

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée



Réf :

Mémoire de fin de cycle
En vue de l'obtention de diplôme

MASTER

Thème

Etude des critères probiotiques de deux souches lactiques, à usage avicole, et essai de leur encapsulation

Présenté par :

M^{lle}. ZIANE Dalima
M. MOGHRAOUI Rabah

Soutenu le : 19 Septembre 2021

Devant le jury composé de :

M. BOUKHALFA Farid	MCA	Président
Mme. BENDALI Farida	Pr	Encadreur
Mme. BENACHOUR Karima	MAA	Examinatrice

Année Universitaire : 2020 / 2021

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes chers parents, à mes deux grands-mères et à la mémoire de mes deux grands-pères paix à leurs âmes.

A toi ma chère tante Zahia et à la mémoire de ma tante Samira.

A mon petit frère Younes, à mes deux sœurs pour qui je souhaite bonheur et réussite.

A toute ma grande famille, grands et petits.

A tous mes amis et tous ceux qui me sont chers.

Rabah.

Je dédie ce travail accompagné d'un profond amour :

À mes très chers parents, source de vie, d'amour et d'affection, qui m'ont arrosé de tendresse et d'espoirs.

À mes très chers frères et sœurs, source de joie et de bonheur et d'humour, qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.

Merci d'être toujours là pour moi.

À mes très chers nièces et neveux (Zineddine, Riham, Eline, Anas et Sara).

À toute ma famille, mes proches et amies.

À tous ceux qui me sont chers.

Dalima.

Remerciements

Avant tout, nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné force et patience pour réaliser ce travail.

*Nous exprimons notre profonde gratitude à Mme BENDALI Farida
Pour nous avoir accompagné durant ce projet, et de nous avoir prêté aide, conseils et attention.*

Nos vifs remerciements s'adressent également à M. BOUKHALFA Farid en sa qualité de président du jury et à Mme. BENACHOUR Karima en sa qualité d'examinatrice.

*Toute notre gratitude :
Aux équipes des laboratoires de Microbiologie et de Microbiologie Appliquée.*

A tous nos enseignants qui ont contribué à notre formation tout au long de notre cursus.

Et à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

AAHP: Algerian Animal Health Product

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BSH : Bile salt hydrolase

CMI : Concentration minimale inhibitrice

EUC: Europe Union Commission

FAO: Food and Agriculture Organization

FDA: Food and Drug Administration

GRAS: Generally Recognized as Safe

MRS: de Man Rogosa Sharpe

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PI: Phase interne

TSB: Trypticase Soja Broth

Liste des figures

Figure 1. Tolérance à l'acidité gastrique des deux souches testées	20
Figure 2. Tolérance à la bile des deux souches testées	22
Figure 3. Taux d'adhésion des souches testées	23

Liste des tableaux

Tableau I. Essais réalisés pour l'encapsulation	18
Tableau II. Résultats de la sensibilité des deux souches testées aux β -lactamines	25
Tableau III. Résultats de la sensibilité des deux souches testées à différentes concentrations de l'Oxytétracycline et de l'Éurofloxacine	25

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	----------

Partie bibliographique

I. Aperçu sur les probiotiques

1. Définition des probiotiques	3
2. Critères de sélection des probiotiques	3
2.1. Critères de sécurité	3
2.1.1. Identification taxonomique et caractérisation par des techniques génotypiques et phénotypiques de la souche	3
2.1.2. Historique de non pathogénicité	3
2.2. Critères fonctionnels	4
2.2.1. Résistance aux sécrétions du tube digestif	4
2.2.2. Colonisation du tractus digestif et adhésion aux cellules intestinales	4
2.2.3. Activité antimicrobienne	4
2.3. Critères technologiques	4
3. Effets bénéfiques des probiotiques	5
3.1. Efficacité sanitaire	5
3.1.1. Effet prophylactique	5
3.1.2. Effet de détoxification	5
3.1.3. Effet sur la muqueuse intestinale	5
3.2. Efficacité zootechnique	6
4. Sensibilité des souches probiotiques : Recours à l'encapsulation	6

II. Aperçu sur l'encapsulation

1. Définition de l'encapsulation	7
2. Principe et intérêt de l'encapsulation	7
3. Applications de l'encapsulation	8
4. Techniques d'encapsulation	8
4.1. Extrusion	9
4.2. Emulsion	10
4.3. Séchage par pulvérisation	11
5. Matériaux de la matrice	11
5.1. Carraghénane	11

5.2. Cellulose	12
5.3. Pectines	12
5.4. Dextrane.....	13
5.5. Protéines du lait et du lactosérum.....	13

Partie pratique

I. Matériel et Méthodes

1. Souches utilisées	15
2. Revivification des souches et standardisation des <i>inocula</i>.....	15
3. Caractérisation des souches.....	16
3.1. Tolérance aux conditions simulées du transit gastro-intestinal du poulet de chair.....	16
3.1.1. Tolérance à l'acidité de l'estomac.....	16
3.1.2. Tolérance aux sels biliaires.....	16
3.2. Adhésion des souches sur microplaques de polystyrène	16
3.3. Résistance des souches aux antibiotiques	17
3.3.1. Antibiogramme	17
3.3.2. Méthode de micro-dilution : détermination des CMI.....	17
4. Encapsulation des souches.....	17
4.1. Denombrement des souches avant encapsulation	18
4.2. Encapsulation des souches dans l'iota carraghénane	18
4.3. Denombrement des souches après encapsulation	19
5. Analyse statistique.....	19

II. Résultats et Discussion

1. Résultat de la standardisation.....	20
2. Tolérance à l'acidité	20
3. Tolérance à la bile	21
4. Adhésion.....	23
5. Résistance aux antibiotiques	24
6. Encapsulation des souches	26
Conclusion.....	29

References bibliographiques

Introduction

Introduction

L'utilisation abusive, incontrôlée et non judicieuse des antibiotiques comme facteurs de croissance dans le secteur avicole a entraîné une augmentation du nombre de souches bactériennes pathogènes multi-résistantes (**EUC, 2005 ; Chaisatit et al., 2012; Suresh et al., 2017**), ainsi que la présence de résidus d'antimicrobiens dans les aliments (viande, lait et œufs) et l'environnement (pollution des eaux et des sols) (**Carvalho & Santos, 2016; Gonzalez Ronquillo & Angeles Hernandez, 2017**).

Cette situation a conduit en 2006 l'union européenne (**Jha et al., 2020**) et l'Algérie (**Décision ministérielle du 24 décembre 2006**) a décrété l'interdiction de l'incorporation des antibiotiques dans l'alimentation animale. Cependant, ceci a engendré des problèmes de production qui sont liés à la diminution des performances zootechniques et la rentabilité économique des élevages du poulet de chair (**Mathlouthi et al., 2012**).

Pour faire face à ces contraintes, de nouvelles stratégies ont été développées et font l'objet de nombreuses recherches dans le but de trouver de bonnes alternatives pour limiter la propagation des bactéries résistantes, et parmi ces alternatives, les probiotiques suscitent beaucoup d'intérêt (**Caly et al., 2015; Al-Fatah, 2020; Rajput et al., 2020**). En effet, la supplémentation en microorganismes probiotiques permet d'améliorer la santé animale et humaine (**Doré & Corthier, 2010; Hill et al., 2014; Varankovich et al., 2015; Riaz Rajoka et al., 2017**).

Par opposition au terme antibiotique qui signifie « contre la vie », le terme probiotique issu des termes grecs « pros » et « bios » signifiant pour la vie, fut utilisé pour la première fois par Daniel Lilly et Rosalie Stilwell (**Fuller, 1992; Lilly et al., 1965**).

Les probiotiques sont des microorganismes qui ont une action bénéfique sur l'hôte par stimulation des mécanismes biologiques naturels, qui contribuent au maintien de l'équilibre de la microflore intestinale et sa stabilisation et l'exclusion compétitive qui permet de lutter contre les bactéries pathogènes (**Tavakoli et al., 2017; Mehdi et al., 2018; Wu et al., 2018**).

Chez la volaille, les préparations probiotiques peuvent être composées d'une seule souche ou d'un mélange de deux ou plusieurs espèces (**Barrow, 1992; Alagawany et al., 2018**). Leurs effets bénéfiques sur la santé des poulets de chair sont l'amélioration des performances zootechniques (gain de poids, coefficient de digestibilité) (**Mehdi et al., 2018; Djezzar et al., 2019; Zaghari et al., 2020b**) ainsi que des effets sanitaires (diminution des diarrhées et de morbidité) (**Jayaraman et al., 2013; Wang et al., 2017**).

La législation restreint de plus en plus strictement l'utilisation des microorganismes probiotiques comme additifs alimentaires, elle impose l'identification, la sécurité et l'efficacité de la souche (**Pot & Grangette, 2015**).

Il existe plusieurs espèces de microorganismes utilisées en tant que probiotiques dans l'alimentation avicole (**Khalique et al., 2020**), principalement des bactéries lactiques (**Reuben et al., 2019; Salehizadeh et al., 2019**). Elles constituent un groupe de microorganismes à Gram positif, catalase négative et non pathogènes, ont généralement le statut de sécurité (*GRAS*) reconnu par la « *Food and Drug Administration* ». Elles sont dotées d'un pouvoir de fermentation des sucres en acide lactique qui est utilisé dans la conservation des aliments (**Salari et al., 2015 ; Adesulu-Dahunsi et al., 2018**) à côté d'un haut pouvoir de modulation du microbiote intestinal (**Peng et al., 2016; Riaz Rajoka et al., 2017; Abaidullah et al., 2019**).

Plusieurs études ont montré que les bactéries à potentiel probiotique subissent des pertes lorsqu'elles sont incorporées dans un aliment (pression intensive, température élevée, pH, oxygène...) (**Tripathi & Giri, 2014**), ainsi qu'après ingestion qui sont dues aux conditions environnementales défavorables (**de Vos et al., 2010; Aziz et al., 2019**). Pour cela et afin d'assurer leur viabilité maximale et leur protection, l'encapsulation s'avère très efficace (**de Vos et al., 2010; Yazhini et al., 2018**).

En effet, pour avoir l'effet bénéfique souhaité des probiotiques et avoir la capacité de maintenir leur activité métabolique dans le tractus intestinal, l'encapsulation est l'un des moyens pour assurer leur protection contre les conditions défavorables. Ceci implique l'utilisation de techniques douces et non agressives pour la cellule vivante faisant intervenir des matériaux inertes qui présentent une garantie de non toxicité (**Rodrigues et al., 2020**).

Ce présent travail a pour objectif de caractériser deux souches de bactéries lactiques *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus acidilactici* et de les encapsuler dans une matrice adéquate en déterminant les paramètres idéals.

Ce document comporte une partie bibliographique relative aux probiotiques et à l'encapsulation, suivie d'une partie pratique relatant les méthodes adoptées dans ce travail et les résultats auxquels elles ont abouti. Ces derniers après discussion, ont enfin conduit à une conclusion récapitulant les aboutissements de ce travail et les perspectives envisagées.

Partie bibliographique

1. Définition des probiotiques

Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés, en quantité adéquate, confèrent un effet bénéfique pour la santé de l'hôte (FAO/OMS, 2002; Hill et al., 2014). Toutefois, de nouvelles études ont montré que des microorganismes génétiquement générés et des microorganismes non vivants peuvent également apporter des bénéfices physiologiques (Ouwehand & Salminen, 1998; Sanders, 2003).

De nombreuses espèces microbiennes à potentiel probiotique ont été autorisées et utilisées en alimentation avicole dans le but de maintenir un système digestif sain. Ces microorganismes appartiennent aux bactéries des genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, de l'espèce *Escherichia coli* et d'autres sont des levures du genre *Sacharomyces* (Caly et al., 2015; Bernasrdeau et al., 2017; Osman et al., 2020; Ramlucken et al., 2020).

2. Critères de sélection des probiotiques

Les microorganismes probiotiques doivent répondre à un certain nombre de critères rigoureux de sélection, afin d'atteindre d'une part leur site d'action, et d'autre part d'agir et d'exercer leurs bienfaits dans l'endroit ciblé (Shewale et al., 2014; Fesseha, 2019).

Ces critères sont répartis en 3 catégories à savoir :

2.1. Critères de sécurité

2.1.1. Identification taxonomique et caractérisation par des techniques génotypiques et phénotypiques de la souche

Les microorganismes doivent être en premier lieu parfaitement identifiés taxonomiquement, cette identification se fait par des techniques moléculaires fiables, soit par hybridation ADN-ADN, ou par le séquençage de l'ADN codant pour l'ARN 16S ribosomal, des tests phénotypiques sont combinés avec ces techniques pour mieux confirmer la possibilité de leur utilisation (FAO/OMS, 2002 ; Binda et al., 2020).

2.1.2. Historique de non pathogénicité

Les microorganismes doivent être dénués de toute pathogénicité, et ne pas être porteurs ou en mesure d'acquérir facilement des gènes de résistance aux antibiotiques, la

vérification de la non pathogénicité de la souche est nécessaire, surtout si cette dernière ne fait pas partie du microbiote intestinal de l'hôte (FAO/OMS, 2002).

2.2. Critères fonctionnels

2.2.1. Résistance aux sécrétions du tube digestif

La définition actuelle des probiotiques insiste sur le paramètre de viabilité, les microorganismes à potentiel probiotique doivent franchir les obstacles majeurs du transit digestif et parvenir vivants au site de leur action qui est l'intestin (González-Rodríguez et al., 2013; Sgheddu et al., 2019), il faut donc qu'ils résistent au pH acide de l'estomac des poulets de chair, où le pH varie entre 4,33-4,40 dans le proventricule et 2,46-2,79 au niveau du gésier (Farner, 1942) et ils doivent aussi résister aux effets bactéricides des sels biliaires 0,5-3 % qui sont exercés par l'augmentation de la perméabilité membranaire grâce à leur action détergente, et aux sucs pancréatiques et aux enzymes digestives (Thomas et al., 2001; González-Rodríguez et al., 2013).

2.2.2. Colonisation du tractus digestif et adhésion aux cellules intestinales

Pour une bonne colonisation du tube digestif, il est nécessaire que les souches probiotiques puissent adhérer aux cellules de la paroi intestinale, afin d'assurer la colonisation de façon permanente, elles doivent être administrées en continu ou semi continu et à forte dose (Reuben et al., 2019).

2.2.3. Activité antimicrobienne

En plus de l'amélioration de la digestibilité de la ration alimentaire qui est l'un des rôles des probiotiques, ils doivent aussi maintenir de bonnes conditions sanitaires. Il est nécessaire que les microorganismes à potentiel probiotique soient capables d'inhiber le développement des microorganismes pathogènes (Shokryazdan et al., 2017).

2.3. Critères technologiques

La souche probiotique doit arriver à son site d'activité digestive dans sa forme viable et en nombre suffisant. Cela nécessite sa survie pendant le traitement des aliments y compris la granulation par la chaleur (qui porte la température au-dessus de 80°C), tout en conservant ses propriétés biologiques au cours du procédé de fabrication, ainsi que sa stabilité pendant l'entreposage. Les souches probiotiques les plus stables sont celles qui appartiennent au genre *Bacillus*, car leurs spores sont résistantes à la chaleur et restent viables pendant le stockage à long terme (Simon, 2005).

3. Effets bénéfiques des probiotiques

3.1. Efficacité sanitaire

3.1.1. Effet prophylactique

Les agents pathogènes peuvent négativement affecter l'équilibre de l'intestin du poulet et par conséquent sa santé, et parmi ces microorganismes fréquemment responsables d'infections chez le poulet nous avons, *Salmonella* sp., *Compylobacter* sp., et *E. coli* (Smialek et al., 2018 ; Redweik et al., 2020). Les probiotiques peuvent utiliser divers mécanismes pour l'inhibition de tous les microorganismes pathogènes dont la production d'acides organiques et de bactériocines (Schoster et al., 2013).

De nombreuses études confirment les effets protecteurs des souches probiotiques. Il a été rapporté que *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055) inhibe l'adhésion et l'invasion de *Compylobacter jejuni* chez les poussins aux premiers stades de leurs croissance (Nishiyama et al., 2014) et l'ingestion de la souche *Butyricoccus pullicaecorum* à des poussins d'un jour réduit les agents pathogènes : *Enterococcus*, *Escherichia* et *Shigella* spp. dans l'iléon au 40^{ème} jour d'élevage (Eeckhaut et al., 2016). De même, la mortalité fut diminuée chez les poussins qui ont été traités avec *Bacillus subtilis* DSM 32315 (1×10^6 UFC/g d'aliment) par rapport aux poussins non traités en atténuant les effets négatifs de l'agent pathogène *Clostridium perfringens* (Bortoluzzi et al., 2019).

3.1.2. Effet de détoxification

Les probiotiques ont la capacité de produire des métabolites susceptibles de neutraliser certaines toxines (Khan & Naz, 2013), et aussi une orientation de la microflore intestinale pour réduire l'absorption des substances toxiques (ammoniac, amine et indoles), ainsi que la diminution de la biotransformation des sels biliaires et des acides gras en produits toxiques (Jones et al., 2013; Horáčková et al., 2017).

3.1.3. Effet sur la muqueuse intestinale

La production des toxines par des agents pathogènes peut altérer la perméabilité intestinale, qui favorise un transfert d'antigènes y compris la microflore locale ce qui engendre des réponses immunitaires inappropriées. Par une exclusion compétitive, les probiotiques empêchent les agents pathogènes de se lier aux cellules épithéliales de l'intestin, cette inhibition se fait soit par une adhésion des probiotiques aux récepteurs des

cellules de la lumière intestinale soit en stimulant la sécrétion des mucines (MUC2 et MUC3) (Khan & Naz, 2013).

L'administration de *Bacillus coagulans* à des poussins atteints d'entérite nécrotique causé par l'agent pathogène *Clostridium perfringens*, a réduit l'inflammation intestinale, par rapport au lot témoin (Wu et al., 2018).

3.2. Efficacité zootechnique

L'utilisation des probiotiques chez l'animal a pour objectif d'améliorer ses performances zootechniques (de croissance et de production), souvent par l'amélioration de la prise de poids, de l'indice de consommation (IC) et par diminution de la mortalité.

La supplémentation alimentaire en *Bacillus licheniformis* (1×10^9 UFC/g d'aliment) à des poussins d'un jour améliorerait le gain de poids (Zaghari et al., 2020). Cet effet serait le résultat d'une amélioration de la digestibilité de la ration alimentaire, par production d'enzymes digestives et de vitamines par les probiotiques (Zhang et al., 2016). Il a été rapporté que l'emploi d'un mélange de bactéries qui appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium* et de levures, améliora le taux de conversion des aliments chez le poulet de chair par rapport au groupe témoin (Patel et al., 2015).

4. Sensibilité des souches probiotiques : Recours à l'encapsulation

Le maintien des bactéries probiotiques dans un état viable et fonctionnel jusqu'à leur site d'action dans le tube digestif est primordial à cause de leur sensibilité aux conditions délétères à leur survie rencontrées tout au long de leur passage dans le tractus gastro-intestinal et lors de leur incorporation dans les aliments. L'encapsulation est une technique développée qui peut répondre à ces contraintes, qui assure la protection des cellules bactériennes contre le stress rencontré lors de la digestion ainsi que lors des procédés de transformation des aliments (température, pH, oxygène..) (Rodrigues et al., 2020).

1. Définition de l'encapsulation

L'encapsulation consiste en des procédés physicochimique et mécanique d'enrobage des composés sensibles (solides, gazeux ou liquides) par une couche de matériel limitant leur exposition directe aux facteurs néfastes de l'environnement (**Shahidi & Han, 1993**). En microbiologie, elle se définit comme le processus de piégeage des cellules de micro-organismes en les recouvrant d'un ou de plusieurs hydrocolloïdes appropriés afin de séparer les cellules du milieu environnant (**Mortazavian et al., 2007**).

Les matériaux de la matrice d'encapsulation peuvent être des polymères, des hydrates de carbone, des graisses ou des cires, le choix est en fonction du noyau à enrober (**Chavarri et al., 2012**). Ces capsules, dont la taille varie d'un micron à sept millimètres, libèrent leur contenu ultérieurement par des moyens adaptés à l'application. Les ingrédients à enrober sont appelés noyau, phase interne (PI), ou encapsulât, tandis que les termes appliqués à l'enrobage des microcapsules comprennent la paroi, l'enveloppe, la phase externe ou la membrane (**Saraf et al., 2007**).

La libération des noyaux/cellules se fait par l'intervention de différents agents tel que le changement de pH, les tensions mécaniques, la température, l'activité enzymatique, la pression osmotique, la diffusion de l'humidité à travers la capsule, la présence de certains composés chimiques et la durée de stockage (**Mortazavian et al., 2007**).

2. Principe et intérêt de l'encapsulation

La matrice sert de protection aux cellules vis-à-vis des contraintes mécaniques et conditions défavorables de l'environnement extérieur en fournissant un microenvironnement défini, constant et protecteur (**McLoughlin, 1994**). Parmi ces conditions nuisibles on peut citer : l'acidité élevée et le faible pH (**Sun & Griffiths, 2000**), les sels biliaires (**Lee & Heo, 2000**), les chocs froids induits par les conditions de traitement telles que la congélation et la lyophilisation (**Shah et al., 2000**), l'oxygène moléculaire dans le cas des micro-organismes anaérobies obligatoires (**Sunohara et al., 1995**), les chocs thermiques provoqués par les conditions de traitement telles que le séchage par pulvérisation, les bactériophages (**Stenson et al., 1987**) et les agents antimicrobiens chimiques (**Sultana et al., 2000**).

Cette technique est très avantageuse, elle permet : d'empêcher les noyaux d'interagir avec d'autres composés (surtout en cas d'utilisation dans les aliments), améliorer

leur manipulation, libération de la phase interne active d'une manière contrôlée ou ciblée (Saraf et al., 2007) et prolongation de la durée de conservation des micro-organismes notamment les levures (Chandralekha et al., 2016).

3. Applications de l'encapsulation

La micro-encapsulation en général est très prometteuse en médecine, en biotechnologie (Orive et al., 2004) et en industries pharmaceutique et alimentaire (Peanparkdee et al., 2016). Les principaux domaines où les micro-organismes rentrent en jeu sont : l'agriculture (John et al., 2011), la biotechnologie alimentaire (par la promotion de la production de produits laitiers tels que le yaourt, le fromage et les produits laitiers congelés, ainsi que la production de biomasse) (Krasaekoopt et al., 2003), et la production de probiotiques résistants (Chan & Zhang, 2002). De nombreuses études ont montré que la micro-encapsulation est une alternative pour les probiotiques afin d'assurer leurs stabilité, viabilité, absence de prolifération dans les aliments et, en outre, libération contrôlée dans l'intestin (Favaro-Trindade et al., 2011).

4. Techniques d'encapsulation

Plusieurs techniques sont mêlées dans l'encapsulation des microorganismes, le choix de la technique est conditionné par une multitude de paramètres dont : la fonctionnalité du noyau encapsulé dans le produit final, le type de l'agent d'encapsulation, la stabilité dans les conditions de traitement, le mécanisme de libération de la phase interne, la concentration optimale du bioactif dans les microcapsules, la taille et la densité des capsules, la stabilité au stockage et le coût de production (Desai & Park, 2005).

Pour maintenir la viabilité des cellules, les probiotiques sont généralement encapsulés par extrusion, émulsion ou séchage par pulvérisation. Par ces techniques, les bactéries sont piégées dans la matrice de gel en utilisant différents mécanismes de formation (Champagne & Fustier, 2007). Les conditions de mise en œuvre de la technologie sont conçues pour maintenir la viabilité des cellules, et les solvants utilisés dans la technologie d'encapsulation doivent être non toxiques (Gbassi & Vandamme, 2012).

Stummer et al. (2012) ont procédé à l'encapsulation par la technique du lit fluidisé d'*Enterococcus faecium* M74 en utilisant la cellulose microcristalline comme matériau d'encapsulation. Les particules obtenues ont présenté d'excellentes propriétés physiques, telles que la fluidité et une bonne manipulation. L'alginate et le carbonate de calcium,

comme agents d'encapsulation et de solidification, respectivement, ont été employés par **Holkem et al. (2016)** pour encapsuler *Bifidobacterium* BB-12. Les particules obtenues ont été efficaces pour protéger le probiotique exposé à des jus gastriques et entériques simulés et a amélioré la stabilité et la survie de la bactérie pendant un stockage de 60 jours à 25°C. Des capsules produites par extrusion ont eu un effet protecteur sur la viabilité cellulaire des souches probiotiques de *Lactobacillus casei* 01 et BGP 93 encapsulées avec l'alginate combiné à des polysaccharides naturels pendant 15 jours de stockage réfrigéré. En outre, les particules probiotiques extrudées avec des composés prébiotiques ont augmenté la résistance des micro-organismes à la fois à un pH acide et aux sels biliaires (**Rodrigues et al., 2017**).

Le chitosan a été utilisé comme matériau d'enrobage de *Bifidobacterium longum* DD98. L'enrobage avec du chitosan a amélioré la survie du probiotique encapsulé dans le liquide gastro-intestinal et en présence de température élevée. De plus, l'encapsulation de *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 et *Lactobacillus casei* ATCC 334 dans l'alginate-chitosan par la technique d'extrusion a fourni une efficacité d'encapsulation supérieure à 76%, et les deux bactéries ont été protégées dans des conditions gastro-intestinales simulées (**Farias et al., 2019; Ji et al., 2019; Rodrigues et al., 2020**).

4.1. Extrusion

Une technique aussi répandue qu'ancienne pour la production de probiotiques (**King, 1995**). La méthode comprend : la préparation de la solution hydrocolloïde (Alginate plus couramment) et ajout de cellules probiotiques dans la solution hydrocolloïde pour former une suspension cellulaire. Cette suspension de cellules passe à travers l'aiguille d'une seringue pour former des gouttelettes qui sont directement coulées dans la solution durcissante contenant des cations comme le calcium. Lorsque les gouttelettes entrent en contact avec la solution durcissante, les polymères d'alginate entourent le noyau pour former une structure en réseau tridimensionnelle par réticulation avec les ions du calcium (**Solanki et al., 2013**).

Le diamètre des capsules est affecté par la concentration et la viscosité de la solution d'alginate, la distance entre la seringue et la solution durcissante, et le diamètre de l'orifice de l'aiguille (**Jankowski et al., 1997**). La taille diminue avec l'augmentation de la concentration et de la viscosité de la solution d'encapsulation et ce en utilisant l'alginate à faible teneur en acide glucuronique (**Smidsrød & Skjåk-Bræk, 1990**). Le diamètre des

billes formées par cette méthode varie entre 2 et 5 mm, il est relativement plus important en comparaison avec la technique d'émulsion (Solanki et al., 2013).

Cette technique est connue pour être très avantageuse de par le pouvoir de contrôler les conditions de formation des capsules (telles que la température, la vitesse et la forme de conception, et la teneur en humidité), le haut débit de production, le mode de fonctionnement continu, et le fait qu'elle soit très économique (Abbas et al., 2012).

Néanmoins, la méthode d'extrusion connaît quelques inconvénients et limites dont : les imperfections structurelles (Augustin & Hemar, 2009), l'adhésivité de la surface des matériaux extrudés (Adhikari et al., 2002), le fait que l'efficacité de piégeage des agents bioactifs liquides est inférieure à celle des agents solides, et la dégradation des ingrédients bioactifs due à une température plus élevée et aux forces de cisaillement (Abbas et al., 2012).

A l'aide de la technique d'extrusion, Haghshenas et al. (2015) ont encapsulé *Lactobacillus plantarum* 15HN en utilisant le polymère d'alginate. Pour produire des capsules, la solution a été extrudée à travers une buse de calibre 21 dans une solution stérile de chlorure de calcium.

4. 2. Emulsion

Dans cette technique, les cellules bactériennes et la suspension de polymères sont extrudées à travers une aiguille ou une buse, générant ainsi des gouttelettes sphériques qui tombent dans une solution durcissante. L'émulsion implique la dispersion d'une phase aqueuse contenant les cellules bactériennes et la suspension de polymère dans une phase organique, comme les huiles végétales telles que l'huile de soja, huile de tournesol, huile de canola ou huile de maïs (Krasaekoopt et al., 2003), ce qui donne une émulsion eau dans l'huile. Les gouttelettes aqueuses dispersées sont durcies par refroidissement ou par addition d'un agent gélifiant ou d'un agent de réticulation dans le cas des gels de polyacrylamide. Après gélification, les perles sont réparties dans l'eau et lavées pour éliminer l'huile. Il en résulte des billes de plus petit diamètre qui varie entre 25 µm et 2 mm (Krasaekoopt et al., 2003), qui convient mieux aux applications. Cependant, l'huile résiduelle dans les capsules peut être un problème lors de la conception des produits alimentaires probiotiques à faible teneur en matières grasses (Kailasapathy, 2002). Par simple émulsion, Pandey et al. (2016) ont encapsulé *Lactobacillus plantarum* 299v en utilisant du xanthane dans la phase aqueuse, et de l'huile de tournesol dans la phase

lipidique. L'encapsulation a amélioré la viabilité des cellules pendant le stockage et a été jugée appropriée pour une libération contrôlée des agents probiotiques encapsulés.

4.3. Séchage par pulvérisation

Dans le procédé de séchage par pulvérisation, un mélange liquide est atomisé dans un récipient avec une buse à un seul fluide, à deux fluides ou une roue tournante (selon le type de sécheur par pulvérisation utilisé). Le solvant est ensuite évaporé par contact avec de l'air chaud ou un autre gaz. Il en résulte une exposition des cellules à des températures élevées et à des stress osmotiques dus à la déshydratation (**Chavarri et al., 2012**), ce qui ne la rend pas si utile pour la production industrielle de probiotiques encapsulés à usage alimentaire, en raison du faible taux de survie des bactéries pendant le séchage et de leur faible stabilité lors du stockage. Bien qu'elle soit une technique couramment utilisée pour la production d'ingrédients alimentaires (par exemple les arômes alimentaires) car il s'agit d'une technique bien établie et adaptée aux applications industrielles à grande échelle (**Chavarri et al., 2012**).

5. Matériaux de la matrice

De nombreux matériaux peuvent être utilisés pour construire la capsule, en fonction de l'application et des caractéristiques requises. Le choix du matériau et de la technique d'encapsulation a un impact sur les propriétés de la capsule, telles que la rigidité, la perméabilité et la stabilité chimique. Les matériaux de la matrice doivent : former des capsules dans des conditions suffisamment douces pour conserver la viabilité cellulaire, être robuste mécaniquement et avoir un minimum de propriétés hydrophiles avec une bonne perméabilité permettant le transport des nutriments et métabolites de petite masse moléculaire à travers la matrice (**Uludag et al., 2000**).

5.1. Carraghénane

Généralement utilisé comme additif alimentaire, le k-carraghénane est un polysaccharide naturel extrait d'algues marines. A des concentrations allant de 2 % à 5 %, ce polymère nécessite des températures élevées de 60-80°C pour le dissoudre (**Krasaekoopt et al., 2003**). La suspension cellulaire des probiotiques est ajoutée à la solution stérilisée et refroidie à 40-45°C de ce polymère. Ce refroidissement à température ambiante entraîne sa gélatinisation. L'ajout d'ions de potassium sous forme de KCl conduit à la formation des billes du gel. Néanmoins il a été rapporté que le KCl peut avoir un effet inhibiteur sur certaines bactéries lactiques notamment *Streptococcus thermophilus* et

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus*. L'utilisation d'autres ions monovalents tels que Rb^+ , Cs^+ et NH_4^+ a été recommandée. Un mélange de k-carraghénane et de la gomme de caroube est courant dans la fermentation lactique en raison de sa moindre sensibilité aux acides organiques ; ce mélange a été largement utilisé pour la microencapsulation de probiotiques dans des produits fermentés (Audet et al., 1988; Arnaud et al., 1992; Krasaekoopt et al., 2003; Mortazavian et al., 2007). Afzaal et al. (2019) ont rapporté la production de crème glacée avec *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 libre et microencapsulé en utilisant du carraghénane comme matériau de matrice. L'encapsulation a amélioré la survie du probiotique encapsulé dans la crème glacée par rapport aux cellules non encapsulées lors du stockage au froid et du passage dans le tractus gastro-intestinal simulé.

5.2. Cellulose

Le polymère utilisé est l'acétate phtalate de cellulose (APC) : les groupes phtalates ionisables rendent ce polymère insoluble dans les milieux acides à un pH inférieur ou égale à 5 et soluble lorsque le pH est augmenté à 6 ou plus. L'APC est physiologiquement inerte, il a été auparavant administré *in vivo* et a largement été utilisé comme matériau d'enrobage entérique pour la libération de médicaments et d'autres substances pharmaceutiques dans l'intestin (Krasaekoopt et al., 2003). La propriété de solubilité citée, est importante, et donne à ce polysaccharide un avantage pour l'encapsulation des probiotiques, car ces derniers une fois encapsulés ne doivent pas se libérer dans l'estomac mais seulement dans l'intestin. Les capsules formées par ce polymère sont produites exclusivement par la technique d'émulsion (Solanki et al., 2013). En utilisant de la gomme de gellane, des protéines de lactosérum et de l'acétate phtalate de cellulose, l'encapsulation de *Lactobacillus casei* BNCC 134415 dans des conditions de lyophilisation a amélioré la viabilité de la souche pendant le stockage au froid, la pasteurisation et sous un liquide gastro-intestinal simulé (Li et al., 2019).

5.3. Pectines

Connues comme émulsifiants dans l'industrie alimentaire, les pectines sont des polysaccharides de la paroi des fruits et légumes, utilisées aussi comme gélifiants ou agents stabilisants (Ridley et al., 2001; Gullón et al., 2013). Grâce aux capacités de gélification et d'émulsion des préparations à base de pectines, elles représentent les matrices idéales pour l'encapsulation des cellules bactériennes destinées à être délivrées dans le côlon (Naqash et al., 2017). Les propriétés fonctionnelles et la bioactivité des

pectines et des oligosaccharides pectiques sont influencées par leurs caractéristiques physico-chimiques et structurales (Naqash et al., 2017). Des études *in vitro* ont indiqué que les pectines à haute teneur en méthoxyl pectines favorisent la survie des lactobacilles probiotiques exposés à la bile, et plusieurs autres études ont utilisé des matrices contenant des pectines pour l'encapsulation de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* afin de promouvoir la viabilité bactérienne dans les conditions intestinales (Pak et al., 2013; Larsen et al., 2018). Raddatz et al. (2020) ont réussi à encapsuler *Lactobacillus acidophilus* LA-5 dans des mélanges à base de pectine et d'inuline. Les capsules obtenues ont protégé la souche vis-à-vis des conditions gastro-intestinales simulées. L'efficacité de l'encapsulation a atteint des taux supérieurs à 90% et les bactéries sont restées vivantes pendant un stockage de 120 jours à 25°C.

5.4. Dextrane

C'est un polysaccharide soufré (contient environ 16 à 19 % de soufre), ramifié avec des liaisons glycosidiques 1-6 et 1-4, largement utilisé dans les domaines de l'alimentation et de l'industrie pharmaceutique. Il est connu pour ses caractéristiques anioniques, biocompatibles et biodégradables largement étudiés (Anitha et al., 2011; Yucel Falco et al., 2017). L'effet protecteur des matrices du chitosan- dextrane-sulfate sur *Saccharomyces boulardii* vis-à-vis du pH acide a été rapporté. Les fortes interactions électrostatiques entre les couches des deux polymères a conduit à une structure dense qui a permis de protéger les cellules de la levure (Shori, 2017).

5.5. Protéines du lait et du lactosérum

Les matrices protéiques ont des propriétés de libération cellulaire différentes à celles des autres matrices d'encapsulation à base de polymères ou de graisses. Leur utilisation est aussi étendue, servant à la protection et la stabilité des aliments pendant les processus de fabrication et le stockage respectivement (Reid et al., 2007). Grâce à leurs propriétés structurales et physicochimiques, et en raison de leur biocompatibilité, les protéines du lait sont de bons véhicules naturels des cellules probiotiques, elles sont courantes pour être utilisées comme système d'administration (Livney, 2010). En parallèle, les protéines du lactosérum ne manquent pas de potentiel pour l'enrobage, de par leur nature entièrement biodégradable et leur utilisation fréquente dans de nombreux types de produits alimentaires. En revanche, la chaleur est un facteur limitant lorsqu'il s'agit de protéines, qui sont facilement dénaturées par les hautes températures, ce qui affecte l'agrégation et réduit la stabilité de l'émulsion (Solanki et al., 2013). Des micelles de

caséine en conjonction avec du lactosérum utilisées comme matrice par **Burgain et al. (2013)** pour encapsuler *Lactobacillus rhamnosus* GG a montré des résultats prometteurs en termes de survie allant jusqu'à environ 99 %.

Partie pratique

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie -1- (Bloc 9) et le laboratoire de Recherche en Microbiologie Appliquée (LMA) de l'université de Bejaia.

1. Souches utilisées

Deux souches de bactéries lactiques ont fait l'objet de cette étude : *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus acidilactici*. Elles font partie de la collection des souches du laboratoire de Microbiologie Appliquée (équipe : Interactions Microbiennes, Biofilms et Probiotiques). Les souches ont été congelées à -80°C dans du bouillon MRS (de Man Rogosa et Sharpe, Merck, Allemagne) additionné de 15 % de glycérol (Sigma-Aldrich, Allemagne).

2. Revivification des souches et standardisation des *inocula*

Les souches conservées à une température de -80°C sont d'abord revivifiées par inoculation de 1 ml de la culture bactérienne dans 5 ml de bouillon MRS (Pronadisa, Espagne), suivie d'une incubation à 37°C/24 h. Cette étape est répétée trois fois pour une bonne revivification des souches. Par la suite, les souches sont ensemencées en stries sur gélose MRS (Biokar, France) et incubées à 37°C/72 h. Enfin, pour avoir une culture fraîche, quatre (04) colonies isolées de tailles identiques sont transférées à nouveau dans 9 ml de bouillon MRS et incubées à 37°C/18 h. Afin de travailler avec le même *inoculum* tout au long de cette étude, un dénombrement de la culture bactérienne fraîche de 18 h est effectué. Pour se faire, des tubes de 9 ml d'eau physiologique (0,9 % NaCl, m/v) sont préparés (10^{-1} ... 10^{-8}). Un volume de 1 ml de la culture bactérienne est transféré vers le premier tube, ce qui constitue la dilution 10^{-1} , puis à partir de ce dernier un autre 1 ml est transféré dans le deuxième tube (10^{-2}) et ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-8} . Enfin 1 ml des deux (02) dernières dilutions est ensemencé en masse dans la gélose MRS (Biokar, France) et incubé à 37°C/72 h. A l'issue de la période d'incubation, le nombre de cellules est déterminé par la formule suivante (Guiraud, 2003) :

$$\frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1n_2 + \dots)d}$$

ΣC : Somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues

V : Volume de la dilution.

n 1 : Nombre des boîtes de la première dilution

n 2 : Nombre des boîtes de la deuxième dilution

d : Facteur de la première dilution

3. Caractérisation des souches

3.1. Tolérance aux conditions simulées du transit gastro-intestinal du poulet de chair

3.1.1. Tolérance à l'acidité de l'estomac

La résistance au pH est testée par la méthode citée par **Yu et al. (2013)**. Un bouillon MRS stérile est préparé et son pH ajusté à pH=2 et à pH=3 avec du HCl (Sigma-Aldrich, Allemagne). Les souches bactériennes précédemment préparées sont ensemencées à raison de 1 ml dans 9 ml du bouillon MRS à pH modifié et incubées pendant 120 min à 37°C. Un dénombrement est par la suite effectué. Le test est répété trois fois.

3.1.2. Tolérance aux sels biliaries

Une solution de bile (Oxgall, Sigma-Aldrich, Allemagne) est préparée à 4 % (m/v) et autoclavée (120°C/20 min). Suivant les méthodes citées par **Vineetha et al. (2016)** et **Hassan et al. (2020)**, 9 ml de bouillon MRS additionné de la bile à raison de 0,3 % (m/v) ou de 0,4 % (m/v) et de 1 ml de la suspension bactérienne est incubé à 37°C/180 min. Un dénombrement en masse dans la gélose MRS est ensuite effectué. Le test est répété trois fois.

3.2. Adhésion des souches sur microplaques de polystyrène

Pour évaluer la capacité des souches à adhérer à la muqueuse intestinale et la formation d'un biofilm, un test d'adhésion sur microplaque de polystyrène de 96 puits est réalisé (**O'Toole & Kolter, 1998**). Des cultures de 18 h sont ensemencées (100 µl) dans les puits de microplaques préalablement remplis de 100 µl de bouillon TSB (Trypticase Soja Broth, Liofilchem, Italie) stérile, puis incubées à 37°C/2 h. Ensuite, les puits sont vidés et un volume de 200 µl de TSB stérile est ajouté dans les puits et la microplaque est ré-incubée à 37°C/48 h. Le milieu est par la suite retiré et les puits rincés trois fois avec de l'eau physiologique stérile. Les puits sont remplis avec de l'éthanol absolu (99,8%, Sigma) pendant 10 min puis ce dernier est retiré. La biomasse adhérente est colorée avec un volume de 200 µl de solution du cristal violet (0,1% ; m/v, Sigma) par puits pendant 20 min. La microplaque est par la suite vidée, rincée avec de l'eau physiologique. De l'éthanol à 96 % (200 µl) est ajouté dans chaque puit et bien mélangé. Le contenu est récupéré dans des cuves de spectrophotomètre et la lecture est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm.

3.3. Résistance des souches aux antibiotiques

3.3.1. Antibiogramme

Les souches sont examinées quant à leur résistance à cinq (05) antibiotiques (Bio Analyse, Turquie) représentant les β -lactamines (Imipénème « IPM » 10 μ g), Céfoxitine « FOX » 30 μ g, Amoxicilline + acide clavulanique « AMC » 30 μ g, Céfotaxime « CTX » 30 μ g et l’Aztreonam « ATM » 30 μ g), par la méthode de diffusion en disques. La gélose MRS est ensemencée avec la souche à étudier à une charge d’environ 10^8 UFC/ml par la technique d’écouvillonnage. Après séchage des boîtes dans la zone stérile du bec bunsen, des disques d’antibiotiques sont déposés sur celle-ci. Après incubation à 37°C/24 h, le diamètre de la zone d’inhibition est mesuré et le résultat est exprimé en termes résistant (R), moyennement sensible (MS), sensible (S) et fortement sensible (FS) (Georgieva et al., 2008) en se référant à la littérature.

3.3.2. Méthode de micro-dilution : détermination des CMI

Les souches sont testées quant à leur résistance à deux antibiotiques « Enrofloxacin » (AL-Floxacin 10 %, m/v ; AAHP, Constantine, Algérie) et « Oxytétracycline » (Oxytetr AL 500 P.S, AAHP, Constantine, Algérie), très utilisés en Algérie comme traitement prophylactique chez le poulet de chair.

Pour cela, la culture bactérienne fraîche (10^8 UFC/ml) est ensemencée par écouvillonnage sur la surface de la gélose MRS (BioKar, France). Après séchage, quatre puits sont creusés dans la gélose à l’aide d’un embout stérile. La solution d’Oxytétracycline est préparée en dissolvant l’antibiotique en poudre dans de l’eau distillée stérile à une concentration de 0,2 mg/ml, tandis que l’Enrofloxacin est une solution liquide à 10 % (m/v). A partir de la solution mère, une série de 3 dilutions d’1/2 est réalisée dans de l’eau distillée stérile. Les puits sont remplis avec 100 μ l de la solution d’antibiotique à tester. Après incubation à 37°C/24 h, le diamètre de la zone d’inhibition est mesuré.

4. Encapsulation des souches

De l’Iota-carraghénane (Sigma-Aldrich, Allemagne) est choisi comme matériau d’encapsulation des souches probiotiques, en raison de sa disponibilité, en utilisant deux techniques (extrusion et émulsion). Afin d’arriver à une méthode adéquate d’encapsulation

(une concentration du carraghénane idéale, capsule de taille et de forme idéales), des essais sont réalisés et résumés dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I. Essais réalisés pour l'encapsulation

Technique	Essai
Extrusion	Iota carraghénane (2 %, 3 %, 4% ; m/v) (20 ml)
	Iota carraghénane (1,5 %, 1,6 %, 1,7 %, 1,8 % ; m/v) (20 ml)
	Iota carraghénane 1,5% (m/v) (20 ml)+ Eau physiologique (0,9 % NaCl, m/v) (5 ml)
	Iota carraghénane 1,4% (m/v) (20 ml)+ Eau physiologique (0,9 % NaCl, m/v) (5 ml)
	Iota carraghénane 1,4% (m/v) (20 ml)+Eau distillée (5ml)+ CaCl ₂ 1M (40 ml)
	Iota carraghénane 1,3% (m/v) (20 ml)+Eau physiologique (0,9% NaCl, m/v) (5 ml)+CaCl ₂ 1M (40/60 ml)
	Iota carraghénane 1,2% (m/v) (20 ml)+ Eau physiologique (0,9 % NaCl, m/v) (5 ml) + CaCl ₂ 1M (40/60 ml)
	Iota carraghénane 1,1% (m/v) (20 ml) + Eau physiologique (0,9 % NaCl, m/v) (5 ml)+ CaCl ₂ 1M (40/60 ml)
Emulsion	Huile de tournesol (100 ml) +Tween 80 (BIOCHEM chemopharma) (1 ml) + iota carraghénane 1,2% (m/v ; agitation 20 min)+ CaCl ₂ 1M (100-200 ml).

4.1. Dénombrement des souches avant encapsulation

Un dénombrement de la culture bactérienne fraîche de 18 h est réalisé pour les deux souches *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus acidilactici*. Pour cela, une série de huit tubes à essai stériles est préparée pour chaque souche, ils contiennent 9 ml d'eau physiologique (0,9 % NaCl, m/v). Un volume de 1 ml de la culture bactérienne est introduit dans le premier tube, ce qui constitue la dilution 10^{-1} , puis à partir de ce dernier un autre 1ml est transféré dans le deuxième tube ce qui donne la dilution 10^{-2} , ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-8} . Pour finir, 1 ml de la dilution 10^{-8} est ensemencé en masse dans la gélose MRS (BioKar, France) et incubé à 37°C/48 h.

4.2. Encapsulation des souches dans l'iota carraghénane

Dans un premier temps, une solution d'Iota-carraghénane à 1,3 % (m/v) est préparée puis stérilisée à l'autoclave (180°C/ 10 min). Une solution de CaCl₂ (Biochem chemopharma, Chine) à 1 M est préparée en parallèle puis stérilisée à l'autoclave (180°C/20 min).

Par la suite, les cultures fraîches (18 h, 9 ml) des deux souches bactériennes (*Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus acidilactici*) sont centrifugées à 4500 rpm

pendant 15 min et le culot bactérien est récupéré puis resuspendu dans 9 ml d'eau physiologique respectivement.

Dans un deuxième temps, dans un bécher stérile, un volume de la solution d'iota carraghénane (1,3 %) et un volume de la suspension bactérienne à raison de $\frac{1}{4}$ de la solution de la carraghénane sont mélangés.

Le mélange est introduit dans une seringue stérile de 1 ml (Insuliss, Algérie), la pression manuelle exercée sur le piston de la seringue permet de faire tomber le contenu de la seringue goutte à goutte dans 60 ml de la solution de CaCl_2 1M.

Après un temps de contact au réfrigérateur (2 h), le mélange est récupéré et filtré à travers un papier filtre (Macherey-Nagel, Allemagne) stérile de 110 mm, dans le but de séparer les capsules formées de la solution de CaCl_2 . Les capsules retenues subissent un lavage avec 5 ml d'eau distillée stérile et sont conservées au réfrigérateur.

4.3. Dénombrement des souches après encapsulation

Un dénombrement est réalisé dans le filtrat de la solution de CaCl_2 dans le cas des deux souches étudiées comme décrit dans le paragraphe 4.1. Les dilutions 10^{-5} et 10^{-7} servent au dénombrement de la souche de *Pediococcus acidilactici* et les dilutions 10^{-4} et 10^{-6} servent au dénombrement de la souche de *Lactobacillus plantarum*.

5. Analyse statistique

Les résultats obtenus ont été analysés par le test ANOVA en utilisant le logiciel STATISTICA.

Résultats et discussion

1. Résultat de la standardisation

Les *inocula* des deux souches ont été standardisés à $3,7 \cdot 10^9$ UFC/ml (*Lactobacillus plantarum*) et $5,2 \cdot 10^9$ UFC/ml (*Pediococcus acidilactici*) pour l'ensemble des tests réalisés.

2. Tolérance à l'acidité

Les bactéries probiotiques, administrées par voie orale, sont soumises à un environnement gastrique très acide, avant d'atteindre l'intestin et exprimer leurs bienfaits. L'acidité de l'estomac est donc un des facteurs les plus importants à prendre en compte lors de la sélection et la caractérisation des souches probiotiques (Dec et al., 2014; Gupta & Sharma, 2017). Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 1.

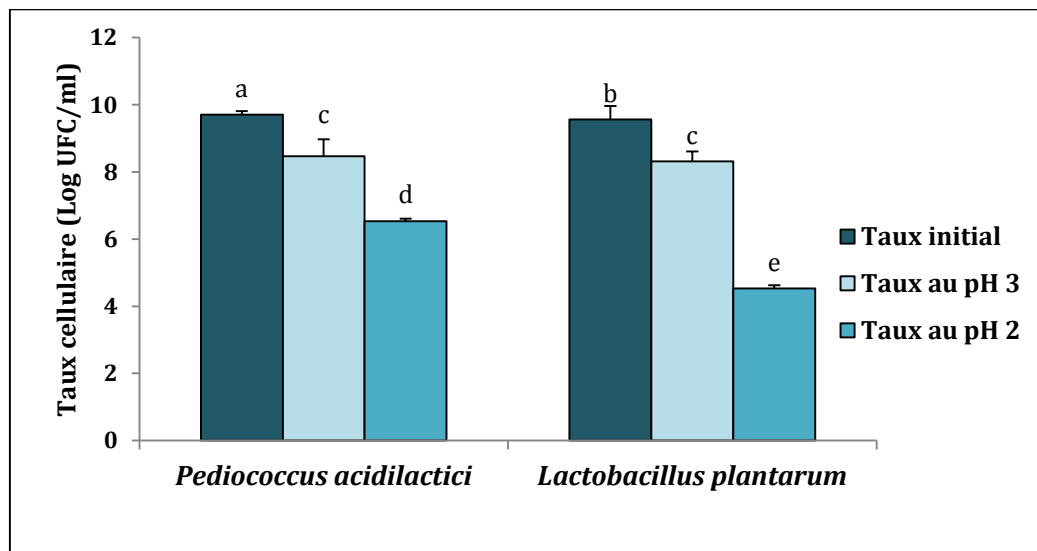


Figure 1. Tolérance à l'acidité gastrique des deux souches testées. Les lettres différentes indiquent des différences significatives ($P < 0,05$)

D'après les résultats obtenus nous pouvons constater que les deux souches exposées au pH acide pendant 2 h subissent une mortalité considérable notamment *Lactobacillus plantarum* (**47 % de survie**) qui est moins résistante que *Pediococcus acidilactici* (**67% de survie**) à un pH=2. Alors qu'à pH=3, les deux souches montrent une résistance considérable et les taux de survie sont identiques (**87 %**). Ces résultats sont en accord avec les résultats de nombreuses études déjà réalisées sur ces genres.

La capacité des lactobacilles à survivre au passage gastrique à pH physiologique variant de 2 à 3, est variable et dépend de la souche, mais avec un taux de survie d'environ 85 %, considéré comme très significatif pour des applications probiotiques (**Fernández et al., 2003; Pennacchia et al., 2004**). Des études ont montré que l'exposition de souches de *Lactobacillus* à des valeurs de pH de 2,5 à 4,0 n'a pas d'influence sur leur taux de survie, mais ce dernier chutait à des pH plus bas (**Wang et al., 2010; Mishra & Prasad, 2005; Benbara et al., 2020**).

Selon **Belicová et al. (2013)**, parmi 71 isolats de *Lactobacillus* testés, uniquement 41 % ont pu tolérer une exposition à un pH de 3 à 2 pendant 90 min. De même, sur 15 souches de *Lactobacillus plantarum*, 10 ont été capables de croître dans la gélose MRS acidifiée (pH 3,5) après 96 h d'incubation (**Cebeci & Gürakan, 2003**). Un nombre de 43 souches de *Lactobacillus*, sur 114 testées pour leur résistance à différentes valeurs de pH, ont présenté un taux de viabilité supérieur à 90 % après exposition à pH 3, 4 et 5 pendant 2 h et un pourcentage de survie supérieur à 50 % a été observé pour 27 souches testées sous pH 2. (**Sirilun et al., 2010**).

Le genre *Pediococcus* quant à lui comprend des souches connues par une haute tolérance à l'acidité même à des pH \leq 2. **Gupta & Sharma (2017)** rapportent que la souche Ch-2 a survécu avec un taux de 74,95 % à un pH aussi bas que 1 pendant environ 2 h d'exposition. La même souche a présenté des taux de survie de 72,69 % et 98,62 % après 3 h d'exposition à pH 2 et 3 respectivement. La souche Kp10 de *Pd. acidilactici* a montré une survie de plus de 97 % à pH 3 après 3 h d'incubation (**Abbasiliasi et al., 2012**). De même, la souche L169 a montré une survie de 96,2 % à un pH de 2,5 après 4 h d'incubation (**Kaboré et al., 2012**). Dans l'étude de **Vasiee et al. (2020)**, toutes les souches de *Pediococcus* testées avaient une bonne résistance au pH acide après 3 h d'exposition.

3. Tolérance à la bile

Les sels biliaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol et sont sécrétés par la vésicule biliaire dans le duodénum sous forme conjuguée, de sorte que leur concentration dans l'intestin se situe entre 0,3 et 0,5 % (**Karasu et al., 2010**). La tolérance aux sels biliaires est un facteur essentiel dans la caractérisation des souches probiotiques car elle détermine leur survie dans le tractus intestinal. Les sels biliaires perturbent la membrane cellulaire des bactéries qui entrent dans l'intestin (**Hassan et al., 2020**). Il est

important donc que les bactéries probiotiques tolèrent au moins 0,3 % de sels biliaires *in vitro* (Marteau *et al.*, 1997). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2.

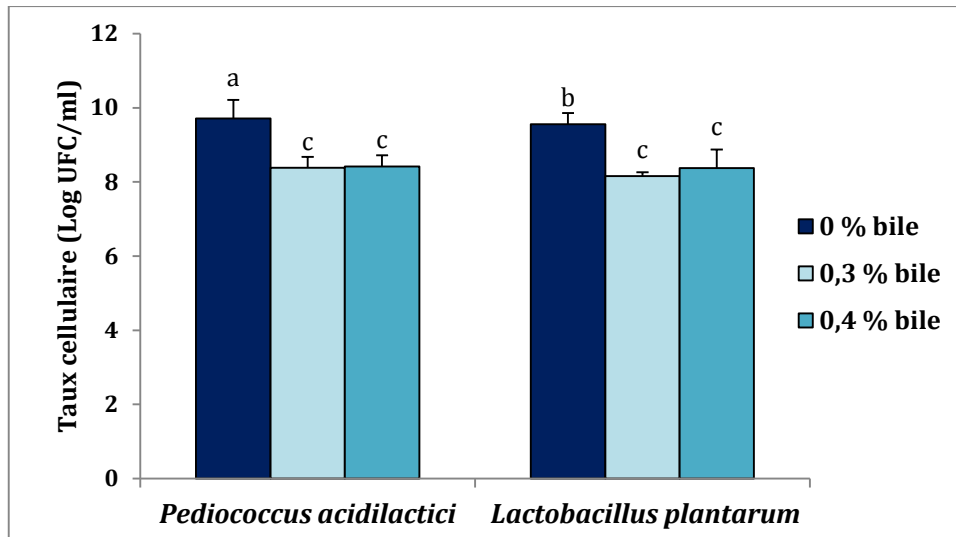


Figure 2. Tolérance à la bile des deux souches testées. Les lettres différentes indiquent des différences significatives ($P < 0,05$)

Les souches de *Lb. plantarum* et *Pd. acidilactici* présentent une haute tolérance aux sels biliaires à des concentrations de 0,3% et 0,4% après 3 h d'exposition. Une différence non significative a été observée entre les deux souches, *Pd. acidilactici* (86-87%) et *Lb. plantarum* (85-87 %). Georgieva *et al.* (2008) ont rapporté qu'il n'y a pas de différence significative dans l'effet des sels biliaires à 0,3 % et 0,5 % sur la viabilité des isolats de *Lb. plantarum* bien que leur croissance a été retardée de 3 à 6 h. Toutes les souches de *Lb. plantarum* examinées par Yu *et al.* (2013) ont bien survécu en présence des sels biliaires à 0,3 ; 0,5 et 1,0 % dans du bouillon MRS, mais ils ont signalé une tendance à la diminution de la viabilité bactérienne avec l'augmentation de la concentration.

En contrepartie, la sensibilité de quelques souches de *Lb. plantarum* aux sels biliaires a été mise en évidence par d'autres études mais à des concentrations dépassant 0,5 %, notamment les souches LC56 (Hamon *et al.*, 2011) et LP3 (Karasu *et al.*, 2010).

Pd. acidilactici ayant fait l'objet de nombreuses études a aussi été considérée très résistante. En effet, Barbosa *et al.* (2015) ont rapporté que toutes les souches testées ont montré des taux de survie élevés en présence de 0,3 % de sels biliaires. Le taux de viabilité

cellulaire de l'isolat Ch-2 pour des concentrations de sels biliaries allant de 0,3 % à 2 % était estimée entre 98,34 % et 95,42 % (Gupta & Sharma, 2017).

La capacité des souches probiotiques à hydrolyser les sels biliaries, à travers l'intervention de l'enzyme BSH (bile salt hydrolase), offre aux espèces probiotiques un avantage compétitif pour survivre et coloniser l'intestin (Shanmugasundaram et al., 2019). Les deux espèces étudiées n'échappent pas à cette règle, les genres *Lactobacillus* (Bateup et al., 1995) et *Pediococcus* (He et al., 2012) sont connus pour leur production de cette enzyme essentielle à leur survie dans l'intestin ce qui peut expliquer les résultats obtenus.

4. Adhésion

L'évaluation précise de l'adhésion est nécessaire pour la sélection de nouvelles souches probiotiques (Kizerwetter-Świda & Binek, 2006). L'adhésion et la colonisation de la muqueuse intestinale par les bactéries probiotiques sont basées sur les propriétés de surface de la souche, et repose initialement sur des interactions physiques non spécifiques entre les deux surfaces (Hermansson, 1999 ; Bhagat et al., 2020). Ce phénomène favorise le temps de séjour des souches dans l'intestin, l'exclusion des agents pathogènes, et l'interaction avec les cellules épithéliales et immunitaires de l'hôte (Balgir et al., 2013).

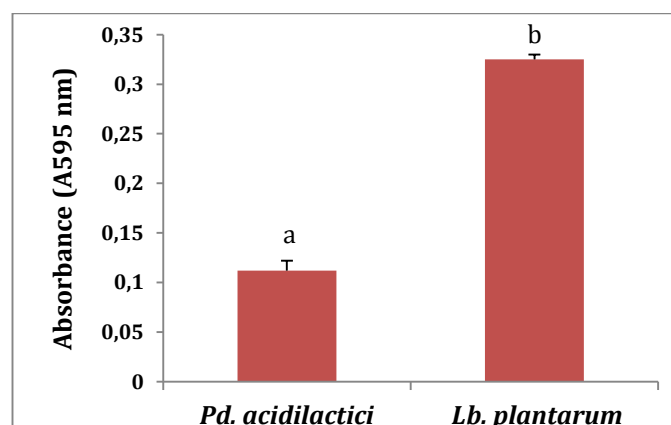


Figure 3. Taux d'adhésion des souches testées. Les lettres différentes indiquent des différences significatives ($P < 0,05$)

Les moyennes d'absorbance déterminée en présence de *Pd. acidilactici* et *Lb. plantarum* (0,479 et 0,692 respectivement) ont été supérieures à la moyenne d'absorbance du témoin (0,367 ; absence de souche), ceci témoigne de la capacité d'adhésion des deux souches testées. Par comparaison, la souche de *Lb. plantarum* ($A=0,325$) est douée d'une capacité d'adhésion nettement plus supérieure ($P<0,05$) que celle de *Pd. acidilactici* ($A=0,112$). La capacité d'adhésion *in vitro* est généralement corrélée au pouvoir d'adhésion *in vivo*. **Kizerwetter-Świda & Binek (2006)** rapportent que la capacité des lactobacilles à adhérer au mucus intestinal a été évaluée *in vitro* par de nombreux chercheurs et que cette propriété est synonyme d'une colonisation durable *in vivo* dans le tractus gastro-intestinal. La capacité des bactéries lactiques à coloniser la muqueuse intestinale est largement étudiée. **Dowarah et al. (2018)** allèguent que les bactéries lactiques sont connues par une forte adhésion à l'épithélium intestinal, il en résulte l'inhibition de la colonisation des agents pathogènes et la stimulation de l'immunité. **Abbasiliasi et al. (2017)** citent que certaines souches lactiques peuvent empêcher l'adhésion des agents pathogènes à la muqueuse intestinale, soit en formant une barrière par auto-agrégation, ou par co-agrégation avec les agents pathogènes. La capacité d'adhésion des bactéries probiotiques varie d'une espèce à l'autre, une variation de 1% à 25 % ayant été observée dans le cas de 18 lactobacilles et pédiocoques probiotiques connus (**Balgir et al., 2013**). Ces études viennent appuyer fortement les résultats obtenus.

4. Résistance aux antibiotiques

Bien que la *FDA* a accordé le statut *GRAS* aux bactéries lactiques, leur innocuité doit être évaluée avant leur utilisation comme probiotiques et la résistance aux antibiotiques est parmi les critères à vérifier (**FAO/OMS, 2002**). Cependant, la capacité des souches probiotiques à résister aux antibiotiques pourrait être bénéfique pour les personnes souffrant de troubles intestinaux (**Yu et al., 2013**), à condition que ces souches ne transfèrent pas les gènes de résistance à la microflore intestinale (**Mathur & Singh, 2005**). Les résultats obtenus sont rapportés dans les tableaux II et III.

Tableau II. Résultats de la sensibilité des deux souches testées aux β -lactamines exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (cm).

Antibiotique	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Imipénème (IPM 10 μ g)	2,4 cm	2,8 cm
Céfoxitine (Fox 30 μ g)	1,4 cm	1,6 cm
Amoxicilline + acide clavulanique (AMC 30 μ g)	2,5 cm	2,2 cm
Céfotaxime (CTX 30 μ g)	1,6 cm	2,0 cm
Aztreonam (ATM 30 μ g)	1,8 cm	1,5 cm

Tableau III. Résultats de la sensibilité des deux souches testées à différentes concentrations de l'Oxytétracycline et de l'Enrofloxaciné exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (cm).

Souches	Oxytétracycline (mg/ml)				Enrofloxaciné (mg/ml)			
	0,2	0,1	0,05	0,025	0,1	0,05	0,025	0,0125
<i>Pediococcus acidilactici</i>	1,6 cm	1,0 cm	0,9 cm	0,5 cm	0,4 cm	0 cm	0 cm	0 cm
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,0 cm	1,0 cm	0,9 cm	0,8 cm	0,6 cm	0 cm	0 cm	0 cm

Aucune des deux souches étudiées n'est résistante aux antibiotiques appartenant à la classe des β -lactamines. Une CMI inférieure à 0,025 mg/ml a été enregistrée pour l'oxytétracycline, tandis que celle notée pour l'enrofloxaciné était de 0,1 mg/ml.

Dans la littérature, une résistance intrinsèque à certains antibiotiques est largement rapportée pour les bactéries lactiques notamment une résistance intrinsèque à la vancomycine chez les genres *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* (Jena et al., 2013; Manini et al., 2016). Par contre, une sensibilité envers les β -lactamines, famille testée dans ce travail, est largement rapportée pour ce groupe bactérien (Karasu et al., 2010).

Selon les indications mentionnées sur l'emballage et le site du fabricant (AAHP, Algérie), l'enfloxaciné est un produit indiqué chez la volaille pour le traitement des infections causées par des bactéries à Gram négatif sensibles à cet antibiotique (*Salmonella* spp., *E. coli*, *Pasteurella mucocida*, *Avibacterium* spp. et *Haemophilus paragallinarum*), certaines à Gram positif et *Mycoplasma* spp.. Il est administré à raison de 5 ml/10 l d'eau de boisson. Les CMI de la plupart des microorganismes à signification clinique sont

comprises entre 0,008 et 0,25 µg/ml (CMI 90) pour les microorganismes d'origine aviaire. Une fois administrée, l'enrofloxacin est complètement absorbée et présente un volume de distribution important. Les concentrations tissulaires sont 2 à 5 fois supérieures aux concentrations plasmatiques, notamment dans les poumons, foie, reins, os, et le système lymphatique. La ciprofloxacine est le métabolite actif de l'enrofloxacin (AAHP, 2021). C'est un antibiotique bactéricide de la famille des quinolones, il agit par inhibition de la réplication des bactéries en agissant sur l'ADN gyrase (Gouvea et al., 2015).

L'oxytétracycline est un antibiotique bactériostatique de la famille des tétracyclines, agit sur la sous unité 30 S des ribosomes et bloque la synthèse protéique et donc un arrêt de la croissance bactérienne. Elle est à large spectre, principalement active contre les microorganismes à Gram positif et négatif, aérobies et anaérobies ainsi que contre les mycoplasmes, *Chlamidiae* et *Rickettsiae* (AAHP, 2021).

L'oxytétracycline et l'enrofloxacin sont considérés comme les principaux antibiotiques à usage avicole, identifiés comme cause de contamination des sols et présence de bactéries entériques résistantes aux antibiotiques dans l'environnement (sols, eau...etc) (Selaledi et al., 2020). Mais plusieurs études focalisées sur l'effet de ces derniers sur l'élevage du poulet de chair et les répercussions qui en résultent, ne rapportent pas de cas de résistance des souches lactiques, bien qu'elles considèrent ces antibiotiques comme source de pollution (Khan et al., 2019; Muhammad et al., 2020). D'autres études mettent en évidence le fait de résistance pour quelques bactéries notamment pathogènes, mais pas pour les souches lactiques (Gouvea et al., 2015; Krishnasamy et al., 2015).

L'innocuité d'une souche est l'une des propriétés les plus requises pour qu'elle soit considérée comme étant probiotique. Les souches étudiées, ont déjà été révélées dénuées du caractère hémolytique (travaux antérieurs) et ne présentent aucune résistance aux antibiotiques de la famille des β-lactamines et l'Oxytétracycline. À cet effet, elles peuvent être considérées comme des probiotiques potentiels dans l'alimentation avicole.

5. Encapsulation des souches

Le taux initial des cellules bactériennes avant encapsulation était de $3,7 \cdot 10^9$ UFC/ml pour *Lb. plantarum* et $5,2 \cdot 10^9$ UFC/ml pour *Pd. acidilactici*. Les suspensions bactériennes ont subi une dilution de $\frac{1}{4}$ dans la solution d'iota-carraghénane, ce qui diminue la charge bactérienne initiale à $9,0 \cdot 10^8$ UFC/ml (*Lb. plantarum*) et $1,3 \cdot 10^9$ UFC/ml (*Pd. acidilactici*).

Le dénombrement des cellules restantes dans la solution durcissante de CaCl_2 a permis d'avoir un nombre de $2,2 \cdot 10^6$ UFC/ml pour *Pd. acidilactici* et de $8,2 \cdot 10^5$ UFC/ml pour *Lb. plantarum*.

En tenant compte des facteurs de dilution apportés lors de la manipulation, à savoir un volume de 60 ml de solution durcissante de CaCl_2 pour *Lb. plantarum* et 40 ml pour *Pd. acidilactici* et de 5 ml d'eau distillée pour le lavage, le nombre de cellules restantes après encapsulation est de l'ordre de $1,4 \cdot 10^8$ UFC/ml pour *Pd. acidilactici* et de $3,7 \cdot 10^7$ UFC/ml pour *Lb. plantarum*. Ainsi, des taux d'encapsulation de **84 %** (*Pd. acidilactici*) et de **97 %** (*Lb. plantarum*) ont pu être obtenus au terme du protocole d'encapsulation adopté.

L'efficacité de l'encapsulation a été déterminée par une méthode directe via le dénombrement des cellules viables présentes dans la solution, avant et après encapsulation des cellules bactériennes. La biomasse initiale des deux souches étudiées avant la réalisation de l'encapsulation enregistre une diminution, d'après les résultats du dénombrement, après encapsulation. Ces résultats indiquent que les deux souches étudiées ont été encapsulées et immobilisées avec succès dans les billes d'iota-carraghénane mais avec des taux d'encapsulation différents. Une observation à l'œil nu a permis d'apprécier la morphologie des billes, qui étaient de forme sphérique et de taille moyenne.

Différents types de carraghénanes bénéficient d'une longue expérience d'utilisation dans divers domaines et leur sécurité à l'emploi est fréquemment rapportée. Des études ont montré que ce polymère est un biomatériau utile pour l'encapsulation des bactéries et il est parmi les principaux supports utilisés pour l'encapsulation (**Hammill & Crawford, 1997; Liliana & Vladimir, 2013**).

De nombreuses études ont prouvé que la survie des souches probiotiques encapsulées avec la carraghénane seule ou en mélange avec d'autres matériaux était plus élevée par rapport à celle des cellules libres (**Audet et al., 1988; Ding & Shah, 2009; Dafe et al., 2017; Afzaal et al., 2019**).

L'encapsulation d'une souche de *Lb. acidophilus*, en utilisant la carraghénane, a augmenté sa viabilité lors de son incorporation dans un produit alimentaire par rapport aux cellules libres non encapsulées (**Afzaal et al., 2019**).

Selon **Dafe et al. (2017)**, en ajoutant différentes concentrations du kappa-carraghénane au carboxyméthylcellulose (CMC) comme deuxième couche, dans le but d'encapsuler par la méthode d'extrusion une souche de *Lb. plantarum*, a augmenté le

rendement de l'encapsulation avec une efficacité de $94,7 \pm 0,78$ %, par rapport à l'encapsulation avec la CMC seule, qui présente une efficacité de $74,2 \pm 1,14$ %.

Dans l'étude d'**Audet et al. (1988)**, l'encapsulation avec le kappa-carraghénane/gel de gomme de caroube était efficace pour *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactococcus lactis*, et le taux de survie de ces bactéries pendant le stockage est resté très élevé.

Ding & Shah (2009) ont montré que l'utilisation de la carraghénane, alginate, xanthane et gomme de caroube, comme matériaux d'encapsulation des bactéries probiotiques (*Bifidobacterium longum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. paracasei* et *Lb. salivarius*) améliore leur viabilité lors de l'exposition aux conditions gastro-intestinales.

Conclusion

Les deux souches lactiques de *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus acidilactici*, ayant fait l'objet de cette étude, ont montré des résultats *in-vitro* satisfaisants en termes de tolérance aux conditions gastro-intestinales, d'adhésion et d'innocuité. Des taux de survie de l'ordre de 47 % (*Lb. plantarum*) et de 67% (*Pediococcus acidilactici*) ont été enregistrés à pH 2. De même, les souches ont été très tolérantes à la bile (0,3-0,4 %) avec des taux de survie de 85-87 %. Le test d'adhésion sur microplaque en polystyrène a montré que les deux souches sont douées d'un pouvoir d'adhésion. Toutefois, la souche de *Lb. plantarum* s'est révélée plus adhérente que celle de *Pd. acidilactici*. Les deux souches ont montré une sensibilité aux antibiotiques largement utilisés en aviculture, notamment les β -lactamines et l'oxytétracycline. Une CMI inférieure ou égale à 0,025 mg/ml de l'oxytétracycline a été enregistrée pour les deux souches, tandis que celle de l'enrofloxacin était égale à 0,1 mg/ml.

L'étape de caractérisation des souches peut être renforcée par d'autres tests *in-vitro*, tels que la détermination de l'activité antimicrobienne, la tolérance aux enzymes lytiques (pepsine, pancréatine), les tests de cytotoxicité et de production d'amines biogènes ainsi qu'une étude plus approfondie *in-vivo*.

La technique d'extrusion dans une matrice d'iota-carraghénane, utilisée dans ce travail, peut être considérée comme adéquate pour l'encapsulation de ces deux souches de par la disponibilité du polymère, la facilité de la technique et son coût réduit et les taux d'efficacité obtenus (84 % : *Pd. acidilactici* et 97 % : *Lb. plantarum*). Néanmoins, les capsules obtenues doivent passer par des tests de caractérisation morphologique, physicochimique et physiologique pour confirmer la réussite de cette encapsulation. D'autres conditions d'encapsulation, techniques et polymères doivent être testés pour l'optimisation de cette procédure.

Références bibliographiques

- Abaidullah, M., Peng, S., Kamran, M., Yin, Z., & Song, X. (2019). Current findings on gut microbiota mediated immune modulation against viral diseases in chicken. *Viruses*, *11*(8), 681.
- Abbas, S., da Wei, C., Hayat, K., & Xiaoming, Z. (2012). Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends-A Review. *Food Reviews International*, *28*(4), 343–374.
- Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Ibrahim, T. A. T., Ramanan, R. N., Vakhshiteh, F., Mustafa, S., & Ariff, A. B. (2012). Isolation of *Pediococcus acidilactici* Kp10 with ability to secrete bacteriocin-like inhibitory substance from milk products for applications in food industry. *BioMed Central Microbiology*, *12*(1), 1–12.
- Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Bashokouh, F., Ibrahim, T. A. T., Mustafa, S., Vakhshiteh, F., Sivasambo, S., & Ariff, A. B. (2017). *In vitro* assessment of *Pediococcus acidilactici* Kp10 for its potential use in the food industry. *BMC Microbiology*, *17*(1), 1–11.
- Adesulu-Dahunsi, A. T., Jeyaram, K., & Sanni, A. I. (2018). Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based nigerian fermented food products. *Food Control*, *92*, 225–231.
- Adhikari, B., Howes, T., Bhandari, B., & Truong, V. (2002). Surface stickiness of low molecular weight sugars and maltodextrin during drying. *Food Industry Journal*, *5*(2), 112–124.
- Afzaal, M., Saeed, F., Arshad, M. U., Nadeem, M. T., Saeed, M., & Tufail, T. (2019). The Effect of Encapsulation on The Stability of Probiotic Bacteria in Ice Cream and Simulated Gastrointestinal Conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *11*(4), 1348–1354.
- Ainsley Reid, A., Champagne, C. P., Gardner, N., Fustier, P., & Vuilleumard, J. C. (2007). Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. *Journal of Food Science*, *72*(1), M031–M037.
- Al-Fatah, M. A. (2020). Probiotic modes of action and its effect on biochemical parameters and growth performance in poultry. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, *10*(1), 9–15.
- Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Farag, M. R., Sachan, S., Karthik, K., & Dhama, K. (2018). The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(11), 10611–10618.
- Anitha, A., Deepagan, V. G., Divya Rani, V. V., Menon, D., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2011). Preparation, characterization, *in vitro* drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate-chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, *84*(3), 1158–1164.
- Arnaud, J., Lacroix, C., & Choplin, L. (1992). Effect of agitation rate on cell release rate and metabolism during continuous fermentation with entrapped growing. *Springer*, *6*(3), 265–270.
- Audet, P., Paquin, C., & Lacroix, C. (1988a). Immobilized growing lactic acid bacteria with x-carrageenan -- locust bean gum gel. *Applied Microbiology Biotechnology*, 11–18.
- Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009). Nano-and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, *38*(4), 902–912.

- Aziz, G., Fakhar, H., Rahman, S. ur, Tariq, M., & Zaidi, A. (2019). An assessment of the aggregation and probiotic characteristics of *Lactobacillus* species isolated from native (desi) chicken gut. *Journal of Applied Poultry Research*, 28(4), 846–857.
- Balgir, P. P., Kaur, B., Kaur, T., Daroch, N., & Kaur, G. (2013). In vitro and in vivo survival and colonic adhesion of *Pediococcus acidilactici* MTCC5101 in human gut. *BioMed Research International*, 2013.
- Barbosa, J., Borges, S., & Teixeira, P. (2015). *Pediococcus acidilactici* as a potential probiotic to be used in food industry. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(5), 1151–1157.
- Barrow, P. A. (1992). Probiotics for chickens. *Probiotics*, 225–257.
- Bateup, J. M., McConnell, M. A., Jenkinson, H. F., & Tannock, G. W. (1995). Comparison of *Lactobacillus* strains with respect to bile salt hydrolase activity, colonization of the gastrointestinal tract, and growth rate of the murine host. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1147–1149.
- Belicová, A., Mikulášová, M., & Dušinský, R. (2013). Probiotic potential and safety properties of *lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza cheese. *BioMed Research International*, 2013.
- Benbara, T., Lalouche, S., Drider, D., & Bendali, F. (2020). *Lactobacillus plantarum* S27 from chicken faeces as a potential probiotic to replace antibiotics: in vivo evidence. *Beneficial Microbes*, 11(2), 163-173.
- Bernardeau, M., Lehtinen, M. J., Forssten, S. D., & Nurminen, P. (2017). Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2570–2584.
- Bhagat, D., Raina, N., Kumar, A., Katoch, M., Khajuria, Y., Slathia, P. S., & Sharma, P. (2020). Probiotic properties of a phytase producing *Pediococcus acidilactici* strain SMVDUB2 isolated from traditional fermented cheese product, Kalarei. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11.
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A., & Ouwehand, A. C. (2020). Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1662.
- Bortoluzzi, C., Vieira, B. S., Dorigam, J. C. de P., Menconi, A., Sokale, A., Doranalli, K., & Applegate, T. J. (2019). *Bacillus subtilis* dsm 32315 supplementation attenuates the effects of *Clostridium perfringens* challenge on the growth performance and intestinal microbiota of broiler chickens. *Microorganisms*, 7(3), 71.
- Burgain, J., Gaiani, C., Francius, G., Revol-Junelles, A. M., Cailliez-Grimal, C., Lebeer, S., Tytgat, H. L. P., Vanderleyden, J., & Scher, J. (2013). In vitro interactions between probiotic bacteria and milk proteins probed by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104, 153–162.
- C.-Y. Wang, P.-R. Lin, C.-C. Ng, and Y.-T. S. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, 16(6), 578–595.
- Caly, D. L., Inca, R. D., Auclair, E., & Drider, D. (2015). Alternatives to Antibiotics to Prevent Necrotic Enteritis in Broiler Chickens : A Microbiologist ’ s Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1336.
- Carvalho, I. T., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 94, 736–757.
- Cebeci, A., & Gürakan, C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*, 20(5), 511–518.
- Chaisatit, C., Tribuddharat, C., Pulsrikarn, C., & Dejsirilert, S. (2012). Molecular

- characterization of antibiotic-resistant bacteria in contaminated chicken meat sold at supermarkets in Bangkok, Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 65(6), 527–534.
- Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for delivery of probiotics and other ingredients in functional dairy products. In *Functional Dairy Products: Second Edition*, 2, (404–426).
- Chan, E. S., & Zhang, Z. (2002). Encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* by direct compression. *Food and Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C*, 80(2), 78–82.
- Chandralekha, A., Tavanandi, A. H., Amrutha, N., Hebbar, H. U., Raghavarao, K. S. M. S., & Gadre, R. (2016). Encapsulation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by spray drying for extension of shelf life. *Drying Technology*, 34(11), 1307–1318.
- Chavarri, M., Maranon, I., & Carmen, M. (2012). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. *Probiotics*. IntechOpen
- Dafe, A., Etemadi, H., Zarredar, H., & Mahdavinia, G. R. (2017). Development of novel carboxymethyl cellulose/k-carrageenan blends as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 299–307.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292–302.
- Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., Wernicki, A. (2014). Screening of *Lactobacillus* strains of domestic goose origin against bacterial poultry pathogens for use as probiotics. *Poultry Science*, 93(10), 2464–2472.
- Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. In *Drying Technology*, 23, (7), 1361–1394.
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2009). Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 74(2), M100–M107.
- Djezzar, R., Benamirouche-Harbi, & K., Baazize-Amami, D., Hezil, N., Gharbi, I., Kebbal, S., & Guetarni, N. S. E. D. (2019). Effects of adding 2 probiotics replacing antibiotics on the performances of broilers and their intestinal flora. *Livestock Research for Rural Development*, 31(7).
- Doré, J., & Corthier, G. (2010). The human intestinal microbiota Le microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34, S7–S15.
- Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., Singh, P., & Singh, B. R. (2018). Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PLoS ONE*, 13(3).
- Eeckhaut, V., Wang, J., Van Parys, A., Haesebrouck, F., Joossens, M., Falony, G., Raes, J., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2016). The probiotic butyricococcus pullicaecorum reduces feed conversion and protects from potentially harmful intestinal microorganisms and necrotic enteritis in broilers. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1416.
- Europe Union Commission. 2005. Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. Regulation 183/2003/WC on additives for use in animal nutrition, replacing directive 70/524/EEC on additives in feed-stuffs, Brussels, 22 December.
- FAO/OMS. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Working group report. *Lomdon. Ontario*, 1–11.

- Farias, T. G. S. de, Ladislau, H. F. L., Stamford, T. C. M., Medeiros, J. A. C., Soares, B. L. M., Stamford Arnaud, T. M., & Stamford, T. L. M. (2019). Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. *LWT*, *100*, 391–396.
- Farner, D. S. (1942). The Hydrogen Ion Concentration in Avian Digestive Tracts. *Poult. Sci*, *21*, 445.
- Favaro-Trindade, C. S., Heinemann, R. J. B., & Pedroso, D. L. (2011). Developments in probiotic encapsulation. In *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, *6*, 1–8.
- Fernández, M. F., Boris, S., & Barbés, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, *94*(3), 449–455.
- Fesseha, H. (2019). Probiotics and Its Potential Role in Poultry Production: A Review. *A.Genus*, *20*(11), 22.
- Fuller, R. (1992). History and development of probiotics. *Probiotics*, 1–8.
- Gbassi, G. K., & Vandamme, T. (2012). Probiotic encapsulation technology: From microencapsulation to release into the gut. In *Pharmaceutics*, *4*, (1), 149–163.
- Georgieva, R. N., Iliev, I. N., Chipeva, V. A., Dimitonova, S. P., Samelis, J., & Danova, S. T. (2008). Identification and in vitro characterisation of *Lactobacillus plantarum* strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses. *Journal of Basic Microbiology*, *48*(4), 234–244.
- González-Rodríguez, I., Ruiz, L., Gueimonde, M., Margolles, A., & Sánchez, B. (2013). Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*, *340*(1), 1–10.
- Gonzalez Ronquillo, M., & Angeles Hernandez, J. C. (2017). Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. *Review of Impact and Analytical Methods*, *72*, 255–267.
- Gouvea R, Santos FF dos, A. M. de, & A, P. V. de. (2015). Bacterial Resistance and Food Residues : a Review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, *17*, 1–10.
- Guiraud J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Edition : Dunod. Paris. 651p.
- Gullón, B., Gómez, B., Martínez-Sabajanes, M., Yáñez, R., Parajó, J. C., & Alonso, J. L. (2013). Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. In *Trends in Food Science and Technology*, *30*(2), 153–161.
- Gupta, A., & Sharma, N. (2017). Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Ch-2 Isolated from Chuli Characterization of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria- *Pediococcus acidilactici* Ch-2 Isolated from Chuli- A Traditional Apricot Product of Himalayan Region for the Production of N. *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene*, *2*(1), 1–11.
- Haghshenas, B., Abdullah, N., Nami, Y., Radiah, D., Rosli, R., & Yari Khosroushahi, A. (2015). Microencapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 15HN using alginate-psyllium-fenugreek polymeric blends. *Journal of Applied Microbiology*, *118*(4), 1048–1057.
- Hammill, T. B., & Crawford, R. L. (1997). Bacterial microencapsulation with three algal polysaccharides. *Canadian Journal of Microbiology*, *43*(11), 1091–1095.
- Hamon, E., Horvatovich, P., Izquierdo, E., Bringel, F., Marchioni, E., Aoudé-Werner, D., & Ennahar, S. (2011). Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum*

- for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiology*, 11(1), 1–11.
- Hassan, M. U., Nayab, H., Shafique, F., Williamson, M. P., Almansouri, T. S., Asim, N., Shafi, N., Attacha, S., Khalid, M., Ali, N., & Akbar, N. (2020). Probiotic Properties of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum* Isolated from Traditional Pakistani Yoghurt. *BioMed Research International*, 2020.
- He, X., Zou, Y., Cho, Y., & Ahn, J. (2012). Effects of bile salt deconjugation by probiotic strains on the survival of antibiotic-resistant foodborne pathogens under simulated gastric conditions. *Journal of Food Protection*, 75(6), 1090–1098.
- Hermansson, M. (1999). The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14(1–4), 105–119.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514.
- Holkem, A. T., Raddatz, G. C., Nunes, G. L., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Ferreira Grosso, C. R., & de Menezes, C. R. (2016). Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 302–308.
- Horáčková, Š., Plocková, M., & Demnerová, K. (2018). Importance of microbial defence systems to bile salts and mechanisms of serum cholesterol reduction. *Biotechnology Advances*, 36(3), 682–690.
- Jankowski, T., Zielinska, M., Techniques, A. W.-B., & 1997, U. (1997). Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. In *Springer*.
- Jayaraman, S., Thangavel, G., Kurian, H., Mani, R., Mukkalil, R., & Chirakkal, H. (2013). *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poultry Science*, 92(2), 370–374.
- Jena, P. K., Trivedi, D., Thakore, K., Chaudhary, H., Giri, S. S., & Seshadri, S. (2013). Isolation and characterization of probiotic properties of lactobacilli isolated from rat fecal microbiota. *Microbiology and Immunology*, 57(6), 407–416.
- Jha, R., Das, R., Oak, S. & Mishra P. (2020). Probiotics (Direct-Fed Microbials) in Poultry Nutrition and Their Effects on Nutrient Utilization, Growth and Laying Performance, and Gut Health: A Systematic Review. *Animals* 10, 1863.
- Ji, R., Wu, J., Zhang, J., Wang, T., Zhang, X., Shao, L., Chen, D., & Wang, J. (2019). Extending viability of bifidobacterium longumin chitosan-coated alginate microcapsules using emulsification and internal gelation encapsulation technology. *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN), 1389.
- John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., & Prévost, D. (2011). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 211–226.
- Jones, M. L., Tomaro-Duchesneau, C., Martoni, C. J., & Prakash, S. (2013). Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for heart health applications. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 13(5), 631–642.
- Kaboré, D., Sawadogo-Lingani, H., Dicko, M. H., Diawara, B., & Jakobsen, M. (2012). Acid resistance, bile tolerance and antimicrobial properties of dominant lactic

- acid bacteria isolated from traditional “maari” baobab seeds fermented condiment. *African Journal of Biotechnology*, 11(5), 1197–1206.
- Kailasapathy, K. (2002). Current issues in intestinal microbiology_2002_Kailasapathy_Microencapsulation of probiotic bacteria technology and potential appli.pdf. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 3(1), 39–48.
- Karasu, N., Şimşek, Ö., & Çon, A. H. (2010). Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. *Annals of Microbiology*, 60(2), 227–234.
- Khalique, A., Zeng, D., Shoaib, M., Wang, H., Qing, X., Rajput, D. S., Pan, K., & Ni, X. (2020). Probiotics mitigating subclinical necrotic enteritis (SNE) as potential alternatives to antibiotics in poultry. *AMB Express*, 10(1), 1–10.
- Khan, M., Ferdous, J., Ferdous, M., Islam, M., Rafiq, K., & Rima, U. (2019). Study on indiscriminate use of antibiotics in poultry feed and residues in broilers of Mymensingh city in Bangladesh. *Progressive Agriculture*, 29(4), 345–352.
- Khan, R. U., & Naz, S. (2013). The applications of probiotics in poultry production. *World's Poultry Science Journal*, 69(3), 621–632.
- King, A. H. (1995). Encapsulation of Food Ingredients. In *available technology, focusing on hydrocolloid* (pp. 26–39).
- Kizerwetter-Świda, M., & Binek, M. (2006). Adhesion properties of *Lactobacillus* strain of poultry origin and characterisation of its antibacterial product. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 50(4), 439–443.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13.
- Krishnasamy, V., Otte, J., & Silbergeld, E. (2015). Antimicrobial use in Chinese swine and broiler poultry production. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 4(1), 1–9.
- Larsen, N., Cahú, T. B., Isay Saad, S. M., Blennow, A., & Jespersen, L. (2018). The effect of pectins on survival of probiotic *Lactobacillus* spp. in gastrointestinal juices is related to their structure and physical properties. *Food Microbiology*, 74, 11–20.
- Lee, K. Y., & Heo, T. R. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 869–873.
- Li, K., Wang, B., Wang, W., Liu, G., Ge, W., Zhang, M., Yue, B., & Kong, M. (2019). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* BNCC 134415 under lyophilization enhances cell viability during cold storage and pasteurization, and in simulated gastrointestinal fluids. *LWT*, 116, 108521.
- Liliana, S. C., & Vladimir, V. C. (2013). Probiotic encapsulation. *African Journal of Microbiology Research*, 7(40), 4743–4753.
- Lilly, Daniel M., and R. H. S. (1965). Probiotics growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), 747–748.
- Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(1–2), 73–83.
- Manini, F., Casiraghi, M. C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., & Plumed-Ferrer, C. (2016). Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 275–283.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., & Huis, J. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*, 80(6), 1031–1037.
- Mathlouthi, N., Auclair, E., & Larbier, M. (2012). Effect of yeast cell wall on growth

- performances of broiler chicks. *Livestock Research for Rural Development*, 24(11).
- Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food*, 105(3), 281–295.
- McLoughlin, A., & 1994, U. (1994). Controlled release of immobilized cells as a strategy to regulate ecological competence of inocula. *In Biotechnics wastewater* (pp. 1-45)Springer, Berlin, Heidelberg.
- Mehdi, Y., Létourneau-Montminy, M. P., Gaucher, M. Lou, Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Brar, S. K., Côté, C., Ramirez, A. A., & Godbout, S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*, 4(2), 170–178.
- Mishra, V., & Prasad, D. N. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 109-115.
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(1), 1–18.
- Muhammad, J., Khan, S., Su, J. Q., Hesham, A. E. L., Ditta, A., Nawab, J., & Ali, A. (2020). Antibiotics in poultry manure and their associated health issues: a systematic review. *Journal of Soils and Sediments*, 20(1), 486–497.
- Naqash, F., Masoodi, F. A., Rather, S. A., Wani, S. M., & Gani, A. (2017). Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin—A Review. *In Carbohydrate Polymers*, 168, 227–239.
- Nishiyama, K., Seto, Y., Yoshioka, K., Kakuda, T., Takai, S., Yamamoto, Y., & Mukai, T. (2014). *Lactobacillus gasseri* sbt2055 reduces infection by and colonization of campylobacter jejuni. *PLoS ONE*, 9(9), 1–9.
- Orive, G., Hernández, R. M., Rodríguez Gascón, A., Calafiore, R., Chang, T. M. S., De Vos, P., Hortelano, G., Hunkeler, D., Laci, I., & Pedraz, J. L. (2004). History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends in Biotechnology*, 22(2), 87–92.
- Osman, N., Ahmed, S. A. M., Shibat El-hamd, D. M. W., & Ahmed, A. I. (2020). Characterization and assessment of naturally mutant non-pathogenic O27 strain *Escherichia coli* and their potential use as poultry probiotics. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 7(3), 374–383.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295-304.
- Ouwehand, A. C., & Salminen, S. J. (1998). The Health Effects of Cultured Milk Products with Viable and Nonviable Bacteria Related papers The Health Effects of Cultured Milk Products with Viable and Non-viable Bacteria. *International Dairy Journal*, 8(9), 749–758.
- Pak, D., Muthaiyan, A., Story, R., ... C. O.-J. of F., & 2013, U. (2013). Fermentative capacity of three strains of *Lactobacillus* using different sources of carbohydrates: *in vitro* evaluation of synbiotic effects, resistance and tolerance. *Academia.Edu*, 2(1), 158–167.
- Pandey, S., Senthilguru, K., Uvanesh, K., Sagiri, S. S., Behera, B., Babu, N., Bhattacharyya, M. K., Pal, K., & Banerjee, I. (2016). Natural gum modified emulsion gel as single carrier for the oral delivery of probiotic-drug combination. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 504–514.

- Patel, S. G., Raval, A. P., Bhagwat, S. R., Sadrasaniya, D. A., Patel, A. P., & Joshi, S. S. (2015). Effects of Probiotics Supplementation on Growth Performance, Feed Conversion Ratio and Economics of Broilers. *Journal of Animal Research*, 5(1), 155–160.
- Peanparkdee, M., Iwamoto, S., & Yamauchi, R. (2016). Microencapsulation: a Review of Applications in the Food and Pharmaceutical Industries. *Reviews in Agricultural Science*, 4, 56–65.
- Peng, Q., Zeng, X. F., Zhu, J. L., Wang, S., Liu, X. T., Hou, C. L., Thacker, P. A., & Qiao, S. Y. (2016). Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* B1 on growth performance, intestinal microbiota, and short chain fatty acid profiles in broiler chickens. *Poultry Science*, 95(4), 893–900.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., & Villani, F. (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science*, 67(2), 309–317.
- POT, Bruno et GRANGETTE, C. (2015). Dothead dossier Sous-dothead Pré-et probiotiques: l'avenir?.
- Raddatz, G. C., de Souza da Fonseca, B., Poletto, G., Jacob-Lopes, E., Cichoski, A. J., Muller, E. I., Flores, E. M. M., de Bona da Silva, C., & Ragagnin de Menezes, C. (2020). Influence of the prebiotics hi-maize, inulin and rice bran on the viability of pectin microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obtained by internal gelation/emulsification. *Powder Technology*, 362, 409–415.
- Rajput, D. S., Zeng, D., Khalique, A., Rajput, S. S., Wang, H., & Zhao, Y. (2020). Pretreatment with probiotics ameliorate gut health and necrotic enteritis in broiler chickens, a substitute to antibiotics. *AMB Express*, 10(1), 220.
- Ramlucken, U., Roets, Y., Ramchuran, S. O., Moonsamy, G., Rensburg, J. Van, Thantsha, M. S., Lalloo, R., Africa, S., & Africa, S. (2020). Isolation, selection and evaluation of *Bacillus* spp. as potential multi-mode probiotics for poultry. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2019-11.
- Redweik, G. A. J., Stromberg, Z. R., Van Goor, A., & Mellata, M. (2020). Protection against avian pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella kentucky* exhibited in chickens given both probiotics and live *Salmonella* vaccine. *Poultry Science*, 99(2), 752–762.
- Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, R. U., & Jahid, I. K. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–20.
- Reid, A. A., Champagne, C. P., Gardner, N., Fustier, P., & Vuilleumard, J. C. (2007). Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey proteins gel particles. *Journal of Food Science*, 72(1), M031-M037.
- Riaz Rajoka, M. S., Shi, J., Zhu, J., Shao, D., Huang, Q., Yang, H., & Jin, M. (2017). Capacity of lactic acid bacteria in immunity enhancement and cancer prevention. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 35–45.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. In *Phytochemistry*, 57(6), 929–967.
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., & Sato, H. H. (2020). Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review. *Food Research International*, 137(109682.10), 1016.
- Rodrigues, Fábio J., Omura, M. H., Cedran, M. F., Dekker, R. F. H., Barbosa-Dekker, A. M., & Garcia, S. (2017). Effect of natural polymers on the survival of *Lactobacillus*

- casei* encapsulated in alginate microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 34(5), 431–439.
- Sagheddu, V., Guidesi, E., Galletti, S., & Elli, M. (2019). Selection and Characterization Criteria of Probiotics Intended for Human Use from the Past to the Future. *Food Science and Nutrition Studies*, 3(2), p73.
- Salari, M., Razavi, S. H., & Gharibzahedi, S. M. T. (2015). Characterising the synbiotic beverages based on barley and malt flours fermented by *Lactobacillus delbrueckii* and *paracasei* strains. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 7(3), 355–361.
- Salehizadeh, M., Modarressi, M. H., Mousavi, S. N., & Ebrahimi, M. T. (2019). Effects of probiotic lactic acid bacteria on growth performance, carcass characteristics, hematological indices, humoral immunity, and IGF-I gene expression in broiler chicken. *Tropical Animal Health and Production*, 51(8), 2279–2286.
- Sanders, M. E. (2003). Probiotics: Considerations for Human Health. *Nutrition Reviews*, 61(3), 91–99.
- Saraf, N. M., Alat, D. V., & Chakrabarti, R. (2007). Microencapsulation at an affordable price. *Colourage*, 54(9), 66.
- Schoster, A., Kokotovic, B., Permin, A., Pedersen, P. D., Bello, F. D., & Guardabassi, L. (2013). *In vitro* inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains. *Anaerobe*, 20(3), 36–41.
- Selaledi, L. A., Hassan, Z. M., Manyelo, T. G., & Mabelebele, M. (2020). The current status of the alternative use to antibiotics in poultry production: An African perspective. *Antibiotics*, 9(9), 1–18.
- Shah, N., Technology, R. R.-A. J. of D., & 2000, U. (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55(3), 139.
- Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of Food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 501–547.
- Shanmugasundaram, R., Mortada, M., Murugesan, G. R., & Selvaraj, R. K. (2019). *In vitro* characterization and analysis of probiotic species in the chicken intestine by real-time polymerase chain reaction. *Poultry Science*, 98(11), 5840–5846.
- Shewale, R. N., Sawale, P. D., Khedkar, C. D., Singh, A., & Sahib, S. F. (2014). Selection criteria for probiotics : a review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 9(1/2), 17.
- Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., & Ho, Y. W. (2017). Probiotics: From Isolation to Application. *Journal of the American College of Nutrition*, 36(8), 666–676.
- Shori, A. B. (2017). Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(1), 1–5.
- Simon, O. (2005). Micro-organisms as feed additives-probiotics. *Advances in Pork Production*, 16(2), 161–167.
- Sirilun, S., Chaiyasut, C., Kantachote, D., & Luxananil, P. (2010). Characterisation of non human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering property. *African Journal of Microbiology Research*, 4(10), 994–1000.
- Smialek, M., Burchardt, S., & Koncicki, A. (2018). The influence of probiotic supplementation in broiler chickens on population and carcass contamination with *Campylobacter* spp. - Field study. *Research in Veterinary Science*, 118, 312–316.
- Smidsrød, O., & Skjåk-Bræk, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells.

- Trends in Biotechnology* 8, 71–78.
- Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013). Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed Research International*.
- Stenson, L. R., Klaenhammer*, T. R., & Swaisgood, H. E. (1987). Calcium Alginate-Immobilized Cultures of Lactic Streptococci are Protected from Bacteriophages. *Journal of Dairy Science*, 70(6), 1121–1127.
- Stummer, S., Toegel, S., Rabenreither, M. C., Unger, F. M., Wirth, M., Viernstein, H., & Salar-Behzadi, S. (2012). Fluidized-bed drying as a feasible method for dehydration of *Enterococcus faecium* M74. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 156–165.
- 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(1–2), 47–55.
- Sun, W., & Griffiths, M. W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1), 17–25.
- Sunohara, H., Ohno, T., Shibata, N., & Seki, K. (1995). Process for producing capsule and capsule obtained thereby. *U.S. Patent and Trademark Office*, 5, 478-570.
- Suresh, G., Das, R. K., Kaur Brar, S., Rouissi, T., Avalos Ramirez, A., Chorfi, Y., & Godbout, S. (2017). Alternatives to antibiotics in poultry feed: molecular perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(3), 318–335.
- Tavakoli, M., Hamidi-Esfahani, Z., Hejazi, M. A., Azizi, M. H., & Abbasi, S. (2017). Characterization of Probiotic Abilities of Lactobacilli Isolated from Iranian Koozeh Traditional Cheese. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 67(1), 41–48.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 225–241.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., & Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 393s-398s.
- Uludag, H., De Vos, P., & Tresco, P. A. (2000). Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 42(1–2), 29–64.
- V. Mishra & D.N. Prasad. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 109–115.
- Varankovich, N. V., Nickerson, M. T., & Korber, D. R. (2015). Probiotic-based strategies for therapeutic and prophylactic use against multiple gastrointestinal diseases. *Frontiers in Microbiology*, 6, 685.
- Vasiee, A., Falah, F., Behbahani, B. A., & Tabatabaee-yazdi, F. (2020). Probiotic characterization of *Pediococcus* strains isolated from Iranian cereal-dairy fermented product: Interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line Caco-2. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 130(5), 471–479.
- Vineetha, P. G., Tomar, S., Saxena, V. K., Susan, C., Sandeep, S., Adil, K., & Mukesh, K. (2016). Screening of *Lactobacillus* isolates from gastrointestinal tract of guinea fowl for probiotic qualities using *in vitro* tests to select species-specific probiotic candidates. *British Poultry Science*, 57(4), 474–482.

- Wang, C. Y., Lin, P. R., Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese sepickled cabbage. *Anaerobe*, 16(6), 578-585.
- Wang, H., Ni, X., Qing, X., Liu, L., Lai, J., Khaliq, A., Li, G., Pan, K., Jing, B., & Zeng, D. (2017). Probiotic enhanced intestinal immunity in broilers against subclinical necrotic enteritis. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV), 1592.
- Wu, Y., Shao, Y., Song, B., Zhen, W., Wang, Z., Guo, Y., Shahid, M. S., & Nie, W. (2018). Effects of *Bacillus coagulans* supplementation on the growth performance and gut health of broiler chickens with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9(1), 1-14.
- Yazhini, P., Visha, P., Selvaraj, P., Vasanthakumar, P., & Chandran, V. (2018). Dietary encapsulated probiotic effect on broiler serum biochemical parameters. *Veterinary World*, 11(9), 1344-1348.
- Yu, Z., Zhang, X., Li, S., Li, C., Li, D., & Yang, Z. (2013). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(3), 489-498.
- Yucel Falco, C., Falkman, P., Risbo, J., Cárdenas, M., & Medronho, B. (2017). Chitosan-dextran sulfate hydrogels as a potential carrier for probiotics. *Carbohydrate Polymers*, 172, 175-183.
- Zaghari, M., Sarani, P., & Hajati, H. (2020). Comparison of two probiotic preparations on growth performance, intestinal microbiota, nutrient digestibility and cytokine gene expression in broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research*, 48(1), 166-175.
- Zhang, L., Zhang, L., Zhan, X., Zeng, X., Zhou, L., Cao, G., Chen, A., & Yang, C. (2016). Effects of dietary supplementation of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune response, intestinal barrier function, and digestive enzyme activity in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 1-9.

Résumé :

Les probiotiques sont un moyen naturel qui affectent avantageusement la santé de l'hôte. Ils se présentent comme une alternative sur la plan santé et productivité, ayant la même efficacité avec les antibio-supplémentations, notamment dans la promotion des performances de croissance des poulets de chair et leur protection contre les agents pathogènes. Ce travail s'intéresse à l'étude des caractères probiotiques de deux souches de *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus acidilactici*, *in-vitro*, ainsi que l'élaboration d'un protocole d'encapsulation de ces dernières en utilisant une matrice d'iota-carraghénane. Plusieurs essais ont été réalisés afin d'optimiser la méthode d'encapsulation en utilisant différentes concentrations du polymère et en utilisant les deux techniques d'extrusion et d'émulsion. Les résultats obtenus ont montré des taux de survie de l'ordre de 47 % (*Lb. plantarum*) et de 67% (*Pd. acidilactici*) au pH 2 et de 85-87 % en présence de la bile (0,3-0,4 %). Le test d'adhésion sur microplaque en polystyrène a montré que les deux souches sont douées d'un pouvoir d'adhésion. Toutefois, la souche de *Lb. plantarum* s'est révélée plus adhérente que celle de *Pd. acidilactici*. Les deux souches ont montré une sensibilité aux antibiotiques largement utilisés en aviculture, notamment les β -lactamines et l'oxytétracycline. Une CMI inférieure ou égale à 0,025 mg/ml de l'oxytétracycline a été enregistrée pour les deux souches, tandis que celle de l'enrofloxacin était égale à 0,1 mg/ml. La méthode d'encapsulation par extrusion a enfin été retenue pour l'encapsulation des souches étudiées avec une efficacité de 84%- 97%.

Mots clés : Probiotiques ; *Lactobacillus plantarum* ; *Pediococcus acidilactici* ; poulet de chair ; Encapsulation.

Abstract:

Probiotics are a natural mean affecting beneficially the health of the host. They are an alternative to the antibio-supplementations having the same effectiveness for health and productivity, especially in the promotion of growth performance of broiler chicken and their protection against pathogens. This work focused on the *in-vitro* study of the probiotic characteristics of two strains belonging to *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*, as well as the elaboration of an encapsulation protocol for these bacteria, by using a matrix of iota-carrageenan. Several attempts were carried out in order to optimize the encapsulation method, by using different concentrations of the polymer and both of extrusion and emulsion techniques. The results obtained showed a survival rates of 47 % (*Lb. plantarum*) and 67% (*Pd. acidilactici*) at pH 2 and of 85-87 % in the presence of bile (0.3-0.4 %). The adhesion test on polystyrene microplaque showed that the two strains are adherent. Nevertheless, the strain of *Lb. plantarum* was more adherent than that of *Pd. acidilactici*. Both strains were sensitive to the antibiotics largely used in aviculture, especially the β -lactams and oxytetracycline. A MIC less or equal to 0.025 mg/ml of oxytetracycline was registered for the two strains, whereas that of enrofloxacin was equal to 0.1 mg/ml. The extrusion encapsulation method was finally selected for the encapsulation of the studied strains with an efficiency of 84%- 97%.

Key words: Probiotics; *Lactobacillus plantarum*; *Pediococcus acidilactici*; Broiler chicken; Encapsulation.