

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE SCIENCES ALIMENTAIRE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

KEHILA EL-YACINE

DAHAAH ILYES

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRE

Spécialité: Nutrition et pathologie

THÈME

Exploration de l'activité anti-oxydante de certaines
bactéries lactiques isolées à partir des anchois

Soutenue publiquement le 30/06/2019

DEVANT LE JURY

Présidente	Dr. Keddari Soumia	MCA Univ-mosta.
Promotrice	Dr. Yahla Imène	MCB Univ-mosta.
Examineur	Dr. Chaalal Abdelmalek	MCA Univ-mosta.

*Thème réalisé au de Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments
Fonctionnels et de la santé –LMBAFS*

Année universitaire : 2018-2019

Remerciements

Avant tout nous remercions **le bon Dieu** le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la patience qui nous a permis de réaliser ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous tenons tout particulièrement à adresser nos remerciements à notre encadreur, **Dr. Yahla Imène** qui nous a fait l'honneur de diriger notre mémoire sur un sujet passionnant et nous a bien voulu prendre en charge et nous a guidé tout au long de son élaboration, nous lui sommes très reconnaissants pour ces conseils, sa disponibilité et son sérieux dans le travail.

Nos remerciements sont adressés également au **Dr. Keddari Soumia** d'avoir accepté de présider le jury et à **Dr. Chaalal Abdelmalek** d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nos remerciements s'adressent également aux personnes qui ont participé à réaliser ce travail, particulièrement la technicienne du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la santé -LMBAFS-..

Enfin nous remercions tous les étudiants de la promotion de master II Nutrition et pathologie 2018-2019.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*Aux deux personnes les plus chers au monde que
Je ne remerciais jamais assez pour leurs aides,
encouragements, Soutiens, sacrifices et leur patience
pendant toute ma vie :*

Mes chers parents

A toute la famille DAHAH

*Tous mes chers amis qui ont été toujours avec moi
avec leurs aides et soutiens*

*A mon Binôme «YACINE» qui a partagée avec moi les
moments*

difficiles de ce travail et sa famille.

*Sans oublier mes braves Amies de la promotion Master II
NUTRITION ET PATHOLOGIE 2018/2019.*

Ilyes

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*Deux personnes les plus chers au monde que
Je ne remercierais jamais assez pour leurs aides,
encouragements, Soutiens, sacrifices et leur patience
pendant toute ma vie :*

Mes chers parents

A toute la famille KEHILA

A mon encadreur Madame YAHLA pour sa compréhension

*Tous mes chers amis qui ont été toujours avec moi
avec leurs aides et soutiens*

*A mon Binôme «ILYES» qui a partagée avec moi les moments
difficiles de ce travail et sa famille.*

Sans oublier mes braves Amies de la promotion Master II

NUTRITION ET PATHOLOGIE 2018/2019.

Yacine

Résumé

Notre étude vise à explorer l'activité anti oxydante de 9 souches de bactéries lactiques, dont 8 ont été nouvellement isolées à partir des anchois *Engraulis encrasicolus* et la souche probiotique de référence Bb12. Tout d'abord, les souches ont été testées pour leur pouvoir réducteur qui consiste à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . Par la suite leur capacité de piégeage des radicaux libres a été explorée par le test du DPPH. Enfin, le test d'anti peroxydation lipidique a été réalisé par le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbutirique (TBARS). Les résultats obtenus montrent que les souches possèdent un très bon pouvoir réducteur allant jusqu'à 137.2% tandis que le taux minimum était à raison de 39.5%. Concernant le piégeage des radicaux libres, toutes les souches testées ont prouvé leurs potentiels, les taux variaient entre 70.4 et 89.01%. De même, toutes les souches ont prouvé leur effet anti peroxydation lipidique avec des taux allant de 81.5 à 96.6%.

Mots clés : bactéries lactiques, pouvoir réducteur, effet anti oxydant, peroxydation lipidique.

Abstract

Our study aims to explore the antioxidant activity of 9 lactic acid bacteria strains, of which 8 have been newly isolated from anchovy *Engraulis encrasicolus* and the probiotic strain Bb12 reference. First, the strains were tested for reducing power of ferric iron Fe^{3+} to ferrous Fe^{2+} iron. Thereafter their trapping ability of free radicals was investigated by DPPH test. Finally, the test anti lipid peroxidation was carried out by the determination of reactive substances thiobarbutirique acid (TBARS). The results show that strains have a very good reduction power of up to 137.2%, while the minimum rate was due to a 39.5%. Regarding the free radical scavenging, all strains tested have proven their potential, rates ranged between 70.4 and 89.01%. Similarly, all the strains have proven anti lipid peroxidation effect with rates ranging from 81.5 to 96.6%.

Keywords: lactic acid bacteria, reducing power, antioxidant effect, lipid peroxidation.

ملخص

تهدف دراستنا إلى استكشاف نشاط مضادات الأكسدة في 9 سلالات من بكتيريا حمض اللبنيك ، 8 منها تم عزلها حديثاً من الأنشوجة *Engraulis encrasicolus* والسلالة المرجعية بروبيوتيك Bb12. أولاً ، تم اختبار السلالات لقدرتها على الاختزال والتي تتكون من تقليل الحديد الحديدي Fe^{3+} إلى الحديد الحديدي Fe^{2+} . في وقت لاحق تم استكشاف قدرتها على تفكيك الجذور الحرة من خلال اختبار DPPH. أخيراً ، تم إجراء اختبار مضاد للأكسدة الدهني بواسطة تحديد المواد المتفاعلة مع حمض الثيوبار بوتيك (TBARS). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن السلالات لديها قدرة خفض جيدة جداً تصل إلى 137.2% بينما كان الحد الأدنى للمعدل 39.5%. فيما يتعلق بكشف الجذور الحرة ، أثبتت جميع السلالات التي تم اختبارها إمكاناتها ، تراوحت المعدلات بين 70.4 و 89.01%. وبالمثل ، أثبتت جميع السلالات تأثير بيروكسيد مضاد للدهون بمستويات تتراوح من 81.5 إلى 96.6%.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية ، تقليل القدرة ، تأثير مضادات الأكسدة ، بيروكسيد الدهون.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

Abs : Absorbance

C₂HCl₃O₂ : Acide trichloroacétique

°C : Degré Celsius.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

e⁻ : Electron.

Fe²⁺ : Fer ferrique.

Fe³⁺ : Fer ferreux.

Fe Cl₃ : Trichlorure de fer.

H₂ O₂ : Eau oxygénée

K₄ [Fe(CN)₆] : Ferrocyanure de potassium

LAB : Bactéries lactiques

ml : Millilitre.

MRS : Milieu de Man Rogosa Sharpe

µl: microlitre

Na Cl: Chlorure de sodium

nm : Nanomètre.

PBS : Phosphate buffered saline (*tampon* phosphate salin)

PI % : Pourcentage d'inhibition.

pH: potentiel Hydrogène

ROS : Espèce réactives de l'oxygène.

TCA : Acide trichloracétique.

V/V : Volume par volume.

Liste des tableaux

- Tableau 01 :** Bactéries lactiques dans le tractus gastro-intestinal et les excréments des poissons
(Ringø,1998) **P14**
- Tableau 02 :** Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées
(Koechlin-Ramonatxo, 2006). **P28**
- Tableau 03:** Les différentes souches utilisées dans les testes étudiées **P30**

Liste des figures

- Figure 01** : Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (*in* Makhloufi, 2011) **P4**
- Figure 02** : Micrographie électronique de *Lb.plantarum* (x 10000) (Kunkel, 2004). **P6**
- Figure 03** : Micrographie électronique de *S. thermophilus* (Mauguin, 1991). **P6**
- Figure 04** : Principales espèces utilisées comme probiotiques et exemples des souches commercialisées. Source photos Scimat. **P18**
- Figure 05** : Représentation schématique de la réactivation des souches lactiques. **P31**
- Figure06** : Dilutions décimales préparées par les PBS à partir de la solution mère. **P32**
- Figure 07** : Réaction de teste du pouvoir réducteur du Fe³⁺ en Fe²⁺. **P33**
- Figure08** : Test du pouvoir réducteur des bactéries lactiques. **P34**
- Figure09** : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Congo, 2012). **P35**
- Figure10** : un schéma représente les étapes du teste de la Capacité de Piégeage des radicaux libres par le DPPH **P36**
- Figure11** : Test de la Peroxydation anti-lipidique **P38**
- Figure12** : Activité réductrice des souches lactiques étudiées. **P39**
- Figure13** : Pourcentages d'inhibition du DPPH de 9 souches lactiques étudiées. **P41**
- Figure14**: Pourcentages de l'effet d'anti peroxydation lipidique des souches lactiques **P42**

Table des matières

Dédicaces

Remerciements

Résumé

Abstract

المخلص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Chapitre I : Bactéries lactiques

I.1. Définition et caractérisation des bactéries lactiques.....	03
I.2. Habitat et origine des bactéries lactiques.....	03
I.3. Classification des principaux genres de bactéries lactiques.....	05
I.3.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	05
I.3.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	05
I.3.3. Le genre <i>Leuconostoc</i>	05
I.3.4. Le genre <i>Streptococcus</i>	07
I.3.5. Le genre <i>Pediococcus</i>	07
I.3.6. Le genre <i>Enterococcus</i>	07
I.4. Rôle et intérêt des bactéries lactiques.....	07
I.4.1. Domaine alimentaire.....	07
I.4.1.1. Rôle sur la structure et la texture.....	07
I.4.1.2. Rôle dans la conservation.....	08
I.4.1.3 Rôle sur les caractéristiques organoleptiques.....	08
I.4.2. Domaine de santé.....	08
I.5. Propriétés technologiques des bactéries lactiques.....	08
I.5.1. Activité acidifiante.....	09

I.5.2. Activité lipolytique.....	10
I.5.3 Activité protéolytique.....	11
I.6. Les bactéries lactiques dans les poissons marins.....	11

Chapitre II : Les probiotiques

II.1. Historique et définition des probiotiques.....	16
II.2. Principales espèces des probiotiques :probiotiques générales.....	17
II.3. Effets des probiotiques sur la santé humaine.....	19
II.3.1. Sur le tractus gastro-intestinal.....	19
II.3.1.1. Protection contre les maladies inflammatoires du tube digestif.....	19
II.3.1.2. Les probiotiques et les infections gastro-intestinales.....	20
II.3.1.3. Les probiotiques et la prévention du cancer du colon.....	20
II.3.1.4. Les probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin.....	20
II.3.1.5. Les probiotiques et la perméabilité intestinale.....	20
II.3.1.5. Les probiotiques et la motilité de l'intestin.....	20
II.4. Autres effets des probiotiques.....	21
II.5. Applications des probiotiques	21
II.5.1. Traitement des diarrheas.....	22
II.5.2. Traitements gastriques.....	22
II.6. Mécanismes d'actions des Probiotiques.....	22
II.6.1. Inhibition de l'adhésion des pathogènes : phénomène de compétition/exclusion..	22
II.6.2. Production de substances antimicrobiennes.....	23
II.6.2.1. Les bactériocines.....	23
II.6.2.2. Les acides organiques.....	23
II.6.2.3. Le peroxyde d'hydrogène.....	24
II.6.3. Stimulation de l'activité du système immunitaire intestinale.....	24
II.6.4. Allégations santé associées à la consommation des probiotiques.....	24

Chapitre III : Stress oxydatif et activité antioxydant

III.1. Activité antioxydante.....	25
III.2. Le stress oxydant.....	25
III.3. Les radicaux libres.....	25
III.4. Les antioxydants.....	26
III.4.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques).....	26
III.4.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques).....	27
III.5. Mécanismes d'action des antioxydants.....	27

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

IV .1. Matériels.....	29
IV .1.1. Présentation du lieu de l'étude expérimental	29
IV .1.2. Matériels expérimentaux	29
IV .1.2.1. Origine des souches lactiques.....	29
IV.1.3. Les milieux de culture	30
IV.1.4. Appareillage	30
IV.2. Méthodes.....	30
IV.2. Repiquage et réactivation des souches	30
IV.3. Préparation de l'inoculum.....	30
IV.4. Ajustement de l'inoculum	31
IV.5. Préparation des dilutions décimales.....	31
IV.6. Méthodes.....	32
IV.6.1. Pouvoir réducteur des bactéries.....	32
IV.6.2. Capacité de Piégeage des radicaux libres par 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle(DPPH)	35
IV.6.3. Peroxydation anti-lipidique	37

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Evaluation du pouvoir réducteur.....	39
V.2. Piégeage du radical libre DPPH.....	40
V.3. Effet anti peroxydation lipidique	42
Conclusion	44
Références bibliographiques	45
Annexes	57

Introduction

INTRODUCTION

Il existe de fortes preuves que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les radicaux libres jouent un rôle important dans de nombreuses maladies dégénératives comme le cancer, l'athérosclérose et le diabète (Beckman et Ames, 1998). Les aliments contenant des substances antioxydantes peuvent être utiles pour la prévention de ces maladies. La formation de radicaux libres, tels que le radical anion superoxyde et le radical hydroxyle, est une conséquence inévitable pour les organismes aérobies pendant la respiration. Ces radicaux sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres groupes ou substances dans le corps, entraînant des lésions cellulaires ou tissulaires. Le corps a son propre système de défense contre les ROS à base d'enzymes antioxydantes, ainsi que de composés antioxydants non enzymatiques à faible masse moléculaire. Ces systèmes de défense ne sont pas assez efficaces pour totalement prévenir les dommages, et donc, les compléments alimentaires contenant des antioxydants peuvent être utilisés pour aider le corps à réduire les dommages oxydatifs (Zommara et al. 1996; Oxman et al. 2000; Terahara et al. 2001; Kullisaar et al. 2003).

Les bactéries lactiques (LAB) sont connues par plusieurs effets bénéfiques, tels que l'activité antimicrobienne, la capacité de moduler la réponse immunitaire et les effets anti-tumoraux (Kullisaar et al. 2002; Saarela et al. 2002; Mikelsaar et al. 2004). Il a été démontré que certains lactobacilles possèdent une activité antioxydante et sont capables de diminuer le risque d'accumulation des ROS lors de l'ingestion d'aliments (Kaizu et al. 1993). Les LAB sont capables de dégrader l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (Korpela et al. 1997; Miller et Britigan 1997; Kullisaar et al. 2002). L'objectif de notre étude consiste à explorer l'activité antioxydante de certaines bactéries lactiques nouvellement isolées à partir de l'anchois *Engraulis encrasicolus*.

CHAPITRE I :
LES BACTERIES
LACTIQUES

CHAPITRE I : LES BACTERIES LACTIQUES

I-1-Définition et caractérisation des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes unicellulaires, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (De Roissart, 1986). C'est-à-dire qu'elles tirent leur énergie de la dégradation de matière organique. Il s'agit de réaction d'oxydation qui se fait par déshydrogénation (parfois couplée à une hydratation ou à une décarboxylation) (Guiraud, 1998).

En plus de ces caractères biochimiques, il convient de prendre en compte leurs caractères microbiologiques :

- Les bactéries lactiques sont Gram (+).
- Elles ne sont pas sporulées.
- Elles sont pour la plupart immobiles.
- Elles sont dépourvues de cytochromes, étant incapable d'effectuer la synthèse du noyau hème des porphyrines donc sont incapables de respirer mais peuvent seulement effectuer un métabolisme fermentaire (Guiraud, 1998)

I.2. Habitat et origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques (Mechai, 2009). Elles sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (Makhloufi, 2012).

Par exemple, dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages,...) (Makhloufi, 2012). Aussi, elles peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que les genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes

responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis* pathogène responsable de la trichomonas vaginale (Bjorkroth et Holzapfel, 2006, Ruiz et al, 2009) et/ ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (Makhloufi, 2012).

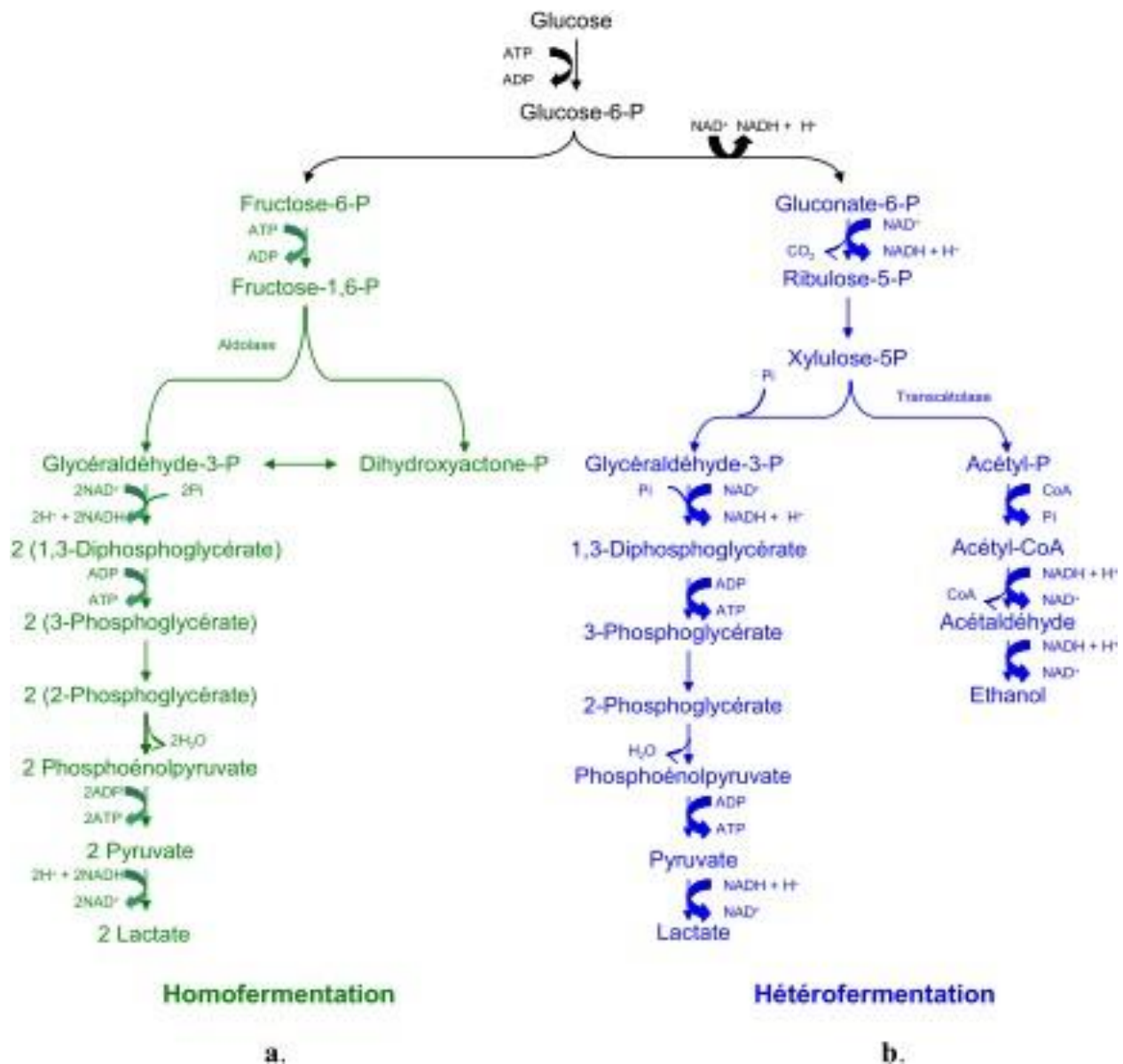


Figure 01 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (in Makhloufi, 2011)

ATP : adénosine triphosphate.

ADP : adénosine diphosphate.

NAD⁺/ NADH, H⁺ : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.

Pi : phosphate inorganique

I.3. Classification des principaux genres de bactéries lactiques

I.3.1. Le genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou elles sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, qui se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les Lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acide aminé, en vitamines, en acide gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et *al.*, 1994).

I.3.2. Le genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* est formé de bactéries à Gram positif dont les cellules, en forme de coques, sont associées par paires ou en chaînettes de longueur variable. Elles sont dépourvues de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (anaérobies aérotolérantes). Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6,5% de NaCl ou à pH 9,6. Leur température optimale de croissance s'étend de 25 à 35°C, respectivement pour les souches de *Lc. cremoris* et *Lc. lactis*. Les *Lactococcus* sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C. (Dellaglio et *al.*, 1994). Le genre *Lactococcus* représente les Streptocoques dits « lactiques », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers. (Pilet et *al.*, 2005).

I.3.3. Le genre *Leuconostoc*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ e d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissances, la capacité à croitre à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella*. (Pilet et *al.*, 1998 ; Ho et *al.*, 2007).

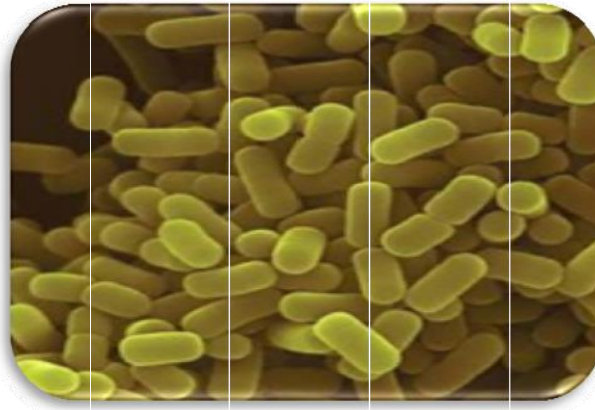


Figure 02 : Micrographie électronique de *Lb. plantarum* (x 10000) (Kunkel, 2004).

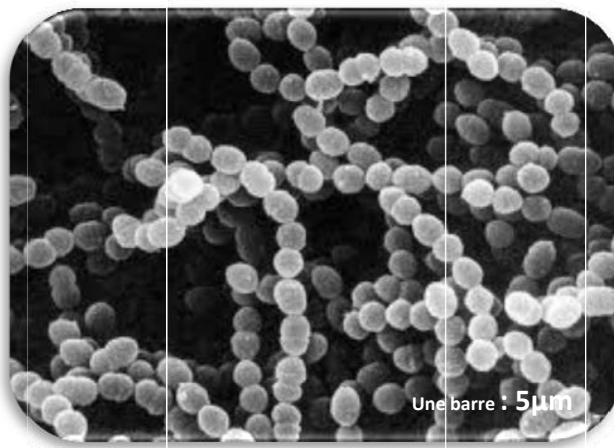


Figure 03 : Micrographie électronique de *S. thermophilus* (Mauguin, 1991).

Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des expolysaccharides. Les *Leuconostoc* principalement *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* et *Ln. Lactis* sont utilisés en association avec les Lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait. (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008).

I.3.4. Le genre *Streptococcus*

La seule espèce de streptocoque qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. (Stiles et Holzapfel, 1997). *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbone permettent de distinguer le *St.thermophilus* de la plupart des autres Streptocoques. (Haddie, 1986 ; Pilet et al., 2005).

I.3.5. Le genre *Pediococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl. (Pilet et al., 2005).

I.3.6. Le genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobile, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (Tamime et al.,2002).

I-4-Rôle et intérêt des bactéries lactiques

I-4-1-Domaine alimentaire

I-4-1-1 Rôle sur la structure et la texture

L'acidification provoque la formation d'un caillé +ou- ferme selon les bactéries lactiques présentes. Selon les produits, la texture recherchées est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé ; kéfir). Pour obtenir une consistance déterminée, l'utilisation des souches plus ou moins acidifiantes peut être couplée à celle des souches productrices de polysaccharides (Satura et Federighi, 1998).

I-4-1-2 Rôle dans la conservation

***Production d'acide lactique :** Les bactéries lactiques ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.

***Production de bactériocine :** Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactique, ils sont généralement thermorésistants.

I-4-1-3-Rôle sur les caractéristiques organoleptiques : Par production en dehors de l'acide lactique, d'autres produits tels que le diacétyle et l'acétaldéhyde, qui responsable des saveurs caractéristiques (Boudjemaa, 2008).

I-4-2- Domaine de santé

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les *Lactobacillus sp* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant la flore intestinale. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques. Les bienfaits des bactéries lactiques sont de plus en plus étudiés, certains sont bien établis d'autres restent encore controversés :

*Améliore la digestion de lactose.

*Le traitement de certaines infections ou diarrhées.

*Diminution du cholestérol sérique et dé-conjugaison des sels biliaires.

*Utilisation dans l'élaboration des vaccins (Calvez *et al.*, 2009).

I-5- Propriétés technologiques des bactéries lactiques.

Les progrès effectués dans la connaissance des bactéries lactiques ont mis en évidence une formidable diversité d'espèces et de souches, ainsi qu'un très large éventail de propriétés, allant bien au-delà du potentiel acidifiant. Ainsi, deux souches d'une même espèce peuvent manifester des propriétés extrêmement différentes, ce qui confère à tous les comportements physiologiques observés un caractère « souche dépendant » très marqué. A cela s'ajoutent d'autres facteurs plus spécifiques du contexte industriel. C'est le cas des associations de plusieurs souches, réalisées afin de constituer des ferments susceptibles de générer l'ensemble des propriétés requises pour l'élaboration d'un produit, ou des interactions de ces souches avec différentes matrices alimentaires qui correspondent à autant de milieux de culture particuliers. Tout ceci complique fortement la mise en œuvre et la maîtrise des bactéries lactiques dans les aliments (Corrieu et Luquet, 2008).

Outre l'innocuité, de nombreux autres critères interviennent dans le choix des bactéries lactiques qui sont appelées à jouer un rôle technologique dans la fabrication des aliments (Dacosta, 2000).

I-5-1- Activité acidifiante.

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Les progrès réalisés depuis plusieurs décennies, tant au niveau des connaissances scientifiques (principalement en génétique et en physiologie microbienne) que de l'industrialisation des procédés de fabrication (génie microbiologique et alimentaire), n'ont pas modifié l'intérêt porté à cette faculté majeure des bactéries lactiques que constitue leur potentiel acidifiant. Le processus d'acidification, étroitement associé à la croissance bactérienne, se traduit par l'accumulation progressive d'acide lactique dans le milieu de culture. Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique peuvent se résumer ainsi :

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés.
- Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des

matrices alimentaires.

- Limitation des risques de développement de flores pathogènes et de flores d'altération dans les produits finaux.

Comme indiqué précédemment la production d'acide lactique par les bactéries lactiques est souvent associée à leur croissance. Tous les facteurs influençant la croissance des bactéries lactiques ont donc une conséquence directe sur l'acidification. Chaque souche possède un taux de croissance et une vitesse spécifique d'acidification caractéristiques des conditions de culture utilisées; pH, température, concentration des substrats et la présence éventuelle de bactériophages (Béai et *al.*, 1994).

Dans la pratique industrielle, les principales voies permettant d'agir sur les profils d'acidification sont le choix des ferments, les doses d'ensemencement et les profils de température (Dacosta, 2000). Dans des conditions opératoires données, l'activité acidifiante des ferments dépend de la nature et de l'équilibre entre les différentes souches présentes. En particulier, la présence de certaines espèces ou mélanges d'espèces différentes va permettre d'obtenir l'activité voulue. Cependant, il est important de souligner qu'il existe une forte variabilité de l'activité acidifiante des bactéries lactiques, y compris au sein d'une même espèce, et que l'on ne maîtrise que de façon très imparfaite les effets des associations entre souches. De ce fait, la mise au point de ferments lactiques convenant à une application donnée est une tâche relativement longue et empirique (Corrieu et Luquet, 2008).

I-5-2- Activité lipolytique.

Il paraît, au travers des publications scientifiques, que les connaissances sur les activités estérasiques et lipolytiques des bactéries lactiques soient encore fragmentaires, pourtant, il semblerait qu'elles participent à l'élaboration de la flaveur de nombreuses denrées alimentaires, bien que parfois elles soient à l'origine d'altérations. Les bactéries lactiques possèdent des enzymes lipolytiques, capables d'hydrolyser une multitude d'esters d'acides gras, des substrats de tri-, di- et mono acylglycérols (Liu et *al.*, 2001). Les espèces appartenant aux genres *Lactococcus* et *Lactobacillus* sont généralement considérées comme ayant une activité lipolytique faible, en comparaison avec d'autres espèces de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium* (Chich et *al.*, 1997). Les lactocoques auraient une activité estérasique plus

importante que les lactobacilles. Parmi les souches de lactobacilles thermophiles, les activités lipolytiques de *Lb. delbrueckii ssp. lactis* et *Lb. acidophilus* sont supérieures à celles de *Lb. Delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Lb. helveticus*. Les souches de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs : *Lb. casei* et *Lb. plantarum*, possèdent un système estérasique plus actif que les hétérofermentaires strictes: *Lb. brevis* et *Lb. fermentum* (Talon et al., 2000). Les activités lipasiques sont maximales pendant la phase exponentielle de croissance, et sont dépendantes des milieux de cultures (Umemoto et sato, 1975; El Soda et al.,1986; Piatkiewicz ,1987 ; Kamaly et al., 1988; Papon et talon,1988).

I-5-3- Activité protéolytique.

La protéolyse joue un rôle clé dans plusieurs processus biologiques chez les bactéries lactiques: nutrition azotée, activation de protéines et dégradation de protéines. La machinerie protéolytique des bactéries lactiques est constituée d'un ensemble d'enzymes qui diffèrent par leur mécanisme catalytique, leur spécificité d'hydrolyse, leur localisation cellulaire et leur rôle. Les bactéries lactiques possèdent un système protéolytique complexe qui assure leur croissance dans des milieux à faibles concentrations en acides aminés libres et oligopeptides comme le lait (Kawai et al., 1999; Vasiljevic et al., 2005). Ce système comprend des protéases situées à la surface cellulaire pour briser la caséine en oligopeptides; des protéinases intracellulaire et des peptidases qui hydrolysent des oligopeptides et de ce fait, produisent les substances responsables de la flaveur et de la texture des produits fermentés (Hughes et al., 2002; Papamanoli et al., 2003 ; Ammor et al., 2005).

I-6- Les bactéries lactiques dans les poissons marins.

D'après la littérature, les bactéries lactiques font partie intégrante de la flore intestinale native des animaux aquatiques (Ringo et al., 1995). Cependant, elles ne seraient pas dominantes dans la microflore intestinale des poissons (juvéniles et adultes) à l'inverse des animaux terrestres homéothermes. Dans leur revue, Ringo et al. (1995) ont montré que la flore cultivable des Salmonidés était essentiellement composée de bactéries GRAM-, mais que quelques bactéries GRAM+ (*Lactobacillus sp.*) étaient également présentes en quantités plus faibles. Par ailleurs, (Hovda et al.2007) ont rapporté dans leurs études basées sur les techniques moléculaires, que les *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus sp.*, *Photobacterium phosphoreum* et *Bacillus sp.* étaient

dominantes dans la microflore intestinale des saumons de l'Atlantique. Cependant, il est bien connu que cette flore lactique du tube digestif du poisson est affectée quantitativement et qualitativement par des facteurs nutritionnels et environnementaux tels que les acides gras polyinsaturés, l'oxyde de chrome, le stress et la salinité (Ringø, 1998).

Dyer (1947) a décrit, dans sa première étude, que la morue atlantique (*Gadus morhua* L.) contient des lactobacilles sur la peau, les branchies et dans le tractus gastro-intestinal. Plus tard, en 1961, Kraus a isolé des bactéries appartenant au groupe des lactobacilles à partir des harengs (*Clupea harengus*). Kvasnikov et al. (1977) ont rapporté que les LAB font partie du microbiote normal des cyprinidés (*Cyprinidae*), des ésofidés (*Escocidae*) et des percidés (*Percidae*) et qu'elles sont présentes à plusieurs étapes de la vie (stade larvaire, l'alevin et juvénile) chez *Cyprinus carpio*, *Aristichthys nobilis* et *Hypophthalmichthys molitrix* (Ringo et al., 1997 ; Ringø et al., 2000 ; Denev, 2009). Aujourd'hui, il existe plusieurs publications confirmant que les lactobacilles font partie de la flore intestinale indigène du colin (*G. virens*), de la morue atlantique, du saumon atlantique (*Salmo salar* L.), de la truite arc-en-ciel, du loup atlantique (*Anarhichas lupus* L.) et de la char arctique (tableau 4).

Concernant les études sur les premiers stades de vie des poissons, des espèces de *Lactobacillus* sp. ont été trouvées après le quatrième jour d'éclosion dans les larves, ainsi que dans les alevins de la morue atlantique (Strøm et Olafsen, 1990 ; Strøm et Ringø, 1993). Récemment, l'espèce *C. divergens* a été trouvée dans les alevins du loup de mer (Denev, 2009).

Trust et Sparrow (1974) étaient les premiers qui ont isolé des bactéries appartenant au genre *Streptococcus* du petit et du gros intestin des salmonidés. Plus tard, plusieurs études ont été réalisées sur d'autres espèces de poissons tels que la charr arctique, l'anguille européenne (*A. anguilla*), la carpe commune (*C. carpio*), le poisson rouge (*C. auratus*) et la sériole (*Scophthalmus maximus* L.) (Tableau 4).

Dans la plupart de ces études, les prélèvements ont été effectués à partir de l'ensemble du tractus. Des bactéries du genre *Lactobacillus* ont été retrouvées dans du saumon (*Salmo salar*) (Ringø et al., 2000) et de l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus* L.) (Ringo et al., 1997). Des bactéries du genre *Carnobacterium* ont été isolées elles aussi de saumon (Joborn et al., 1997) et d'omble chevalier, ainsi que de la truite (Pilet et al., 1995 ; Huber et al., 2004 ; Kim et al., 2007), de la morue et du loup (Ringo et al., 2001). Les espèces de *Carnobacterium* les plus

fréquemment retrouvées sont *Cb. divergens* et *Cb. maltaromaticum* (anciennement *Cb. piscicola*). La présence d'autres genres et espèces tels que *Lactococcus piscium* (Williams et al., 1990), *Streptococcus* et *Leuconostoc* a également été rapportée (Ringø et Gatesoupe, 1998).

Récemment, l'identification bactérienne par le séquençage de l'ARN 16S ont permis de mettre en évidence la biodiversité de la flore lactique présente dans le tractus digestif de différents salmonidés (truites et saumons). Si *Cb. maltaromaticum* s'est encore révélée être l'espèce majoritaire de cet écosystème, les genres *Lactococcus* (représenté par l'espèce *Lc. lactis*), *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. sakei* et *Lb. curvatus*), ainsi que *Leuconostoc* (*Lc. mesenteroides*) étaient aussi présents (Balcazar et al., 2007).

Enfin, des bactéries lactiques des espèces *Lc. lactis* et *Lc. raffinolactis* ont été retrouvées comme espèces dominantes de la flore intestinale de poissons d'eau douce (carpes) (Hagi et al., 2004). Bien que les bactéries lactiques soient généralement reconnues comme des germes non pathogènes, de nombreuses épizooties liées à des streptocoques ont été rapportées dans des élevages de poissons marins, au Japon et en Amérique du Nord, puis se sont étendues dans le monde entier (Eldar et al., 1996). Ces germes, reclassés en *Lactococcus garvieae*, sont responsables de septicémies affectant différents organes internes, d'ophtalmies et d'hémorragies. *C. maltaromaticum* a été isolé de différents poissons malades et sa virulence a clairement été établie sur la truite arc en ciel et le bar d'Amérique (Baya et al., 1991 ; Toranzo et al., 1993).

Tableau 01 : Bactéries lactiques dans le tractus gastro-intestinal et les excréments des poissons (Ringø,1998)

Bactéries lactiques isolées du tractus digestif des poissons	Espèce de poisson	Références
<i>Lactobacillus sp</i>	Charr arctique (<i>S. alpinus</i>)	Ringo (1994); Ringo et al.,(1997) ;Ringø et Strøm (1994).
	Saumon atlantique (<i>Sal. Salar</i>) Morue atlantique (<i>G. morhua</i>) Cyprinidés Esocidés , Percidés , Hareng (<i>Clu. Harengus</i>)	Ringo et al.(1998) Strøm and Olafsen ,(1990) Strøm et Ringø _1993. Kvasnikov et al. _1977. Kraus , 1961 ; Olsen et al. ,1994.
<i>L. plantarum</i>	Charr arctique	Ringo et al.,(1997)
	Colins (<i>G. virens</i>)	Schröder et al. (1980)
<i>Carnobacterium sp.</i>	Charr arctique	Ringo et al.(1997) .
	Saumon atlantique Truite arc-en-ciel (<i>O. mykiss</i>)	Ringo et al.(1997) . Wallbanks et al. (1990) ;Joborn et al. (1997).
<i>C. divergens</i>	Charr arctique, Morue atlantique, Saumon atlantique	Ringo et al.(1997), Strøm (1988). Strøm (1988). Strøm (1988).
	Colins , Loup de mer (<i>A. lupus</i>)	Strøm (1988). Ringo et al.(1998).
<i>C. piscicola</i>	Charr arctique	Ringo et al.(1997).
	Saumon atlantique Poisson ^a Truite arc-en-ciel	Ringo et al.(1998). Stoffels et al.(1992). Starliper et al. (1992).
<i>Streptococcus sp.</i>	Charr arctique	Ringo (1994). Ringo et Strøm(94) ;Ringo et al.(1997).
	Salmonidés Anguille européenne (<i>Ang. anguilla</i>) Carpe (<i>Cyp. carpio</i>) Poisson rouge(<i>Carassius auratus</i>) Sériole (<i>Sr. quinqueradiata</i>) Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i> L.)	Trust et Sparrow (1974). Esteve et Garay (1991). Sugita et al. (1985). Sugita et al. (1988). Takemaru et Kusuda (1988). Ringo et al.(1998).
<i>Leuconostoc sp.</i>	Charr arctique	Ringo et Strøm (94).
<i>Leu. Mesenteroides</i>	Charr arctique	Ringo et al. (1997).

CHAPITRE II :

LES

PROBIOTIQUES

CHAPITRE II : LES PROBIOTIQUES

II-1- Historique et définition

La notion de probiotiques a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff en 1907 (Metchnikoff, 1907). Ce prix Nobel suggérait que la bonne santé et la longévité des paysans bulgares étaient dues à leur consommation de produits laitiers fermentés. Pour lui, la consommation de *Lactobacillus* influençait positivement la microflore intestinale, diminuait la « putréfaction » et les activités toxiques microbiennes. Il a ainsi proposé l'ingestion de bactéries lactiques pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie. Le terme probiotique a été introduit pour la première fois par Lilly et Stillwell en 1965 (Lilly and Stillwell, 1965) pour décrire les substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes. En 1991, Fuller redéfinit les probiotiques comme étant des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale (Fuller, 1991). Aujourd'hui, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) (Rapport FAO/OMS, 2002), les probiotiques sont des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte ». Ce sont des acteurs incontournables de développement et d'innovation dans les domaines des industries alimentaires et médicales. Ces microorganismes, généralement des bactéries, influencent la santé humaine et animale et protègent par exemple de certaines infections intestinales, participent à la digestion et influencent le système immunitaire. Leur consommation régulière permet de contribuer à l'action des 600 espèces bactériennes (représentant environ 10^{14} bactéries) présentes dans l'intestin humain où, par exemple, elles participent à la digestion et à la stimulation du système immunitaire. Leur inclusion dans les aliments ou les compléments alimentaires est en constante progression depuis une dizaine d'années. De nombreux aspects du mode d'action et de l'effet de ces microorganismes sur l'être humain ainsi que de leur interaction avec l'aliment sont cependant inconnus à l'heure actuelle et limitent leur utilisation industrielle.

II-2- Principales espèces probiotiques.

La flore intestinale humaine est constituée d'environ 10^{14} cellules bactériennes appartenant à des centaines d'espèces différentes (beaucoup d'entre elles encore inconnues), soit 10 fois plus que le nombre de cellules qui constituent notre corps (182). La microflore intestinale peut être considérée comme un organe à part entière. Ses fonctions physiologiques sont nombreuses et ses dysfonctionnements peuvent conduire à des situations pathologiques (29). Parmi les nombreuses fonctions physiologiques de la flore intestinale endogène normale, on peut citer la fonction métabolique (fermentation, production de vitamines, etc.) ou encore la fonction de barrière qu'elle accomplit face à la colonisation par des microorganismes pathogènes.

L'idée d'administrer des microorganismes exogènes afin de moduler la flore endogène dans un sens favorable ou simplement d'utiliser leurs propriétés métaboliques est à la base du concept de probiotique. Le plus souvent les microorganismes utilisés comme probiotiques proviennent d'isolats humains constitués d'espèces que l'on retrouve parmi la flore résidente, et l'accent est ainsi mis sur le rétablissement de l'équilibre écologique de la flore intestinale. C'est l'une des raisons pour lesquelles les principales souches reconnues en tant que probiotiques et utilisées dans les produits alimentaires appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Figure 1). En effet, ces bactéries sont des membres de la flore normale de l'intestin, connues pour ne pas présenter de risque toxique ou infectieux et sont relativement faciles à inclure dans des produits laitiers.

Les lactobacilles sont les microorganismes probiotiques les plus en vue par leur association populaire avec les produits laitiers fermentés. Il s'agit en général de bâtonnets non flagellés, non sporulés et Gram-positifs faisant partie des BAL. Ils sont importants pour l'industrie alimentaire, notamment dans les fermentations lactières et végétales. Dans le corps humain, les espèces de lactobacilles font partie de la flore naturelle de la bouche, de l'intestin grêle, du côlon et du vagin. Même si elles y sont présentes, les espèces de lactobacilles ne sont pas prédominantes dans le tractus gastro-intestinal. Elles sont anaérobies et obtiennent leur énergie du métabolisme fermentatif, mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène grâce à leur activité peroxydase capable d'inactiver le peroxyde d'hydrogène. Elles ont également la capacité de survivre à des pH bas dans les milieux qu'elles acidifient par la production d'acide lactique, produit final de la fermentation des carbohydrates. Cette capacité à produire de l'acide

lactique donne aux lactobacilles un avantage compétitif dans les environnements riches en nutriments, ce qui peut en partie expliquer leur potentiel probiotique. Une grande variété de lactobacilles sont utilisés comme probiotiques, parmi lesquels *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus rhamnosus* sont les espèces les plus étudiées (figure04)


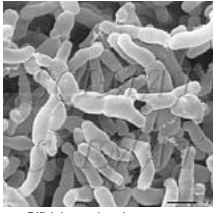
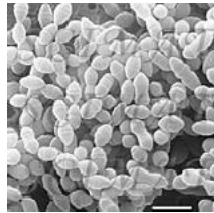
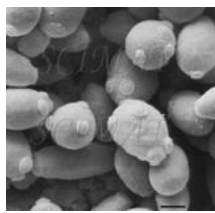
Espèces de lactobacilles	Espèces de bifidobactéries	Autres bactéries lactiques	Microorganismes « non-lactiques »
 <p style="text-align: center;"><i>Lactobacillus bulgaricus</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <i>L. acidophilus</i> La5 (Chr Hansen) <i>L. acidophilus</i> NCFM (Danisco) <i>L. casei</i> Shirota (Yakult) <i>L. casei</i> DN-114 001 (Danone) <i>L. reuteri</i> ATCC 55730 (Biogaia) <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> 2038 (Meiji Milk) <i>L. gasseri</i> K7 (ALP) <i>L. johnsonii</i> La1 (Nestlé) <i>L. paracasei</i> CRL431 (Chr. Hansen) <i>L. paracasei</i> F19 (Medipharm) <i>L. plantarum</i> 299V (Probi AB) <i>L. rhamnosus</i> GG (Valio) <i>L. crispatus</i> <i>L. gallinarum</i> 	 <p style="text-align: center;"><i>Bifidobacterium breve</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <i>B. longum</i> BB536 (Morinaga) <i>B. breve</i> Yakult (Yakult) <i>B. lactis</i> Bb 12 (Chr. Hansen) <i>B. lactis</i> HN019 (Danisco) <i>B. animalis</i> DNI 73010 (Danone) <i>B. Infantis</i> 35264 (Procter & Gamble) 	 <p style="text-align: center;"><i>Streptococcus thermophilus</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <i>S. thermophilus</i> 1131 (Meiji Milk) <i>E. faecalis</i> Symbioflor (Symbiopharm) <i>E. faecium</i> SF68 (Cerbios) <i>P. acidilactici</i> Bactocell® (Lallemand) 	 <p style="text-align: center;"><i>Saccharomyces sp.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <i>S. boulardii</i> Ultra-levure® (Biocodex) <i>S. cerevisiae</i> <i>E. coli</i> Nissle 1917 (Ardeypharm) <i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i>

Figure 04 : Principales espèces utilisées comme probiotiques et exemples des souches commercialisées. Source photos Scimat.

Les bifidobactéries sont des bâtonnets aux formes variées dont la plus caractéristique est une forme en Y. Elles sont non sporulées, Gram-positives, hétérofermentaires, anaérobies strictes et productrices d'acide lactique ou acétique. Même si elles partagent des caractéristiques phénotypiques avec les BAL et même si parfois elles sont considérées comme tel pour des questions pratiques, les bifidobactéries ne sont pas de "vraies" BAL. Elles sont présentes dans la flore normale des humains, et sont le genre prédominant parmi la flore intestinale des nourrissons, bien que leurs niveaux décroissent pendant l'allaitement. Les espèces les plus

utilisées comme probiotiques sont *Bifidobacterium lactis* et *Bifidobacterium longum*.

Un autre genre de BAL ayant fait l'objet de nombreuses études en vue de potentielles applications probiotiques est le genre *Enterococcus*, particulièrement les espèces *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* (4, 37). Les entérocoques sont des bactéries cocci, Gram-positives, naturellement présents dans le tractus gastro-intestinal et dans de nombreux aliments. Toutefois, l'utilisation des entérocoques chez l'homme reste très controversée, étant donné qu'ils sont parfois associés à la contamination fécale et à la résistance aux antibiotiques. C'est pour cela que la sélection correcte des souches et les tests d'innocuité prennent une importance vitale dans le cas des entérocoques et permettent de garantir l'innocuité des souches utilisées. Ces souches sont le plus souvent utilisées comme probiotiques pour les animaux, mais il existent des produits refermant des cultures vivantes d'*E. faecalis* ou d'*E. faecium* et destiné à l'utilisation humaine, tels que Symbioflor ou Bioflorin qui sont commercialisés en Allemagne, en Autriche et en Suisse.

D'autres microorganismes ne faisant pas naturellement partie de la flore naturelle humaine peuvent également être utilisés comme probiotiques, et montrer des effets thérapeutiques importants tels que l'immunostimulation. L'un des meilleurs exemples est représenté par *Saccharomyces boulardii*, une levure probiotique dont les effets sont les mieux documentés .

II-3- Effets des probiotiques sur la santé humaine

II-3-1-Sur le tractus gastro-intestinal

II-3-1-1-Protection contre les maladies inflammatoires du tube digestif

Lorsque le tube digestif est sain, l'individu tolère sa propre microflore, phénomène perdu au cours des maladies inflammatoires du tube digestif.

Schultz et al. (1999) ; Dupont et al. (2000) ont mis en évidence une réduction des activités exoglycosidasiqes (beta-galactosidase, N-acétyl-beta-glucosaminidase, alpha- mannosidase) dans les selles de patients ayant une maladie de Crohn active. Cette diminution était corrélée à une baisse des *Bifidobacterium* dans la flore fécale. Ces travaux soulignent l'importance de la flore bifide en clinique et son interaction avec l'activité métabolique et le mucus.

II-3-1-2-Les probiotiques et les infections gastro-intestinales

Des études cliniques ont démontré que des infections gastrointestinales causées par *Helicobacter pylori*, la diarrhée du voyageur, diarrhée due aux rotavirus, diarrhée-associée aux antibiotiques comme celle causée par *Clostridium difficile*, peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques (Mercenier et al., 2002 ; Turchet et al., 2003; Plummer et al ; 2004; Tursi et al.,2004 ; Wang et al., 2004).

II-3-1-3-Les probiotiques et la prévention du cancer du colon

Certaines études montrent que les bactéries probiotiques ont la propriété d'inhiber les processus conduisant à la formation du cancer du colon chez l'homme. En effet, Matsumoto et Benno, (2004) ont mentionné que la consommation de yogourt contenant *Lactococcus lactis* réduit significativement la mutagénécité dans l'intestin des volontaires.

II-3-1-4-Les probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin

Selon la littérature, les processus inflammatoires impliqués dans les pathologies de l'intestin de l'homme comme la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la pouchite sont contrôlés par les probiotiques (Gosselink et al., 2004) .

II-3-1-5-Les probiotiques et la perméabilité intestinale

L'altération de la perméabilité intestinale (fonction-barrière) causée par une infection, toxine ou autre facteur favorise un transfert aberrant d'antigènes (y compris la microflore locale) à travers l'intestin en engendrant des réponses immunitaires inappropriées (réactions inflammatoires ou autoimmunes) (Baumgart et Dignass, 2002).

Des études récentes ont montré que la consommation de probiotiques stabilise la fonction barrière de l'épithélium intestinal. Par exemple, Isolauri et al. (2004) ont démontré que *Lactobacillus* GG normalise le processus de perméabilité intestinale chez le rat. En outre, Rosenfeldt et al. (2004) a démontré que l'administration de probiotiques permet de stabiliser la fonction-barrière de l'intestin et de diminuer les symptômes gastro- intestinaux chez des enfants souffrant d'une dermatite atopique.

II-3-1-6-Les probiotiques et la motilité de l'intestin

La motilité intestinale joue un rôle important dans la réduction de la croissance des microorganismes pathogènes dans l'intestin.

Les probiotiques pourraient avoir des effets positifs sur la motilité de l'intestin en réduisant le temps de transit des microorganismes pathogènes (Corthier, 2007).

II-4-Autres effets

L'ingestion quotidienne d'une quantité déterminée de bactéries lactiques permet avant tout de rééquilibrer et maintenir une flore intestinale normale en plus de :

- L'inhibition des bactéries pathogènes (Ballangue, 1993) ;
- Atténuation des problèmes d'intolérance au lactose (Saint Laurent, 2002) ;
- Stimulation du système immunitaire de l'hôte sans réaction inflammatoire ;
- Réduction de la teneur sérique en cholestérol (Dilmi-Bouras, 2006 ; Dilmi-Bouras et *al.*, 2007) ;
- Amélioration de la valeur nutritionnelle (Vignola, 2002).

Les effets bénéfiques associés à la consommation des bactéries lactiques sont potentialisées lorsqu'elles sont ingérées vivantes, des arguments de plus en plus nombreux s'accroissent en faveur de cette hypothèse (Cherbut, 2001) et ces effets ont d'autant plus de chance d'exister quand les bactéries vivantes persisteront longtemps dans le tractus digestif avec un taux situé entre 10^6 à 10^9 cellules vivantes par ml (Bouhnik, 1993 ; Cherbut, 2001 ; Dilmi-Bouras et Sadoun, 2002b ; Marteau et *al.*, 2003).

Sans doute, les conditions régnant au niveau du tube digestif représentées par l'acidité corrosive de l'estomac, la concentration élevée en sels biliaires dans le duodénum et la flore intestinale empêchent le passage des bactéries probiotiques qui possèdent une faible capacité de résister en face de ces barrières (Bouhnik, 1993 ; Desmazeaud, 1996 ; Dilmi - Bouras et Sadoun, 2002b). Cependant, pour augmenter leur taux de survie, les probiotiques doivent être ingérés avec des vecteurs tel que les laits fermentés, les fromages, les yaourts, les boissons à base de lactosérum et les capsules de gélatine qui les protègent contre les barrières physiologiques (Saxelin et *al.*, 1995 ; Kailasapathy, 2002)

II-5-Applications des probiotiques :

Grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques utilisées par les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, les probiotiques sont parfois utilisés comme compléments dans des produits comme les yaourts ou bien dans des préparations pharmaceutiques sous forme de gélules. De nombreuses souches bactériennes ont montré leurs bénéfices sur la santé humaine et sont déjà commercialisées par Danone telles que *Bifidobacterium lactis*.

II-5-1-Traitement des diarrhées :

Les souches probiotiques *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*, qu'on retrouve entre autre dans le lait fermenté, ont fait l'objet d'études montrant leur efficacité contre la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques en milieu hospitalier (Penner et al., 2005) .

II-5-2-Traitements gastriques

Des travaux prometteurs sur l'amélioration des traitements gastriques sont en cours sur la conjonction des probiotiques aux antibiotiques en vue de limiter les infections à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), une bactérie impliquée dans la survenue et les récurrences des gastrites et ulcères gastro-duodénaux. Les études sur ce traitement se poursuivent car son efficacité reste à démontrer (Reid *et al.*, 2003).

Les applications des probiotiques se sont énormément étendues ces dernières années, tant dans le domaine agroalimentaire que médical

II-6- Mécanismes d'actions des Probiotiques

Les probiotiques font actuellement l'objet d'un certain consensus dans la communauté scientifique grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Plusieurs mécanismes par lesquels certains probiotiques exercent des effets protecteurs ou thérapeutiques ont été proposés. Toutefois, ces modes d'action ne sont pas encore complètement élucidés. Parmi ces principaux mécanismes d'action, on retrouve le renforcement de la barrière intestinale, l'inhibition de l'adhésion des pathogènes à la muqueuse intestinale, la production de substances antimicrobienne et la modulation du système immunitaire.

II-6-1- Inhibition de l'adhésion des pathogènes : phénomène de compétition/exclusion

Les probiotiques exercent une action antimicrobienne directe en s'opposant à l'invasion des microorganismes pathogènes dans le tube digestif tout en empêchant leur adhésion aux parois intestinales (Vanderpool *et al.*, 2008). En effet, il existe une compétition directe entre les souches probiotiques et les germes infectieux pour occuper les sites d'adhésion aux parois de l'intestin. Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence au tube digestif et peuvent le coloniser de manière prolongée. Cette propriété pourrait constituer un avantage écologique favorisant leur implantation au niveau des parois intestinales et par conséquent, l'inhibition de la fixation des germes pathogènes. Ainsi, les probiotiques jouent un rôle de barrière physique contre les microorganismes pathogènes. Ce phénomène a été observé chez certains lactobacilles qui adhèrent aux villosités intestinales et inhibent la fixation d'*Escherichia coli* entéro-pathogènes (Roselli, Finamore *et al.*, 2006; Collado, Meriluoto *et al.*, 2007).

II-6-2-Production de substances antimicrobiennes

Les probiotiques pourraient également limiter la croissance des pathogènes en exercent une action antimicrobienne indirecte. Cette dernière se réalise grâce à la production de différents composés antimicrobiens.

II-6-2-1- Les bactériocines

Ce sont des composés protéiques qui ralentissent respectivement les invasions des souches bactériennes (Klaenhammer, 1993). Ces substances nocives produites par les probiotiques sont dirigées contre des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. Elles agissent principalement sur la membrane externe des bactéries cibles en formant des pores qui mènent à la libération du contenu intracellulaire et à la mort de la bactérie affectée. Les lactobacilles et les lactocoques, contrairement aux souches de bifidobactéries, sont le plus souvent associés à la production de bactériocines (Fooks and Gibson, 2002). La nisine, qui est produite par la bactérie *Lactococcus lactis*, est la bactériocine la plus documentée.

II-6-2-2-Les acides organiques

Les bactéries probiotiques ont la capacité de produire des acides organiques qui contribuent à l'inhibition de la croissance des microorganismes entérovirulants (Servin, 2004). Il s'agit de l'acide lactique et l'acide acétique, qui sont produits respectivement par les lactobacilles et les bifidobactéries via la fermentation des hexoses. Ces acides organiques, produits à partir de glucides ingérés lors de la prise alimentaire, contribuent à faire baisser le pH intestinal. Leur diffusion passive à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée permet, après leur dissociation, d'acidifier le cytoplasme et donc d'inhiber la propagation, la croissance et la survie des agents pathogènes acido-sensibles.

II-6-2-3- Le peroxyde d'hydrogène

Certaines bactéries lactiques produisent, en milieu humide, du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui inhibe de nombreuses souches bactériennes pathogènes (Ouwehand and Vesterlund, 2004). La production du peroxyde d'hydrogène accompagnée par celle d'acide lactique permet l'inhibition du développement de certaines espèces pathogènes comme certains virus tel que le virus de la fièvre aphteuse, certains champignons comme *Candida albicans*, ou encore certaines bactéries comme *Escherichia coli*, etc.

II-6-3-Stimulation de l'activité du système immunitaire intestinale

L'interaction des probiotiques avec le système immunitaire permet d'accroître la réponse immune de l'hôte contre les agents entéropathogènes. En effet, les probiotiques interviennent dans la stimulation de l'immunité adaptative, tel que la production des anticorps de type IgA (Shu and Gill, 2002), ainsi que l'immunité innée tel que la production des macrophages, des monocytes, etc.(Oelschlaeger, 2010). Par conséquent, les 33 probiotiques agissent comme des adjuvants en modulant une réponse rapide de la muqueuse intestinale et renforçant ainsi le système immunitaire intestinal.

II-6-4- Allégations santé associées à la consommation des probiotiques

Connus depuis des centaines d'années, notamment à travers les produits laitiers fermentés traditionnels, les probiotiques font l'objet d'un véritable regain d'intérêt de la part des industriels. Ces derniers insistent d'ailleurs sur leur action bénéfique notamment sur le

systeme digestif et l'équilibre de la flore intestinale. En outre, l'intérêt des consommateurs pour ces produits bénéfiques pour la santé est également l'un des moteurs de la croissance du marché des probiotiques. Mais, l'arrivée de nouvelles règles sur les allégations a freiné la croissance des probiotiques. Récemment, Santé Canada a mis au point une nouvelle réglementation concernant les allégations génériques relatives à la consommation des probiotiques (Santé Canada, 2009)

CHAPITRE III :
STRESS OXYDATIF
ET ACTIVITE
ANTIOXYDANTE

CHAPITRE III : STRESS OXYDATIF ET ACTIVITE ANTI OXYDANTE

III.1. Introduction

La génération des espèces réactives de l'oxygène dénommées ROS (Reactive Oxygen Species) se produit naturellement au cours de la respiration cellulaire (Tarnawski et al., 2005). L'appellation ROS n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, radical hydroxyl OH^{\bullet} , monoxyde d'azote NO^{\bullet} , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet 1O_2 , peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxyde d'azote $ONOO^-$ (Favier, 2003). Ces derniers endommagent la vie cellulaire en causant l'oxydation des lipides, des protéines et de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'évolution de cette oxydation semble être la cause de plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer, les infections inflammatoires, les maladies cardiaques et accélèrent le processus de vieillissement (Dasgupta et De, 2007).

III.2. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes.

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques). L'accumulation des espèces oxygénées réactives a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Smirnoff, 2005).

III.2.3. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié (électrons célibataires). Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

Les radicaux libres, dérivés du métabolisme, sont produits dans toutes les cellules, même si certaines en fabriquent des quantités plus importantes (par exemple les macrophages pendant la phagocytose). Les principaux radicaux libres présents dans les cellules aérobies, notamment les cellules humaines, sont l'oxygène, les ions superoxydes, les radicaux hydroxyles, le peroxyde d'hydrogène et les métaux de transition. Les radicaux libres présents dans la cellule oxydent les molécules (molécules se trouvant à l'intérieur des cellules, en particulier des lipides), ce qui provoque la mort des cellules. Toutefois le corps humain possède des mécanismes de défense contre les effets des radicaux libres. Ce sont les enzymes qui dégradent les peroxydes et les métaux de transition et des protéines ou d'autres molécules qui emprisonnent les radicaux libres (Hubert, 1998).

III.4. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules oxydables qui, en agissant comme donneurs d'hydrogène vis-à-vis d'un radical hydroperoxyde, interrompent la réaction en chaîne de formation des peroxydes (White, 1994). Ce sont des composés capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire (Poknory, 2001). Les antioxydants sont pour la plupart synthétiques (hydroquinone, pyrogallol, acide gallique et gallate), et sont rajoutés aux huiles dans l'industrie alimentaire. Ils peuvent par contre être présents à l'état naturel dans les huiles végétales (vitamine E, polyphénols de l'olivier et du chêne, flavonoïdes, certaines huiles essentielles) (White, 1994).

III.4.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques)

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (Mika et al., 2004).

- **La superoxyde dismutase (SOD)** : accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD)] (Piquet et Hebuterne, 2007).
- **La catalase**: présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde

d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Piquet et Hebuterne, 2007).

- **La glutathion peroxydase (GPx)** : La glutathion peroxydase joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, de l'hydroperoxyde résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH) (Piquet et Hebuterne, 2007).

III.4.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)

Les antioxydants exogènes, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (Wanget al., 2003).

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Les sources alimentaires de ces antioxydants naturelles sont présentées dans le tableau 02.

III.5. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2006).

Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

- Système de défense primaire : comme la catalase, le glutathion (GSH). Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation.

Ils agissent donc en prévention.

- Système de défense secondaire : à titre exemple les tocophérols, sont capables de piéger directement les radicaux oxydants et sont ainsi des antioxydants «briseurs» de la chaîne radicalaire bloquant ainsi les réactions de propagation (Buettner, 1993)

**Tableau 02 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées
(Koechlin-Ramonatxo, 2006).**

Principaux nutriments Antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrumes, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile : de tournesol, de soja, de maïs Beurre, œufs, noix.
β-carotène	Légumes et fruits orangés, et vert foncés
Sélénium	Poissons, œufs, viande, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin
Métabolisme de cystéine, glutathion	Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou œufs, poissons, viande

CHAPITRE IV :
MATERIELS ET
METHODES

CHAPITRE IV : MATERILES ET METHODES

IV .1. Matériels

L'objectif :

Cette étude vise à explorer l'effet anti oxydant de 9 souches lactiques isolées nouvellement à partir de la chair et des intestins de l'anchois *Engraulis encrasicolus*.

IV .1.1. Présentation du lieu de l'étude expérimental

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire des microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS) de Mostaganem

IV .1.2. Matériels utilisés

IV .1.2.1. Origine des souches tests

Nous avons utilisé 9 souches lactiques, huit souches ont été nouvellement isolées à partir de la chair et de l'appareil digestif de l'anchois *Engraulis encrasicolus* et la souche probiotique de référence Bb12.

Les différentes souches utilisées sont représentée dans le tableau suivant (tableau03):

Tableau 03: Les différentes souches utilisées dans les tests étudiées

Source	Souche bactérienne
Laboratoire LMBAFS	Ch1(MRS) Bouillon
Laboratoire LMBAFS	Ch2(MRS) Bouillon
Laboratoire LMBAFS	I1(MRS) Bouillon
Laboratoire LMBAFS	I2(MRS) Bouillon
Laboratoire LMBAFS	Bb12(MRS) Bouillon
Laboratoire LMBAFS	Ch1(M17) Bouillon
Laboratoire LMBAFS	Ch2(M17) Bouillon

Laboratoire LMBAFS	I1(M17) Bouillon
Laboratoire LMBAFS	I2(M17) Bouillon

IV.1.3. Les milieux de culture

Les différents milieux de culture utilisés sont :

- **Milieu MRS** (Man, Rogosa, Sharp) bouillon: utilisé pour Favoriser la culture des bactéries lactiques du Genre *Lactobacillus spp* (De Manne et al. 1960)
- **Milieu M17** (bouillon) : utilisé pour Favoriser la culture des bactéries lactiques du Genre *Lactococcus spp* (Terzagui et Sandine, 1975)

IV .1.4. Appareillage

Spectrophotomètre UV-Visible double faisceau (JENWAY 7305 UV/VIS), Chambre D'observation UV « 264/3645 nm »(VILBERCOURMAT), Bain Marie (KOTTERMANN), Etuve universelle de 5 à220°C, Agitateur magnétique (VELP scientifica), vortex (Stuart), Balance (KERN) Max 421g d= 0.01g, Balance (KERN) Max 6100g d= 0.1g PH mètre (WTW Ph 330), Micro pipette (Smart) « 100 -1000 µl », Micro pipette (Unique) « 10 – 50 µL », Centrifugeuse (ROTOFIX 32 A.

IV.2.Méthodes

IV.2.Repiquage et réactivation des souches

Les souches utilisées étaient conservées dans des Eppendorf à une température de -70°C. Elles sont réactivées et maintenues vivantes par un repiquage d'un inoculum de 1% dans les milieux MRS et M17 bouillon, incubées à 37°C pendant 24 h et sont ensuite conservées à 4°C.

IV.3. Préparation de l'inoculum

72 heures avant de commencer chaque expérience, les cultures sont revivifiées par une série de trois inoculations de 200 microlitres dans 10 ml de MRS bouillon et incubées à 37°C pendant 24h dans une jarre d'anaérobiose avec système générateur de CO2 (Anaérocult) (figure 5).

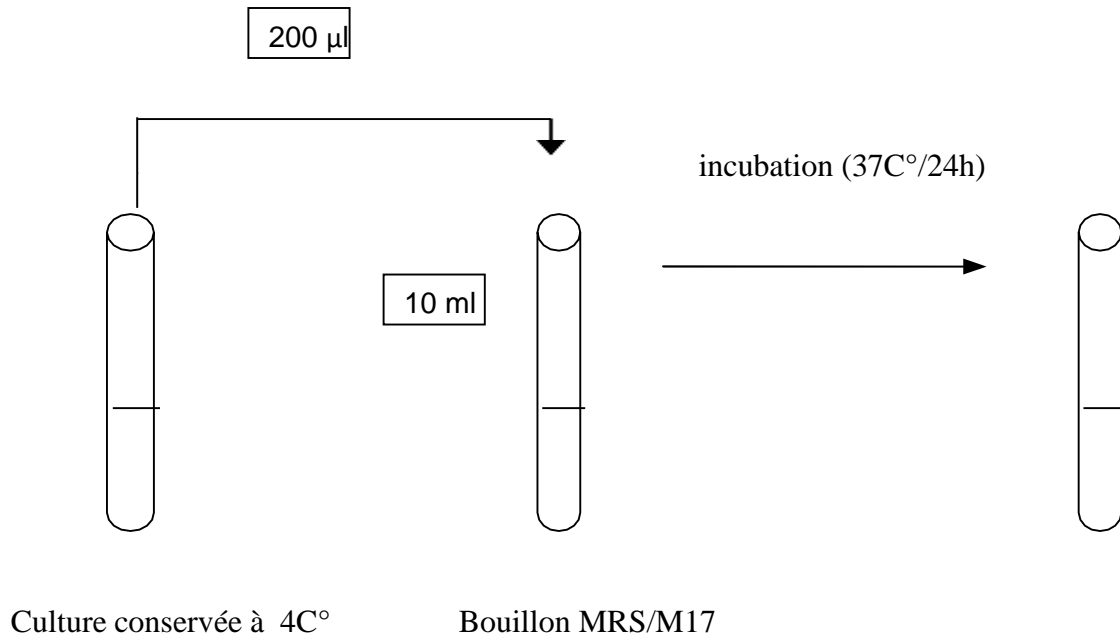


Figure 05 : Représentation schématique de la réactivation des souches lactiques.

IV.4. Ajustement de l'inoculum

L'ajustement de l'inoculum s'effectue à l'aide d'une cellule de Thoma. La formule de dénombrement est la suivante :

$$X = 4 \cdot 10^6 \cdot n$$

Où: X: nombre de cellules dans 1 mL.

n : nombre de cellules dénombrées dans un carré.

IV.5. Préparation des dilutions décimales

La dilution est un processus qui consiste à réduire la concentration d'une substance dans une solution. Dans ce but, des dilutions décimales sont ensuite réalisées en cascade jusqu'à la dilution 10^{-3} (Begloul, 2011). Une série de dilution dans le PBS stérile a été réalisée jusqu'à 10^{-3} selon la technique des dilutions décimales.

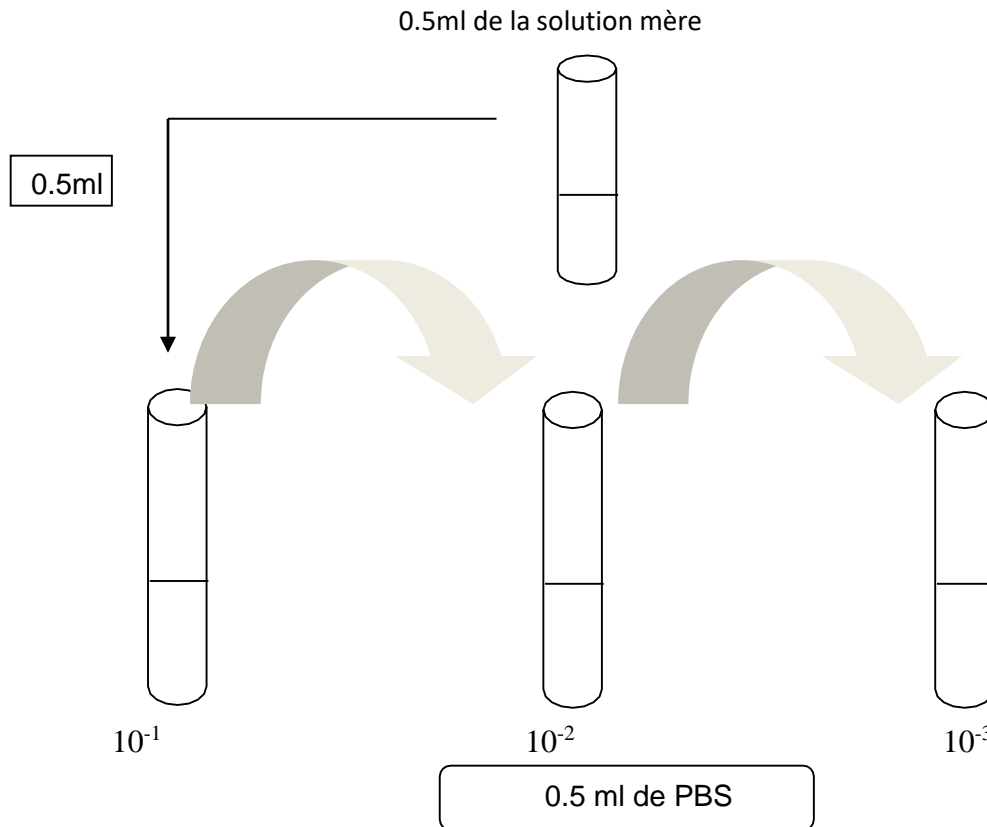


Figure06 : Dilutions décimales préparées par les PBS à partir de la solution mère.

IV.6.Méthodes :

IV.6.1.Pouvoir réducteur des bactéries :

Principe :

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure en fer ferreux (Fe^{2+}). La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Chung *et al.*, 2006).

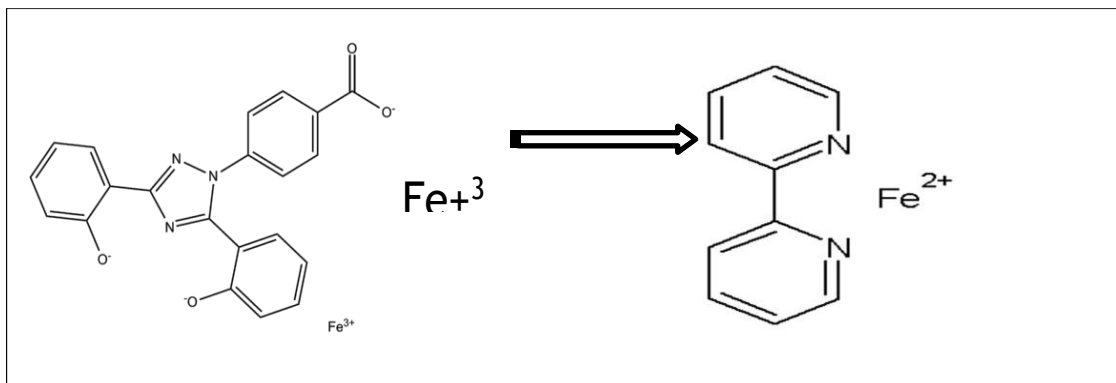


Figure 07 : Réaction de teste du pouvoir réducteur du Fe^{3+} en Fe^{2+} .

Mode opératoire

Ce test a été réalisé selon le protocole de (Bae *et al.* 2010).

- Mettre 0.5 ml de chaque bactérie dans un tube stérile.
- Ajouter ajoutés 0.5ml de PBS à pH (6.6) et 0.5 ml de ferrocyanure de potassium préparé à 1%.
- Incuber les 9 tubes au bain marie à 50C° pendant 20 miutes.
- Ajouter l'acide trichloacétique a 10% après refroidissement des tubes.
- Centrifuger à 1399 pendant 5 mn.
- Mélanger 1ml de chaque surnagent avec 1ml d'eau distillée et 0.2 ml trichlorure de fer à 0.1%.
- Lire l'absorbance a 700 nm après 10 minutes et utiliser le PBS comme blanc.

Le pouvoir réducteur a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Le pouvoir réducteur (\%)} = (A_s - A_b) / A_b \times 100$$

As : L'absorbance de l'échantillon.

Ab : l'absorbance du blanc.

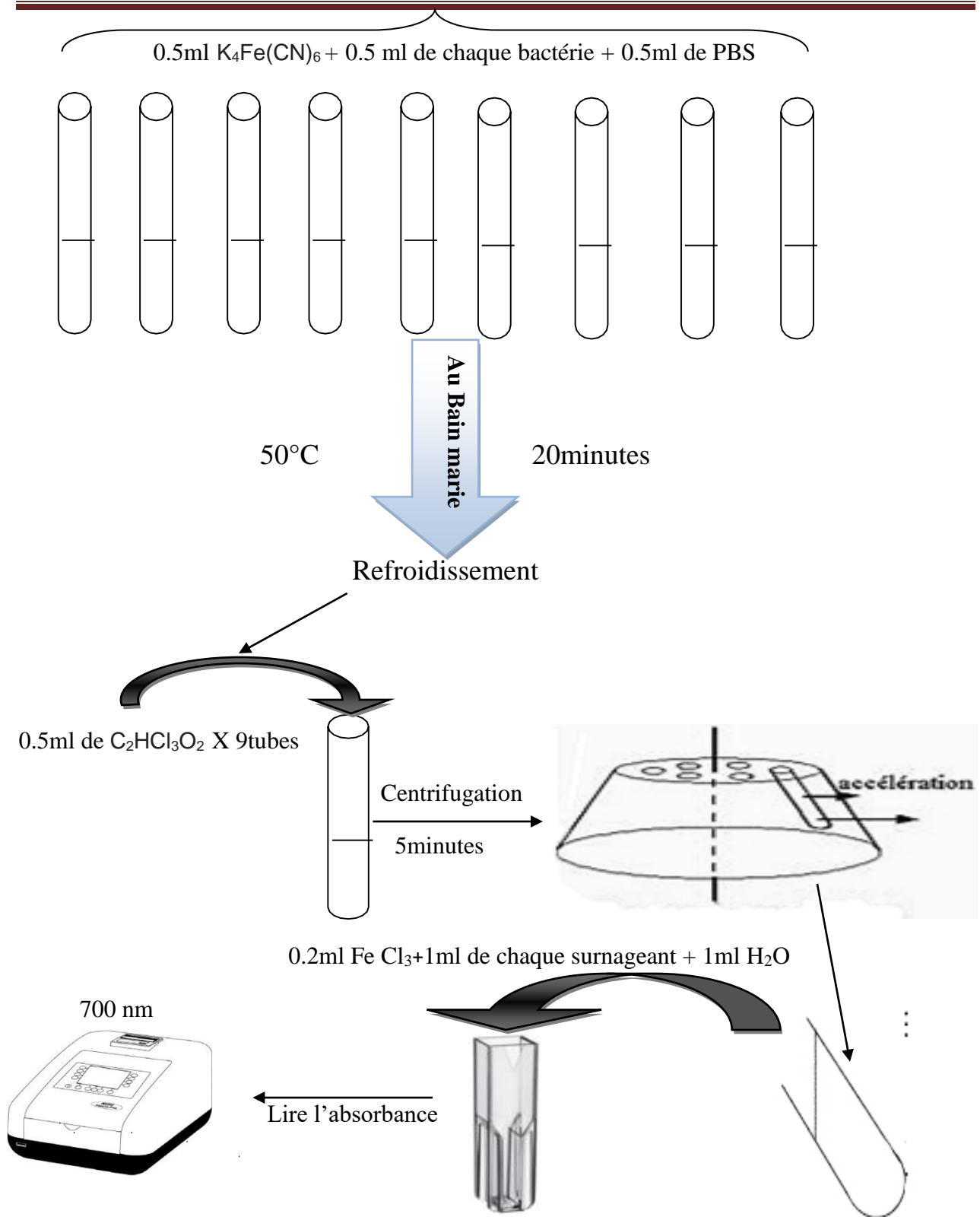


Figure08 : Test du pouvoir réducteur des bactéries lactiques (Bae *et al.* 2010).

IV.6.2. Capacité de Piégeage des radicaux libres par 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH)

Principe

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre, stable ou accepteur d'hydrogène de couleur violet intense (Cavar *et al.*, 2009). Ce radical perd sa coloration native quand il se lie avec des substances antioxydants, qui lui transfèrent des électrons ou des protons. La forme réduite du DPPH confère à la solution une couleur jaune (Gadow *et al.*, 1997). Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration découle, de la nature, de la concentration et de la puissance des principes actifs présents (kroyer, 2003 ; Es Safi *et al.*, 2007).

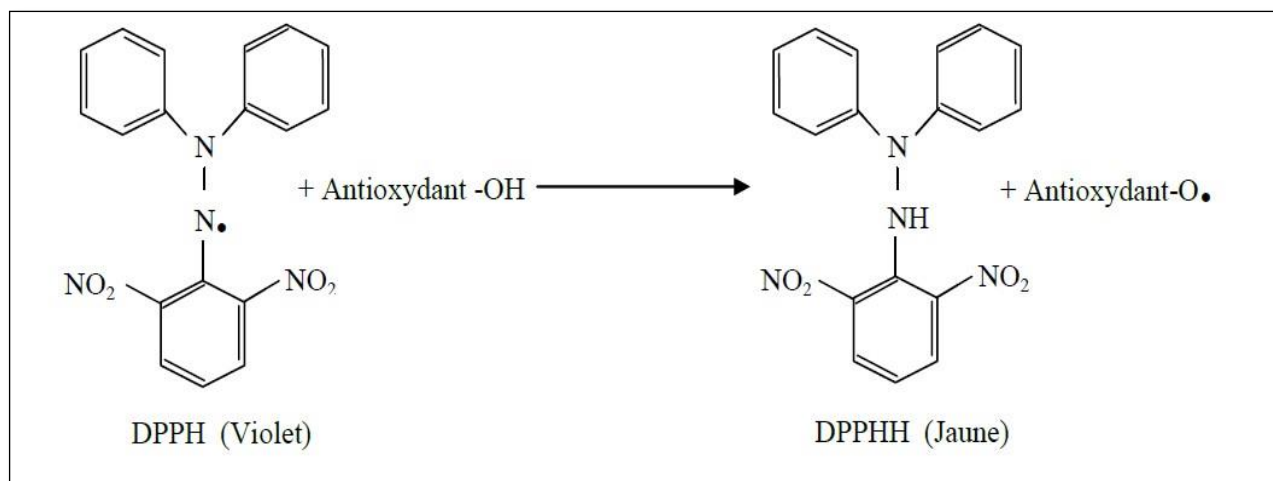


Figure09 : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Congo, 2012).

- Le pourcentage d'activité a été calculé avec l'équation suivante:

$$\text{Activité de piégeage (\%)} = [1 - (A_i - A_k) / A_j] \times 100$$

A_i : l'absorbance

A_k : le blanc

A_j : le control

Mode opératoire

L'activité de piégeage de DPPH a été examinée selon la méthode de (Bougatef *et al.* 2010).

- 1ml de solution DPPH (0.2mmol/l) préparée dans de l'éthanol a été ajoutée aux 9 tubes stériles contenant 1ml de chaque souche bactérienne.
- Incuber les tubes pendant 30 minutes dans l'obscurité à la température ambiante.
- Après 10 minutes de centrifugation à 1399, l'absorbance a été mesurée à 517 nm
- Pour le blanc, le même mélange a été préparé sans éthanol.
- Pour le contrôle le même mélange a été préparé sans souches.

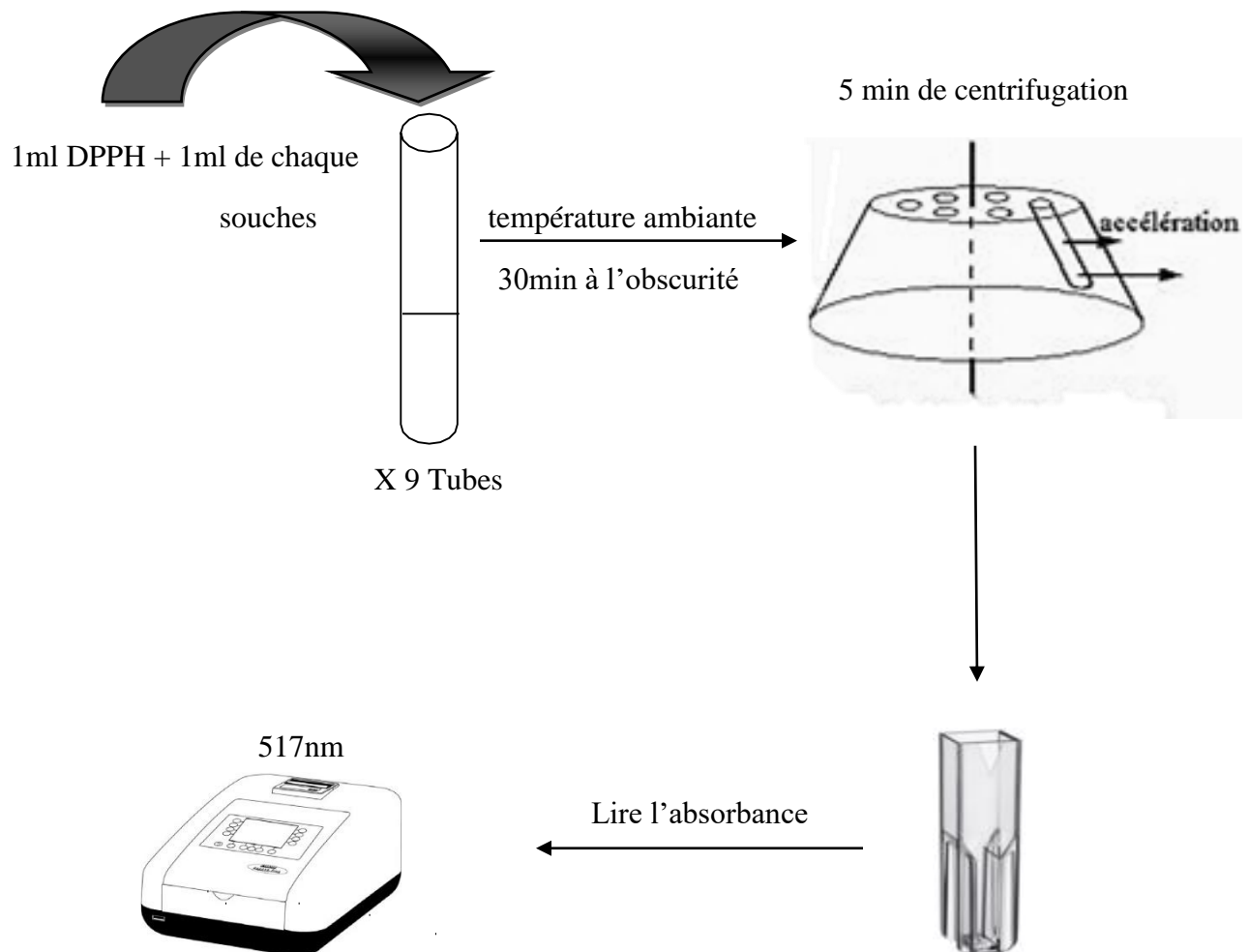


Figure10 : un schéma représente les étapes du test de la capacité de piégeage des radicaux libres par le DPPH. (Hsu *et al.* 2008).

IV.6.3. Anti peroxydation lipidique :

Principe :

Le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbutirique (TBARS) est une méthode de référence caractérisée par sa simplicité et sa sensibilité, elle permet la mise en évidence d'un éventuel stress oxydatif .

Mode opératoire

Selon le protocole de Hsu *et al.* (2008).

-Ajouter un volume de jaune d'œuf frais à un volume égale de PBS (0,2 mol / L; pH 7,4) et bien agiter le mélange jusqu'à l'homogénéisation.

-Diluer la suspension par le PBS (1 :25, V/V).

-Dans 9 tubes stériles, mélanger 0.5ml de chaque souche bactériennes avec 1ml de la suspension préparé, 1ml PBS et 1ml de sulfate ferreux FeSO₄ (25mmol/L).

-Agiter les tubes pendant 15 minutes à 37°C et ajouter 1ml de l'acide trichloracétique (20%, P/V).

- Après la réaction statique pendant 10 minutes, le mélange a été centrifugé à 1399 pendant 10 minutes.

-Dans une autre séries de 9 tubes contenant 2ml de l'acide barbiturique (0,8%, poids / volume) nous avons ajouté 3ml de chaque surnageant.

- Chauffer le mélange au bain marie 10 minutes.

-après le refroidissement des tubes a une température ambiante, L'absorbance (A_s) du mélange nm a été mesurée à 532.

- Les blancs (A₀) contenaient 0,5 ml de PBS au lieu de l'échantillon.

Le taux d'inhibition de la peroxydation lipidique a été calculé selon la formule suivante

$$\text{Taux d'inhibition du peroxyde lipidique (\%)} = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100$$

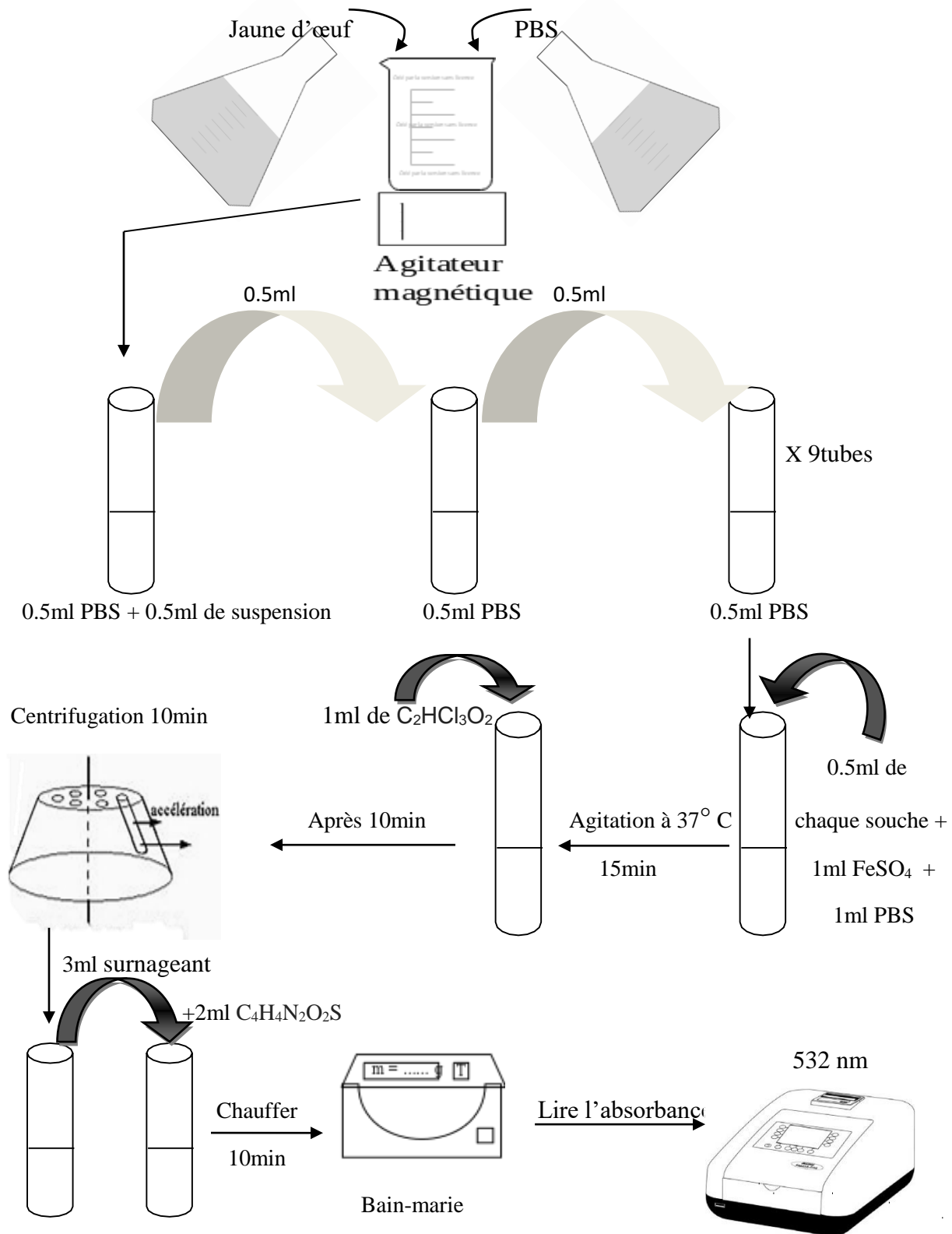


Figure11 : Test de la Peroxydation anti-lipidique (Hsu *et al.*2008)

CHAPITRE V :
RESULTATS ET
DISCUSSION

V.1. Evaluation du pouvoir réducteur

Cette méthode est basée sur l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électrons, caractéristique de l'action des antioxydants. Les résultats du pouvoir réducteurs sont illustrés dans figure12

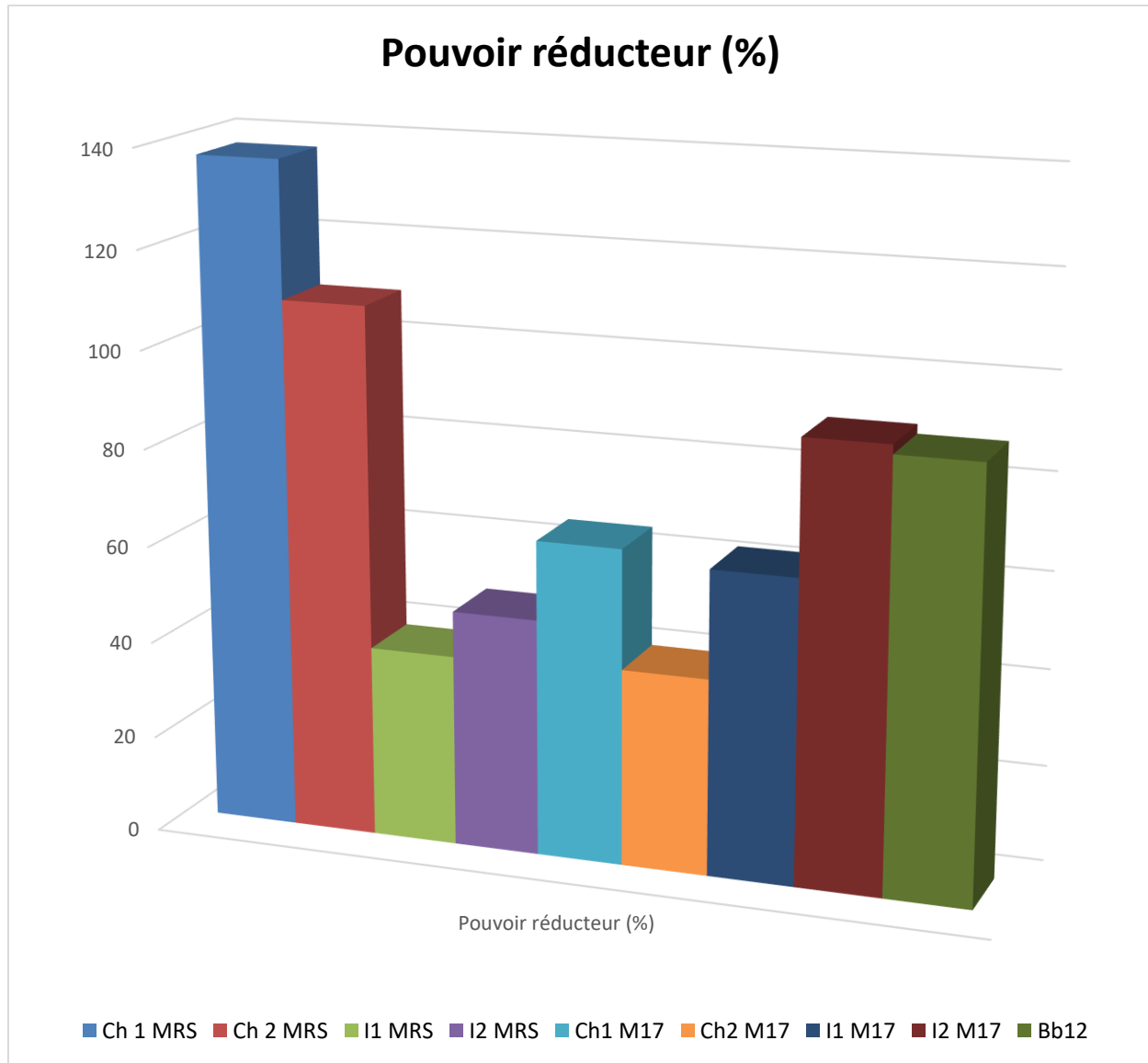


Figure12 : Activité réductrice des souches lactiques étudiées.

La figure 12 illustre les résultats du pouvoir réducteur obtenus des souches possédant des densités optiques maximales de 0.034nm.

Le meilleur pouvoir réducteur de Fe^{3+} en Fe^{2+} a été affiché la souche (**ch1.MRS**) avec un taux de 137.2%, alors que le taux minimal était a de 39.5%. Cependant la souche probiotique de référence Bb12 a affiché un taux de 88.4%. Ces résultats démontrent que les souches étudiées possèdent un bon potentiel réducteur.

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Zhang (2017) qui a démontré que les souches lactiques *L. curvatus* SR6 et *L. paracasei* SR10-1 ont un pouvoir réducteur et les résultats obtenus pour les deux souches étaient de (47.31% et 44.24%) respectivement.

V.3. Piégeage du radical libre DPPH

Ce test est l'une des méthodes les plus fréquentes et relativement rapides utilisées pour tester l'activité radicalaire des substances biologiquement actives (**Molyneux et al., 2007**). Ce radical présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm et il est de couleur violette mais se décolore rapidement et devient jaune quand il est réduit. La capacité des antioxydants présents dans le milieu est proportionnelle à l'intensité de la couleur. Les résultats obtenus par ce test sont représentés sur la figure 13

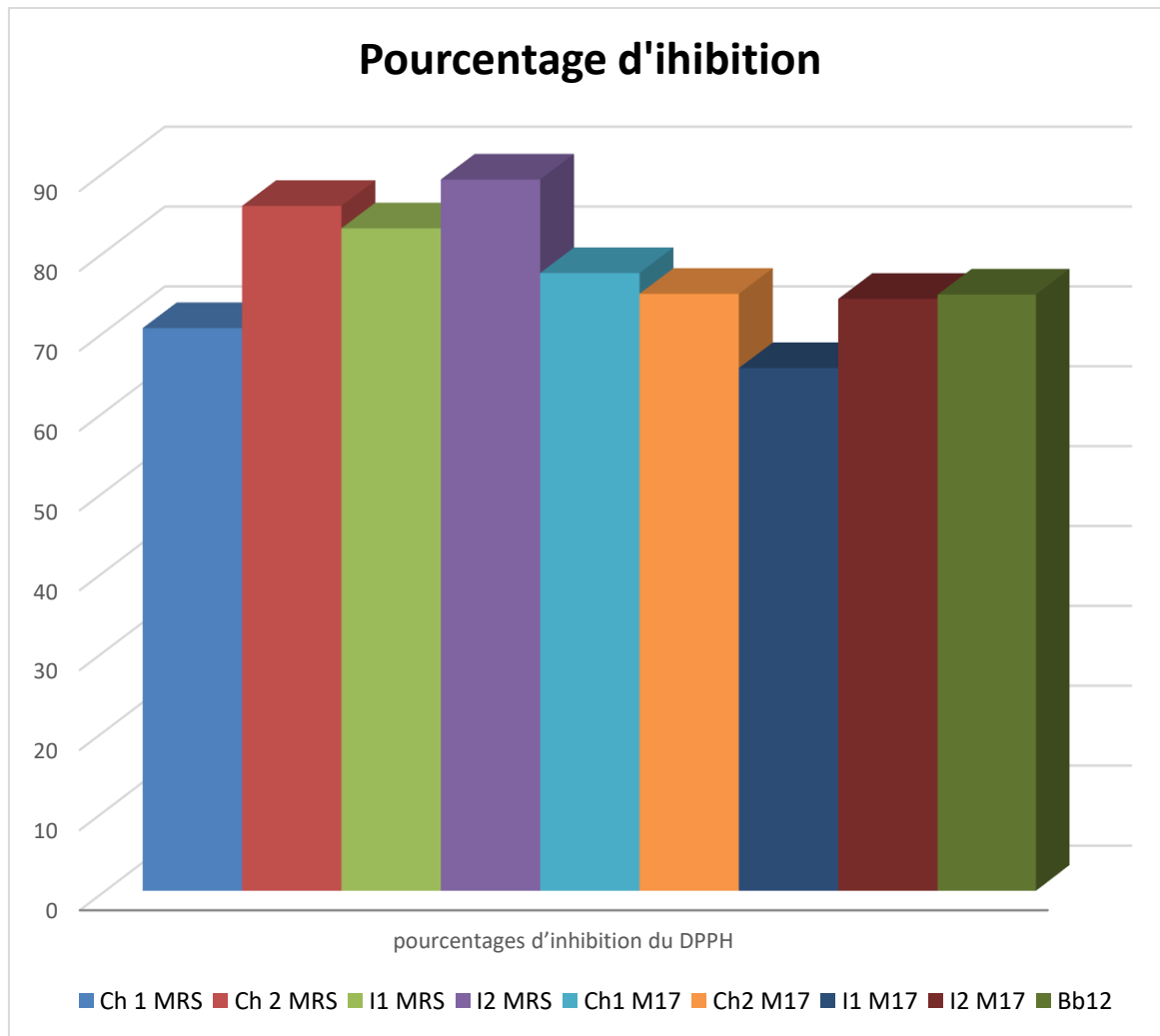


Figure13 : Pourcentages d'inhibition du DPPH de 9 souches lactiques étudiées.

Les résultats démontrent que toutes les souches lactiques étudiées ont la capacité de piégeage des radicaux libres. Les taux de ce piégeage variaient entre 65.4 et 89.01%. Cependant la souche probiotique Bb12 a affiché un taux de 74.6%.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Zhang *et al.* (2017) qui ont prouvé que les deux souches *L. curvatus* SR6 et *L. paracasei* SR10-1 ont des activités de piégeage de 59.67% et 49.48% respectivement .

V.4.Effet anti peroxydation lipidique :

La mise en évidence de l'effet des souches bactériennes testés sur la peroxydation lipidique a été déterminée par les pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique (Hsu et all,2008).Les résultats de la peroxydation lipidique sont illustrés dans la figure 14

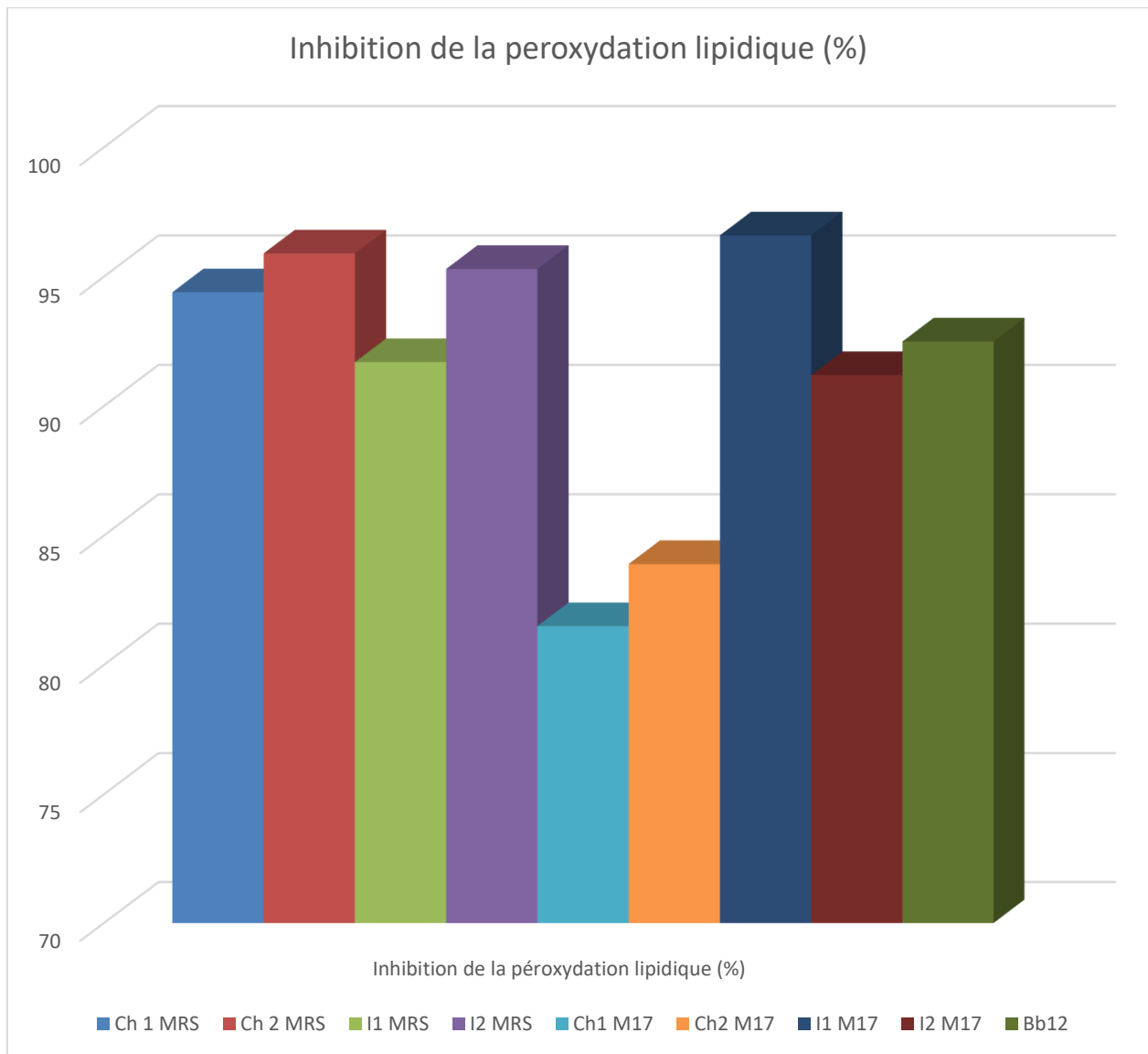


Figure14: Pourcentages de l'effet d'anti peroxydation lipidique des souches lactiques

Les taux d'inhibition de la peroxydation lipidique affichés par les souches lactiques étudiées variaient entre 81.5% et 95.9%. De sa part, la souche probiotique Bb12 a démontré un taux d'inhibition de 92.5%.

Des études précédentes ont démontré l'effet anti oxydant les bactéries lactiques, à savoir l'effet de la souche *L. brevis* P68 isolée des cornichons (Arasu et al.2015) et les souches *L. curvatus* **SR6**/et *L. paracasei* **SR10-1**/avec des taux d'inhibition de 55% et de 63.89% de la peroxydation lipidique respectivement (Zhang et al. 2017). Mais le potentiel de l'effet anti oxydant démontré par nos souches lactiques isolées demeure plus fort.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les Bactéries Lactiques (BL), largement utilisées dans l'industrie pour la fabrication des produits laitiers fermentés, sont exposées au stress oxydant ce qui conduit à des pertes de rendement et diminue leur survie.

L'activité antioxydante des bactéries lactiques est importante à la fois pour la protection contre les dommages oxydatifs dans le corps humain. L'objectif de ce travail était de démontrer les effets des antioxydants de certaines bactéries lactiques nouvellement isolées à partir des anchois.

L'étude de l'activité antioxydante des 9 souches lactiques a été effectuée en mesurant le pouvoir réducteur, le piégeage des radicaux libre et l'inhibition de la peroxydation lipidique. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches étudiées possèdent un pouvoir anti oxydant très prononcé, notamment chez certaines souches où il a dépassé 100%.

Des études ultérieures sont nécessaires pour l'identification génétique de ces souches et l'exploration de leurs activités anti oxydantes in vivo.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ammor S., Rachman C., Chaillou S., Prévost H., Dousset X., Zagorec M. (2005): Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small- scale producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*. 23: 373- 382.

Baumgart, D. C. and Dignass, A. U. (2002). “Intestinal barrier function.” *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 5: 685-94. 5 Baumgart, D. C. and Dignass, A. U. (2004). “Current biological therapies for inflammatory bowel disease.” *Current Pharmaceutical Design* 10: 4127-47.

Beckman et Ames, 1998 : Beckman, K.B. and Ames, B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78, 547- 581

Björkroth, J., and Holzapfel, W. (2006) Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* (3rd edition). Springer Verlag. New York, USA. pp 267-319.

Boudjemaa Khaled. (2008). Essai d’optimisation de la production d’acide lactique sur lactisérum par streptococcue thermophilus. Mémoire de magister. option biochimie et microbiologie appliquées. Université M’Hmed Bougara –Boumerdés

Bouhnik, (1993) survie et effets chez l’homme des bactéries ingérées dans lait fermenté .lait , 73

BuettnerGR.1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300: 535–543.

Calvez. S ; Belguesmia. Y ; Kergourley. G.(2009). in bactériocines : de la synthèse aux applications in bacteries lactiques :physiologique , métabolisme,genomique et applications industrielles edition : Economica .2009. p 100-122.

Cervato, G., Cazzola, R. and Cestaro, B. (1999) Studies on the antioxidant activity of milk caseins.*Int J Food Sci Nutr* **50**, 291– 296.

Chen, J., Lindmark-Månsson, H., Gorton, L. and Åkesson, B. (2003) Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *Int Dairy J* **13**, 927– 935.

Cherbut,(2001) yaourt et lait fermenté. Lettre N° 44,INRA

Chich, J-F., Marchesseau, K., & Gripon, J.C. 1997 : Intercellular esterase from lactococcus lactis subsp. Lactic NCDO 763 : Purification and characterization. *International Dairy Journal*. 7 :169-174.

Chiue, H., Kusano, T. and Iwami, K. (1997a) Antioxidative activity of barley hordein and its loss by deamidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **43**, 145– 154.

Chiue, H., Kusano, T. and Iwami, K. (1997b) Deamidation-induced fragmentation of maize zein, and its linked reduction in fatty acid-binding capacity as well as antioxidative effect. *Food Chem* **58**, 111– 117.

Chung HJ, et al. (2006) A gene encoding phosphatidyl inositol-specific phospholipase C from *Cryphonectria parasitica* modulates the lac1 expression. *Fungal Genet Biol* **43**(5):326-36

Collado, M., J. Meriluoto, et al. (2007). "Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus." *Letters in applied microbiology* **45**(4): 454-460. Klaenhammer TR. *FEMS Microbiol Rev.* 1993 Sep; **12**(1-3):39-85.

Corrieu G., Luquet F M., 2008 - bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Ed. Lavoisier. Paris. France, pp 472 -849.

Dacosta Y, (2000). La bio-protection des aliments : antagonisme microbien au service

Dacosta Y. (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317p. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008)..

Dasgupta A, et al. (2007) Regulation of rRNA synthesis by TATA-binding protein-associated factor Mot1. *Mol Cell Biol* **27**(8):2886-96

Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B. and López-Fandiño, R. (2004) Antioxidative activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J Food Prot* **67**, 1939– 1944.

De Roissart., 1986 - Bactéries Lactique dans le lait et produits laitiers. Ed. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris : 445 p.

DELLAGLIO F., DE ROISSARD H., TORRIANI S., CURK M.C. et JANSSENS D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). Lorica, Uriage. 1 : 25-116.

Denev S., Staykov Y., Moutafchieva R., Beev G. (2009): Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture . *Int. Aquat. Res.* 1: 1-29.

DESMAZEAUD M., (1996). Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine: utilisation et innocuité. *Cahier Agriculture*, **5**: 331-343.

DILMI- BOURAS A. et SADOON D., (2002). Survie des ferments du yaourt dans le tube digestif du lapin. *Lait*, 82(2).

DILMI BOURAS A., (2006). Assimilation in vitro of cholesterol by yogurt bacteria. *Annals of agricultural and Environmental Medicine AAEM*, 13: 49-53.

DILMI BOURAS A., KOÏCHE M. et TABTI M. (2007). The effect of *Lactobacillus paracasei* on the rabbit's cholesterolemia. *African Journal of Biotechnology* ,6(24) : 2840- 2845.

Dyer F.E. (1947): The microorganisms from Atlantic cod. *J. Fish Res. Board Can.***7**: 128–136.

El-Soda, M., Fathallah, S., Ezzat, N., Desmazeaud, M.J. and Addou, Donia, S. (1986) The esterolytic and lipolytic activities of lactobacilli. Detection of the esterase system of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus fermentum*. *Sciences des Aliments* **6**,545– 557.

Favier, A. (2003). Favier A., Cadet J., Kalaryanaman R., Fontecave M., Pierre J.-L., *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*, Birkhauser, New-York,

Fooks L.J., Gibson G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *Brit. J. Nutr* **88** (suppl 1): 39-49.

G. Corthier Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas Cedex (Ballangue, 1993).

Gosselink, R.J.A., Snijder, M.H.B., Kranenbarg, A., Keijsers, E.R.P., de Jong, E., Stigsson, L.L., 2004. Characterisation and application of NovaFiber lignin. *Ind. Crops Prod.* **20**, 191–203.

GUIRAUD J. P., 1998. Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD, Paris : 163 505.

GUIRAUD J.P., 2003. Microbiologie Alimentaire. Tec & Doc, Dunod. Paris. 90-292.

HADDIE J.M., 1986. Other streptococci. In: Bergey's manual of systematic bacteriology (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). 1: 1070.

HASSAN A.N. and FRANK J.F., 2001. Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.

Ho T.N.T., N. Tuan N., Deschamps A. et Caubet R., (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.* 134- 142.

Hovda MB, Lunestad BT, Fontanillas R, Jan Thomas Rosnes JT. (2007): Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture.* **272**:581-588.

Hsu, H.J., LaFever, L., Drummond-Barbosa, D. (2008). Diet controls normal and tumorous germline stem cells via insulin-dependent and -independent mechanisms in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 313(2): 700--712.

Huber I, Spanggaard B, Appel KF, Rossen L, Neilson T, Gram L (2004): Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *J. Appl. Microbiol.* 96: 117-132.

Hughes M.C., Kerry J.P., Arendt E.K., Kenneally P.M., Mcsweeney p.L.H., O'neill E.E. (2002): Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Science.* 62: 205-216.

Joborn A. J. C. Olsson A. Westerdahl P., L. Conway and S. Kjelleberg. (1997): Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Diseases.* 20:383-392.

KAILASAPATHY K., (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3: 39-48.

Kaizu, H., Sasaki, M., Nakajima, H. and Suzuki, Y. (1993) Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *J Dairy Sci* 76, 2493– 2499.

Kamaly KM, El Soda M, Marth EH (1988) Esterolytic activity of *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and their mutants. *Milchwissenschaft* 43, 346-349.

Kawai Y., Tadokoro K., Konomi R., Itoh K., Saito T., Kitazawa H., Itoh T. (1999): A novel method for the detection of protease and the development of extracellular protease in early growth stages of *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus*. *J Dairy Sci.* 82: 481-485.

Khalid NM, Marth EH (1990) Proteolytic activity by strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *J Dairy Sci* 73, 3068-3076

Kim DH, Brunt J, Austin B. (2007) : Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Applied Microbiol.* 102: 1654-1664.

Klaenhammer TR (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70(3): 337-349.

Klaenhammer TR (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* 12(1-3): 39-85.

KOECHLIN-RAMONATXO C., 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments anti-oxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme.* 20: 165-177.

Korpela, R., Lähteenmäki, T., Sievi, E., Saxelin, M. and Vapaatalo, H. (1997) *Lactobacillus rhamnosus* GG shows antioxidative properties in vascular endothelial cell cultures. *Milchwissenschaft* **52**, 503– 505.

Kullisaar, T., Songisepp, E., Mikelsaar, M., Zilmer, K., Vihalemm, T. and Zilmer, M. (2003) Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogeneity in human subjects. *Br J Nutr* **90**, 449– 456.

Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C. and Kilk, A. (2002) Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Int J Food Microbiol* **72**, 215– 224

Kvasnikov E.I., Kovalenko N.K. et Materinskaya, LG (1977): Lactic acid bacteria of freshwater fish. *Microbiology*. 46: 619-624.

LECLERC H., GAILLARD F.L. et SIMONET M., 1994. Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. DOIN. Paris. 445.

Liu SQ, Holland R, Crow VL. (2001). Purification and properties of intracellular esterases from *Streptococcus thermophilus*. *International Dairy Journal*, vol 11: 27-35.

Makhloufi (2012). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biochimie. France, 33.

Makhloufi K M., 2011 - Caractérisation d'une bactériocines produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. These de docterat, Université pierre et marie curie : 200p.

MARTEAU P. et SHANAHAN F., (2003). Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and sideeffects. *Best Practices and Research Clinical Gastroenterology*, 17: 725-740.

MARTEAU P. H., POCHART P. H., BOUHNİK Y. et RAMBAULT J. C., (1994). Ecologie microbienne, survie et effets de *Lactobacillus acidophilus* et bifidobacéries de produits laitiers fermentés dans le tube digestif de l'homme. *CATH. Nutr, Diet XXIX*, 1994.

Matsumoto, M.; Ohishi, H.; Benno, Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 93, 109–113.

Mauguin S. (1991). Caractérisation de bactéries lactiques isolées de produits marins. These de doctorat. IFREMER. Nanthes. 1991

Mechai A., 2009 : Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques. Thèse de doctorat en Biochimie, Université de Annaba, 99p.

Mercenier A Pavan S and Pot P. 2002. Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Curr. Pharmaceut. Design.* 8: 99-110.

Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., & Lüthje, S. (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews* 2, 3, 173–193

Mikelsaar, M., Mändar, R., Sepp, E. and Annuk, H. (2004) Human lactic acid microflora and its role in the welfare of the host. In *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects* ed. S. Salminen, A. Von Wright and A. Ouwenhand pp. 453– 505. New York: Marcel Dekker, Inc.

Miller, R.A. and Britigan, B.E. (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* 10, 1– 18.

Oelschlaeger T.A. (2010): Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300: 57–62.

OGIER J.C., CASALTA E., FARROKH C. and SAÏHI A., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 286-290.

OUWEHAND A.C. et VESTERLUND S. 2004. 11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S., Ouwehand A., Von Wright A. (eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd ed. *Marcel Dekker, New York.* 375–395.

OUWEHAND A.C. et VESTERLUND S. 2004. 11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S., Ouwehand A., Von Wright A. (eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd ed. *Marcel Dekker, New York.* 375–395.

Ouwehand, A. C. and S. Vesterlund (2004). "Antimicrobial components from lactic acid bacteria." *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-139:* 375-396.

Oxman, T., Shapira, M., Diver, A., Klein, R., Avazov, N. and Rabinowitz, B. (2000) A new method of long-term preventive cardioprotection using *Lactobacillus*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278,H1717– H1724.

Papamanoli E., N. Tzanetakis E. Litopoulou-Tzanetaki and P. Kotzekidou (2003): Characterisation of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 65: 859- 867.

Papon M., Talon R. (1988): Factors affecting growth and lipase production by meat lactobacilli strains and *Brochothrix thermosphacta*. *Journal of Applied Bacteriology*. 64 :107-115.

Peña-Ramos, E.A. and Xiong, Y.L. (2001) Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system. *J Dairy Sci* **84**, 2577– 2583.

Peña-Ramos, E.A., Xiong, Y.L. and Arteaga, G.E. (2004) Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *J Sci Food Agric* **84**, 1908– 1918.

Penner, L.A., Dovidion, J.F., J.A. Piliavin and D.A. Schroeder (2005) Prosocial Behavior: multilevel perspectives. *Annual Review of Psychology* 56:365-92

Piatkiewicz A (1987) Lipase and esterase formation by mutants of lactic acid streptococci and lactobacilli. *Milchwissenschaft* 42, 561-564.

PILET M.F., MAGRAS C. et FEDERIGHI M., 2005. Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.

Pilet M.F; Dousset X.; Barre R., Novel G., Dcsmazeaud M. et Piard, J.C. (1995) : Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 58:256-262.

Pokonry J., Yanishlieva N. et Gordon H., 2001. Les antioxydants dans les aliments. Les applications pratiques. Woodhead Publishing limited. CRC Press. Cambridge Angleterre.

Rajalakshmi, D. and Narasimhan, S. (1996) Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In *Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives* ed. D.L. Madhavi, S.S. Deshpande and D.K. Salunkhe pp. 65– 157. New York: Marcel Dekker.

Ringø E., Bendiksen H.R., Wesmajervi M.S., Olsen R.E., Jansen P.A. et Mikkelsen. H. (2000a): Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmon salar* L.). *J. Appl. Microbiol.* 89: 317-322.

Ringø E., Gatesoupe F.J. (1998): Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160: 177-203.

Ringø E., Holzapfel W. (2000b): Identification and characterization of carnobacteria associated with the gills of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Syst Appl Microbiol.* 23: 523–527.

Ringø E., Lødemel J.B., Myklebust R., Kaino T., Mayhew T.M. et Olsen R.E. (2001): Epithelium-associated bacteria in the gastrointestinal tract of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). An electron microscopy study. *J Applied Microb* 90: 294-300.

- Ringø E., Olsen RE., Overli O. et Lovik F. (1997):**Effect of dominance hierarchy formation on aerobic microbiota associated with epithelial mucosa of subordinate and dominant individuals of Arctic charr, (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquacul Res* 28: 901- 904.
- Ringø E., Strøm E., Tabachek JA. (1995):** Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research*. 26: 773-789.
- Rival, S.G., Boeriu, C.G. and Wichers, H.J. (2001b)** Caseins casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J Agric Food Chem* 49, 295– 302.
- Rival, S.G., Fornaroli, S., Boeriu, C.G. and Wichers, H.J. (2001a)** Caseins casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *J Agric Food Chem* 49, 287– 294.
- Roselli, M., A. Finamore, et al. (2006).** "Probiotic bacteria Bifidobacterium animalis MB5 and Lactobacillus rhamnosus GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic Escherichia coli K88." *British journal of nutrition*95(06): 1177-1184.
- Ruiz, F. O., Gerbaldo, G., Asurmendi, P., Pascual, L. M., Giordano, W., and Barberis, I. L. (2009)** Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between Lactobacillus strains. *Curr Microbiol.*59: 497-501.
- Saarela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminen, S. and Mattila-Sandholm, T. (2002)** Gut bacteria and health foods – the European perspective. *Int J Food Microbiol* 78, 99– 117.
- Saiga, A., Tanabe, S. and Nishimura, T. (2003)** Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J Agric Food Chem* 51, 3661– 3667.
- Satura et Federighi (1998).** In Essai d’optimisation de la production d’acide lactique sur lactosérum par Streptococcus thermophilus. Mémoire de magister. Option biochimie et microbiologie appliquées. Université M’Hmed Bougara –Boumerdés
- SAXELIN M., PESSI T. et SALMINEN S., (1995).** Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *International Journal of Food Microbiology*, 25: 199-203.
- Schulz, S. ; Keatinge, J. D. H. ; Wells, G. J., 1999.** Productivity and residual effects of legumes in rice-based cropping systems in a warm-temperate environment. II. Residual effects on rice. *Field Crops Res.*, 61 (1): 37-49
- Servin AL. (2004).** Antagonistic activity of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS. Microbiol. Rev.* 28: 405-440.
- Smirnoff, N. (2005).** *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* (Blackwell).

- Smirnoff, N. (2005).** *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* (Blackwell).
- STILES M.E. and HOLZAPFEL W.H., 1997.** Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- Strøm E. (1988):** Melkesyrebakterier i fisketarm. Isolasjon, karakterisering og egenskaper. Thèse de MSCI. L' Collège norvégien des sciences halieutiques ŽEn norvégien., 88 p.
- Strøm E., Olafsen J.A. (1990):** The indigenous microflora of wild-captured juvenile cod in net-pen rearing. *Microbiology in Poecilotherms.* Elsevier, Amsterdam, pp. 181–185.
- Strøm E., Ringo E. (1993):** Changes in bacterial flora in developing cod, *Gadus morhua* _L., larvae after inoculation of *Lactobacillus plantarum* in the water. In: Walther, B., Fyhn, H.J. _Eds., *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Larval Development.* Univ. of Bergen. 4: 226–228.
- Suetsuna, K., Ukeda, H. and Ochi, H. (2000)** Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J Nutr Biochem* **11**, 128– 131.
- Talon G., Walter D., Montel M.C. 2000.** Growth and effect of staphylococci and lactic acid bacteria on unsaturated free fatty acids. *Meat science.*54 :41-47.
- Tamime A.Y., 2002.** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3^{ème} Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, pp261-366.
- Tarnawski M., Depta K., Grejciun D., Szelepin B., 2006.** HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract - a natural immunomodulator. *J.Pharm. Biomed.Anal.* 41: 182–188.
- Terahara, M., Kurama, S. and Takemoto, N. (2001)** Prevention by lactic acid bacteria of the oxidation of human LDL. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 1864– 1868.
- Trust T.J. et Sparrow R.A.H. (1974):** La flore bactérienne dans le tractus digestif des poissons salmonidés en eau douce. *Can. J. Microbiol.* 20: 1219-1228.
- Turchet et al., 2003** Tamime and Robinson's Yoghurt
- Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM, Forti G, Modeo ME, Gigliobianco A.** Low dose balsalazide plus a high potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Med Sci Monit* 2004;10(11):126-31.
- Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM, Forti G, Modeo ME, Gigliobianco A.** Low dose balsalazide plus a high potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or

mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Med Sci Monit* 2004;10(11):126-31.

Umemoto Y. et Sato Y.1975 : lipolysis by lactic acid bacteria recognized through color changes of dye-strained butter fats on double-layered agar plates. *Milchwissenschaft*.30 :591-594.

Vanderpool, C., F. Yan, et al. (2008). "Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases." *Inflammatory bowel diseases*14(11): 1585-1596

Vasiljevic T., Shah N.P.et Jelen P. (2005): Growth characteristics of *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus* ATCC .11842 as affected by different neutralizers. *Aust J Dairy Technol*.60: 3-9

Zommara, M., Tachibana, N., Sakomo, M., Suzuki, Y., Oda, T., Hashida, H. and Imaizumi, K. (1996)Whey from cultured skim milk decreases serum cholesterol and increases antioxidant enzymes in liver and red blood cells in rats. *Nutr Res* **16**, 293– 302.

Annexes

Annexes

Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Composition	g/l
Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Glucose	20g
Acétate de sodium trihydraté	5g
Citrate d'ammonium	2g
Tween 80	1ml
Hydrogénophosphate de potassium	2g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0.2g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0.05g

pH= 6.5 et 5.4

Autoclavage 120°C pendant 20min

bouillon M17 bouillon (Terzaghi et Sandine,1975)

Extrait de viande	5g
Extrait de levure	2,5g
Tryptone	5g
Peptone de soja	2,5g
Peptone pepsine de viande	5g
Acide ascorbique	0,5g
lactose	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Mg SO4	0,25g
Eau distillé	1000ml

ph=7, 1

Stérilisation par autoclavage à 120C° pendant 15 min

Eau physiologique	
Chlorure de sodium	9g
Eau distillée	1000ml

Stérilisation à 120C° pendant 20 min