. **1984**. Ion-selective electrodes and their clinical application in the continuous ion monitoring. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 428, 279-284.
250. Singh SJ, Gibbons NJ, Blackshaw PE, Vincent M, Walker J, Perkins AC. **2006**. Gastric emptying of solids in normal children. A preliminary report. *Journal of Pediatric Surgery*, 41, 413-417.
251. Smidsrod O, Grasalden H. **1982**. Some physical properties of carrageenan in solution and gel state. *Carbohydrates Polymers: Challenges in Alginate Research*, 14, 6-13.
252. Smidsrod O, Draget KI. **1996**. Chemistry and physical properties of alginates. *Carbohydrates in Europe: Challenges*, 2, 270-272.
253. Smerdel P, Bogataj M, Zega A, Planinsek O, Mrhar A. **2008**. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. *Journal of Microencapsulation*, 25(2), 90-105.
254. Sodini I, Lagace L, Lacroix C, Corrieu G. **1998**. Effect of continuous prefermentation of milk with an immobilized cell bioreactor on fermentation kinetics and curd properties. *Journal of Dairy Science*, 81, 631-638.
255. Sohnel O, Garside J. **1992**. Basic principles precipitation and industrial applications. Butterworth-Heinemann Edition.
256. Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM et al. **2002**. Report of the adhoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1043-1052.
257. Stanford ECC. **1883**. A new substance obtained from some of the commoner species of marine algae. *Chemical News*, 47, 267-269.
258. Stanton C, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch PB et al. **2001**. Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 476-483.

## Références bibliographiques

259. Steenson LR, Klaenhammer TR, Swaisgood HE. **1987**. Calcium alginate-immobilized cultures of lactic streptococci are protected from bacteriophages. *Journal of Dairy Science*, 70(6), 1121-1127.
260. Stokke BT, Draget KI, Smidsrod O, Yuguchi Y, Urakawa H, Kajiwara K. **2000**. Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. Ca<sup>2+</sup>-alginate gels. *Macromolecules*, 33, 1853-1863.
261. Storz H, Zimmermann U, Zimmermann H, Kulicke WM. **2010**. Viscoelastic properties of ultra-high viscosity alginates. *Rheologica Acta*, 49(2), 155-167.
262. Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. **2000**. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 47-55.
263. Sun W, Griffiths MW. **2000**. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 17-25.
264. Tannock GW. **1999**. Analysis of the intestinal microflora. A renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1), 265-278.
265. Tellinghuisen J. **2008**. Isothermal titration calorimetry at very low c. *Analytical Biochemistry*, 373, 395-397.
266. Terada T, Nakanuma Y. **1995**. Expression of pancreatic enzymes ( $\alpha$ -amylase, trypsinogen, and lipase) during human liver development and maturation. *Gastroenterology*, 108(4), 1236-1245.
267. Terray M. **2000**. Le potentiel zêta et la qualité des boissons: l'exemple du brassage de la bière. *Liquide et Conditionnement*, 31(287), 19-20.
268. Thakur BR, Rakesh KS, Handa KH. **1997**. Chemistry and uses of pectin: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(1), 47-73.
269. Thanos CG, Bintz BE, Bell WJ, Qian H, Schneider PA, MacArthur DH et al. **2006**. Intraperitoneal stability of alginate-polyornithine microcapsules in rats: an FTIR and SEM analysis. *Biomaterials*, 27, 3570-3579.
270. Tobey NA, Hosseini SS, Caymaz-Bor C, Wyatt HR, Orlando GS, Orlando RC. **2001**. The role of pepsin in acid injury to oesophageal epithelium. *American Journal of Gastroenterology*, 96(11), 3062-3070.
271. Totosaus A, Montejano JG, Salazar JA, Guerrero I. **2002**. A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 589-601.
272. Tso P. **1994**. Intestinal lipid absorption. In Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobsen ED, Walsh JH. Physiology of the gastrointestinal tract. Raven Press, New York, 1867-1908.
273. Uhrinova S, Smith MH, Jameson GB, Uhrin D, Sawyer L, Barlow PN. **2000**. Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the  $\beta$ -lactoglobulin dimer. *Biochemistry*, 39, 3565-3574.
275. Vandamme T, Lenourry A, Charrueau C, Chaumeil JC. **2002**. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate Polymers*, 48(3), 219-231.

## Références bibliographiques

276. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young RJ. **1999**. *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children. *Journal of Pediatrics*, 135, 564-568.
277. Vazquez JA, Murado MA. **2008**. Mathematical tools for objective comparison of microbial cultures. Application to evaluation of 15 peptones for lactic acid bacteria productions. *Biochemical Engineering Journal*, 39, 276-287.
278. Velings NM, Mestdagh MM. **1995**. Physico-chemical properties of alginate gel beads. *Polymer Gels and Networks*, 3(3), 311-330.
279. Vergin F. **1954**. Anti und Probiotika. *Hippokrates*, 25, 16-119.
280. Verheul M, Pedersen JS, Roefs, SPFM, de Kruif KG. **1999**. Association behaviour of native bêta-lactoglobulin. *Biopolymers*, 49, 11-20.
281. Vinderola CG, Prosello W, Ghiberto TD, Reinheimer JA. **2000**. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non-probiotic microflora in Argentina fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 1905-1911.
282. Voragen AGJ, Thibault JF, Axelos MAV, Renard CMGC, Pilnik W. **1995**. Food polysaccharides and their applications. In Stephen AM. Marcel Dekker Eds, London, pp. 287-339.
283. Wang YF, Gao JY, Dubin PL. **1996**. Protein separation via polyelectrolyte coacervation: selectivity and efficiency. *Biotechnology Progress*, 12, 356-362.
284. Weinbreck F, Nieuwenhuijse H, Robijn GW, de Kruif CG. **2004**. Complexation of whey proteins with carrageenan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3550-3555.
285. Wilcox DE. **2008**. Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins: an overview of recent studies. *Inorganica Chimica Acta*, 361, 857-867.
286. Wong DWS, Camirand WM, Pavlath AE. **1996**. Structures and functionalities of milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 807-844.
287. Wullt M, Johansson MH, Odenholt I. **2003**. *Lactobacillus plantarum* 299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhoea: a double-blind placebo-controlled trial. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 35, 365-367.
288. Xu S, Liu J, Sun Z. **2008**. Optical factors determined by the T-matrix method in turbidity measurement of absolute coagulation rate constants. *Journal of Colloids and Interface Science*, 304, 107-114.
289. Xu S, Liu J, Sun Z, Zhang P. **2008**. A novel inverse method for determining the refractive indices of medium and dispersed particles simultaneously by turbidity measurement. *Journal of Colloids and Interface Science*, 326, 110-116.
290. Yoo IK, Seong GH, Chang HN, Park JK. **1996**. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 428-433.
291. Yoshioka T, Hirano R, Shioya T, Kako M. **1990**. Encapsulation of mammalian cell with chitosan-CMC capsule. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 66-72.

## Références bibliographiques

292. Yuguchi Y, Thuy TTT, Urakawa H, Kajiwara K. **2002**. Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. *Food Hydrocolloids*, 16, 515-522.
293. Yuguchi Y, Urakawa H, Kajiwara K. **2003**. Structural characteristics of carrageenan gels: various types of counter ions. *Food Hydrocolloids*, 17, 481-485.
294. Zhou Y, Martins E, Groboillot A, Champagne CP, Neufeld RJ. **1998**. Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. *Journal of Applied Microbiology*, 84(3), 342-348.
295. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Askins HR. **2004**. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *Journal of Nutrition*, 134, 465-472.

# **ANNEXES**

---

**Communications affichées à des congrès:**

Gbassi KG, Vandamme T, Ennahar S, Marchioni E. Microencapsulation of probiotic *Lactobacillus plantarum* 299v in an alginate matrix coated with whey proteins. *XV<sup>th</sup> International Workshop on Bioencapsulation, Vienne, Autriche, 6-8 Septembre 2007.*

Gbassi KG, Marchioni E, Ennahar S, Vandamme T. The use of whey proteins as coating material for improving microbial cells protection: application to probiotic *Lactobacillus plantarum* 299v. *XVI<sup>th</sup> International Workshop on Bioencapsulation, Dublin, Irlande, 4-6 Septembre 2008.*

Vandamme T, Gbassi KG, Ennahar S, Marchioni E. Controlled release of microencapsulated strains of *Lactobacillus plantarum* in a gastrointestinal tract model. *XVII<sup>th</sup> International Workshop on Bioencapsulation, Groningen, Pays-Bas, 24-26 Septembre 2009.*

**Publications:**

Gbassi KG, Vandamme T, Ennahar S, Marchioni E. **2009.** Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*, 129(1), 103-105.

Gbassi KG, Vandamme T, Yolou SF, Marchioni E. **2011.** *In vitro* effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. *International Dairy Journal*, 21, 97-102.

## Résumé de thèse

Mon travail de thèse s'est inscrit dans une démarche de développement de méthodes d'encapsulation en vue de protéger des probiotiques contre les effets de l'acidité gastrique. Divers matériaux d'encapsulation (alginate de sodium, acide pectique, kappa-carraghénane et protéines de lactosérum) ont été étudiés. La méthode d'encapsulation par extrusion/gélification dans un bain de calcium a été retenue, au détriment de la méthode par émulsification. Cette dernière s'étant montrée moins avantageuse que la première. Grâce au procédé d'extrusion, des billes ont été formées après gélification, et des bactéries ont été immobilisées dans certaines de ces billes, notamment dans les billes d'alginate. Un procédé d'imprégnation a été initié sur une partie des billes d'alginate, par immersion de celles-ci dans une solution de protéines de lactosérum. Les billes imprégnées et non imprégnées ont été lyophilisées, puis testées dans des conditions simulant un environnement gastro-intestinal et une matrice alimentaire.

Les résultats présentés dans ce travail montrent des images macroscopiques de l'ensemble des billes, des images de microscopie électronique à balayage (MEB) des bactéries encapsulées dans les billes, de même que des spectres infra rouges des billes imprégnées et non imprégnées. Les résultats ont aussi mis en évidence les effets de l'acidité, des enzymes, des sels biliaires et de la matrice alimentaire sur la survie des bactéries encapsulées.

En se basant sur les résultats de ces tests, il a été proposé la double protection des bactéries, c'est à dire leur encapsulation dans des billes d'alginate, suivie de l'imprégnation de ces billes par des protéines de lactosérum, afin de garantir le passage des bactéries au niveau gastrique. Le modèle *in vitro* de simulation gastro-intestinale proposé dans cette étude est novateur. Le dispositif expérimental est simple et facilement applicable à l'étude de la viabilité des probiotiques. Ce modèle *in vitro* peut représenter un excellent compromis pour un usage universel, afin de pallier à l'absence de modèle standard.

**Mots clefs :** Encapsulation, désencapsulation, probiotiques, biopolymères.

## Abstract

This thesis developed an encapsulation method to protect probiotics against gastric acidity effects. Various encapsulation materials (sodium alginate, pectic acid, kappa-carrageenan, whey proteins) were studied. The encapsulation method by extrusion/gelation in a calcium chloride bath was adopted, instead of the emulsification method which was less advantageous. With the extrusion process, beads were formed after gelation, and bacteria were immobilized in some of these beads, especially in alginate beads. An impregnation process was initiated on a portion of alginate beads by immersing them in a whey proteins solution. The impregnated and non-impregnated beads were freeze-dried and then subjected to tests simulating the gastro-intestinal and food environments.

The results show macroscopic photographs of all of the beads, photographs of scanning electronic microscopy (SEM) of bacteria encapsulated in the beads, and infra red spectra of the impregnated and non-impregnated beads. The results also highlighted the effects of acidity, enzymes, bile salts and food matrix on the survival of encapsulated bacteria.

Based on the results of these tests, it was suggested the double protection of bacteria, i.e. their encapsulation in alginate beads, followed by their impregnation with whey proteins, to ensure the passage of bacteria in the stomach. The *in vitro* model proposed in this study is new and worth reporting. The experimental device is simple and easily applicable to probiotics viability studies. Finally, this model may represent a compromise for universal use, to compensate the lack of standard protocol.

**Keywords:** Encapsulation, release, probiotics, biopolymers