

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 BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BOUKHATEM Naima

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie appliquée

THÈME

Exploration de l'activité anti-
oxydante de certaines bactéries
probiotiques isolées à partir du poisson

Soutenue publiquement le/...../2020

DEVANT LE JURY

Président	Dr. CHAALEL Abdelmalk	MCA	U.Mostaganem
Encadreur	Dr. YAHLA Imène	MCB	U.Mostaganem
Examinatrice	Dr. KOUADRI Boudjelthia Nacima	MAA	U.Mostaganem

Thème réalisé au.....

Remerciements

*Avant tout je remercie **le bon Dieu** le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience qui m'a permet de réaliser ce modeste travail. Merci de m'avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Je tiens à exprimer mes profonde gratitude et mes vifs Remerciements à mon encadreur, **Dr.Yahla Imène** qui m'a fait l'honneur de diriger mon mémoire sur un sujet passionnant et m'a bien voulu prendre en charge et m'a guidé tout au long de son élaboration. Je lui témoins mes gratitude Et ma reconnaissance.*

*J'adresse un grand remerciement au **Dr Chaalel Abdelmalek** d'avoir accepté de présider le jury et à **Dr Kouadri Boudjelthia Nacima** d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

Résumé

Le stress oxydatif est la cause de diverses maladies chroniques humaines. Il est causé par une activité accrue des espèces oxydantes réactives (ROS) par le processus d'oxydation, l'objectif de ce travail est d'étudier le potentiel antioxydant de certaines bactéries lactiques. Les souches ont été testées pour leur capacité de Piégeage des radicaux libres par 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), et leur effet d'anti peroxydation lipidique. Les résultats obtenus par différents chercheurs indiquent que *L. curvatus* et *L. paracasei* ont d'excellentes activités de piégeage de DPPH ($59,67\% \pm 6,68\%$) et une inhibition de la peroxydation lipidique, en outre *L. plantarum* et *L. mesenteroides* possèdent de bonnes propriétés antioxydantes, aussi une capacité antioxydante a été trouvée pour les cellules intactes et les extraits intracellulaires des bactéries intestinales *B. longum* et *L. acidophilus* in vitro avec des taux allant de 43,2% à 52,1%.

Mots clés : bactéries lactiques, probiotique, effet antioxydant, peroxydation lipidique.

Abstract

Oxidative stress is the cause of various chronic human diseases. It is caused by an increased activity of reactive oxidizing species (ROS) by the oxidation process. The objective of this work is to study the antioxidant potential of certain lactic acid bacteria. The strains were tested for their ability to scavenge free radicals by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and their anti-lipid peroxidation effect. The results obtained by different researchers indicate that *L. curvatus* and *L. paracasei* have excellent DPPH scavenging activities ($59.67\% \pm 6.68\%$) and inhibition of lipid peroxidation, in addition *L. plantarum* and *L. mesenteroides* have good antioxidant properties, also antioxidant capacity has been found for intact cells and intracellular extracts of intestinal bacteria *B. longum* and *L. acidophilus* in vitro with levels ranging from 43.2% to 52.1%.

Keywords: lactic acid bacteria, probiotic, antioxidant effect, lipid peroxidation.

المخلص

الإجهاد التأكسدي هو سبب العديد من الأمراض المزمنة التي تصيب الإنسان. و ينتج عن زيادة نشاط الأنواع المؤكسدة التفاعلية (ROS) من خلال عملية الأكسدة. و الهدف من هذا العمل هو دراسة إمكانات مضادات الأكسدة لبعض بكتيريا حمض اللاكتيك. تم اختبار السلالات لقدرتها على إزالة الجذور الحرة واسطة DPPH و تأثيرها المضاد للدهون، و تشير النتائج التي حصل عليها باحثون مختلفون إلى أن *L.curvatus* و *L.paracasei* تمتلك أنشطة اقتناص ممتازة لل DPPH ($59.67\% \pm 6.68\%$) و تثبيط بيروكسيد الدهون بالإضافة إلى *L.plantarum* و *L.mesenteroides* لها خصائص مضادة للأكسدة، كما تم العثور على قدرة مضادات الأكسدة للخلايا السليمة و المستخلصات داخل الخلايا من البكتيريا المعوية *B. longum* و *L. acidophilus* بنسب تتراوح من 43.2% إلى 52.1%.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك ، بروبيوتيك ، تأثير مضاد للأكسدة ، بيروكسيد الدهون.

Table de matières

Remerciement	
Résumé	
Abstract	
المخلص	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
Chapitre 1 : les bactéries lactiques et les propriétés probiotiques	
I.1. Les bactéries lactiques.....	3
I.1.1. Généralités sur les bactéries lactiques.....	3
I.1.2. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques.....	3
I.1.3. Habitat et origine des bactéries lactiques.....	4
I.1.4. Taxonomie des bactéries lactiques.....	4
I.1.5. Les principaux genres des bactéries lactiques.....	5
I.1.5.1. <i>Lactobacillus</i>	5
I.1.5.2. <i>Streptococcus</i>	5
I.1.5.3. <i>Lactococcus</i>	5
I.1.5.4. <i>Enterococcus</i>	6
I.1.5.5. <i>Leuconostoc</i>	6
I.1.5.6. <i>Bifidobacterium</i>	6
I.1.6. Métabolismes des bactéries lactiques.....	7
I.1.7. Principale voie fermentaire des bactéries lactiques.....	7
I.1.7.1. La fermentation homolactique.....	7
I.1.7.2. La fermentation hétérolactique.....	7
I.8. Les bactéries lactiques dans la flore intestinale.....	8
I.1.9. Interaction avec d'autres microorganismes.....	9
I.1.10. Rôle et intérêt des bactéries lactique.....	9
I.1.10.1. Dans le domaine de l'industrie alimentaire.....	9
I.1.10.2. Dans la conservation des aliments.....	10
I.1.10.2.1. L'acidification du pH par l'acide lactique.....	10
I.1.10.2.2. Le peroxyde d'hydrogène.....	10
I.1.10.2.3. Le dioxyde de carbone.....	10
I.2. Propriétés probiotiques.....	11
I.2.1. Historique.....	11
I.2.2. Définition.....	11
I.2.3. Souches à fort potentiel probiotique.....	11
I.2.4. Les critères de sélections.....	12
I.2.4.1. La résistance à l'acidité gastrique.....	12
I.2.4.2. La résistance contre les sels biliaires.....	12
I.2.4.3. La production de substances antimicrobiennes.....	12
I.2.4.4. Résistance aux antibiotiques.....	12
I.2.5. Rôle des Probiotiques.....	13
I.2.6. Applications des Probiotiques.....	13
I.2.7. La capacité antioxydante des bactéries lactiques.....	14
Chapitre II : Le stress oxydatif et activité antioxydant	
II.1. Histoire des radicaux libres.....	16
II.2. Le stress oxydatif.....	16
II.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	16
II.2.2. L'oxydation des protéines.....	17
II.2.3. La peroxydation lipidique.....	17

II.3. L'activité antioxydante.....	18
II.3.1. Les antioxydants.....	18
II.3.1.1. Les antioxydants enzymatiques.....	18
II.3.1.1.1. Le superoxyde dismutase (SOD).....	18
II.3.1.1.2. Catalase.....	19
II.3.1.1.3. Le glutathion.....	19
II.3.1.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	19
II.3.2. Mécanisme d'action des antioxydants.....	19
II.3.3. L'activité antioxydante de certaines bactéries probiotiques.....	20
II.3.4. Mode d'action du pouvoir antioxydante des probiotique.....	20
II.3.4.1. Capacité de chélation des ions métalliques.....	21
II.3.4.2. Système impliquant les enzymes antioxydantes.....	22
II.3.4.3. Métabolites antioxydantes.....	22
II.3.5. Les influences antioxydantes des probiotiques en régulant la composition du microbiote.....	23

Chapitre III: Matériel et méthode

III.1. Matériel.....	25
III.1.1 L'objectif.....	25
III.1.2. Matériels utilisés.....	25
III.1.2.1. Origine des souches tests.....	25
III.1.2.3. Les milieux de culture.....	26
III.2. Méthodes.....	26
III.2.1. Repiquage et revivification des souches.....	26
III.2.2. Vérification de l'identité des souches.....	26
III.2.2.1. Caractérisation macroscopique.....	26
III.2.2.2. Caractérisation microscopique.....	27
III.2.2.3. Coloration de Gram.....	27
III.2.2.3.1. Préparer un frottis.....	27
III.2.2.3.2. La coloration	27
III.2.2.4. Test de la catalase.....	27
III.2.3. Préparation des dilutions décimales.....	27
III.2.4. Détermination de l'activité antioxydante.....	28
III.2.5.Capacité de Piégeage des radicaux libres par 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle(DPPH).....	28
III.2.6. Anti peroxydation lipidique.....	30

Chapitre IV: résultats et discussion

IV.1. Capacité de Piégeage des radicaux libres par 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH).....	32
IV.2. Anti peroxydation lipidique.....	35
Conclusion.....	38
Référence bibliographique.....	40
Annexe.....	46

Liste des abréviations

ALPO: La peroxydation anti-lipidique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

FAO: Food and Agriculture Organization

GC: Guanine Cytosine

LAB : Bactéries lactiques

MRS : Milieu de Man Rogosa Sharpe

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PBS : Phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)

pH : Potentiel d'Hydrogène

ROS : Espèce réactives de l'oxygène.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des principales souches microbiennes considérées comme probiotiques.	11
Tableau 2 : Les différentes souches utilisées dans les tests étudiées	25
Tableau 3 : Capacité antioxydante de <i>L. curvatus</i> SR6 et <i>L. paracasei</i> SR10-1	32
Tableau 4 : Activité de piégeage (%) du lactosérum du lait fermenté avec des isolats LAB à différents temps de fermentation.	33
Tableau 5 : Effet de Piégeage de <i>B. longum</i> ATCC 15708 et <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 sur les radicaux libres de DPPH	35
Tableau 6 : Capacité antioxydante de <i>L. curvatus</i> SR6 et <i>L. paracasei</i> SR10-1	36
Tableau 7 : l'antiperoxydation d'acide linoléique par <i>L. casei subsp. casei</i> SY13 et <i>L. delbrueckii subsp</i>	36
Tableau 8 : Inhibition de la peroxydation des lipides plasmatiques par <i>B. longum</i> ATCC 15708 ET <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	37

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique schématique non raciné des bactéries lactiques, y compris certains gram positifs aéro-anaérobies facultative de la subdivision à faible G+C.	05
Figure 2 : Deux voies de fermentations lactiques	08
Figure 3 : Concentration en bactéries le long du tube digestif.	09
Figure 4 : Sources d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)	17
Figure 5 : Modulation de l'antioxydation par les probiotiques.	21
Figure06 : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl)	29
Figure 7 : Effet de piègeur de DPPH des bactéries probiotiques.	34
Figure 8 : Capacité de récupération de SY13 et LJJ sur le radical DPPH	35

Introduction

Certaines bactéries lactiques (LAB) sont appelées «probiotiques». Les probiotiques ont été définis comme «des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO / OMS, 2002). Ces dernières années, les consommateurs se sont de plus en plus intéressés aux aliments probiotiques et la demande de produits probiotiques a augmenté en conséquence. La promotion du développement d'aliments probiotiques devient de plus en plus importante. Les bactéries lactiques (LAB) sont généralement considérées comme sûres et ont un statut de qualité alimentaire (Charchoghlyan et Park., 2013).

Les dommages oxydatifs jouent un rôle dans de nombreuses maladies dégénératives comme le cancer, l'emphysème, la cirrhose, l'athérosclérose et l'arthrite ont tous été corrélés aux dommages oxydatifs, le stress oxydatif peut endommager les biomolécules, y compris les protéines, les lipides et les acides nucléiques, lorsque des espèces réactives de l'oxygène sont générées à la suite d'un excès ou d'un déficit de défenses cellulaires (Pieniz *et al.*, 2015).

Les systèmes antioxydants potentiels des LAB protègent les cellules en réduisant les dommages potentiels des ROS et aident à maintenir l'homéostasie redox (Zhang et Li., 2012)

De nombreuses recherches se concentrent sur l'investigation de nouvelles molécules et substances pour aider l'organisme à lutter contre le stress oxydatif; parmi eux l'utilisation de bactéries probiotiques. Diverses espèces de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* et *Lactococcus lactis* et certaines espèces d'*Enterococcus* sont les bactéries probiotiques les plus couramment utilisées (Idoui et Sifour, 2016; Jäger *et al.*, 2016)

L'objectif principal de ce travail était de cribler le potentiel antioxydant de certaines bactéries lactiques, Les propriétés probiotiques et la capacité antioxydante ont été étudiées.

Chapitre I

Les bactéries lactiques et probiotiques

I.1. Les bactéries lactiques

I.1.1. Généralités

Les bactéries lactiques sont de très anciennes bactéries, observées avant les cyanobactéries (Drider et Prevost, 2009). Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle.

Les «bactéries d'acide lactique» (LAB) se réfèrent à un grand groupe de bactéries, qui produisent de l'acide lactique comme sous-produit de la digestion de leur source de nourriture (généralement des glucides). L'acide lactique s'accumule pour fermenter ou «mariner» les aliments, les LAB sont répandues dans la nature et sont des probiotiques bénéfiques dans nos systèmes digestifs. Elles font partie des groupes de micro-organismes les plus importants utilisées dans la fermentation des aliments, contribuant au goût et à la texture des produits fermentés et inhibant la détérioration des aliments causée par d'autres micro-organismes. Les LAB sont responsables de la production de yaourt, fromage, beurre de culture, crème sure, saucisse, olives et choucroute (Ikeda *et al.*, 2013).

I.1.2. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques constitue un groupe hétérogène dont le caractère commun est la production d'acide lactique suite à la fermentation des glucides (Labioui *et al.*, 2005).

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes en forme de coques ou de bâtonnets, Gram-positif, incapables de produire la catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase), généralement immobiles et asporulées (Dellagio *et al.*, 1994).

En présence d'oxygène elles sont incapables de phosphorylation oxydative, de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, facteurs de croissance, peptides, base purique et pyrimidique, des vitamines B et des acides gras. Elles ont également une activité aromatique très importante d'où leur utilisation en agroalimentaire (Leveau *et al.*, 1991).

Sur la base des caractéristiques de fermentation, les bactéries lactiques sont homofermentaires ou hétérofermentaire (Dortu, 2008) et tolèrent des pH acides. Cette dernière propriété est utilisée en agroalimentaire pour acidifier le milieu et empêcher le développement des bactéries pathogènes et d'altérations (Nielsen *et al.*, 2008).

Elles sont généralement mésophiles mais certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement à pH 4,0-4,5 et certaines sont encore actives à des valeurs de pH extrêmes comme 9,6 ou 3,2. Elles possèdent des tolérances très variables vis-à-vis du NaCl et possèdent de faibles activités protéolytiques et lipolytique (Caplice et Fitzgerald, 1999)

I.1.3. Habitat et origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Hassan et Frank, 2001).

I.1.4. Taxonomie des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont parfois classifiées en fonction de leur température optimale de croissance : 20 à 30° C pour les mésophiles, 40 à 45° C pour les thermophiles. Ces deux grandes familles de bactéries n'ont pas également les mêmes métabolismes azotés : on considère que les mésophiles ne sont protéolytiques qu'après leur lyse, alors que les thermophiles sont protéolytiques durant leur croissance. (Joubert, 2016)

La classification peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires.(figure1) Cependant, la caractérisation phénotypique /biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme, 1996 ; Ho *et al.*, 2007).

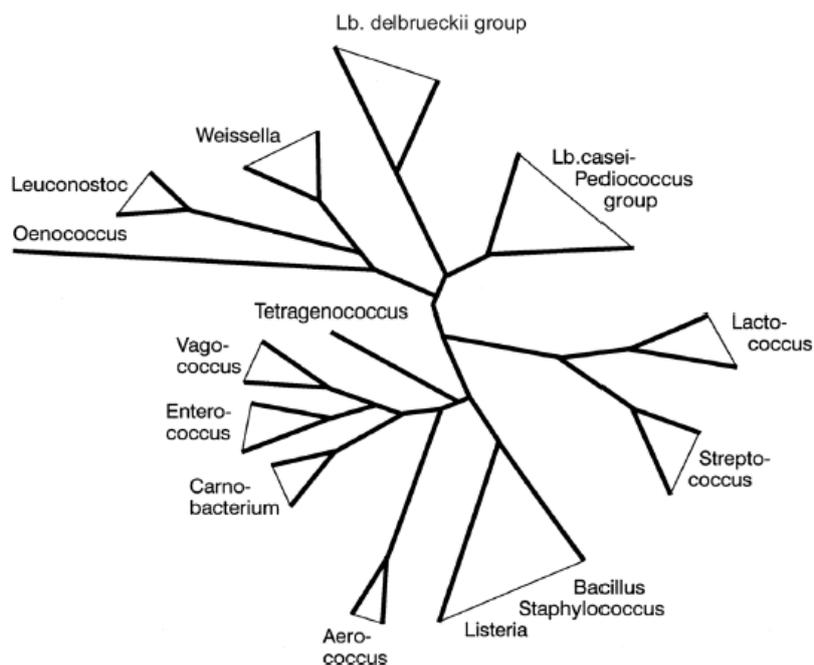


Figure 1 : Arbre phylogénétique schématisé non raciné des bactéries lactiques, y compris certains gram positifs aéro-anaérobies facultative de la subdivision à faible G+C. (salminen *et al.*, 2004)

I.1.5. Les principaux genres des bactéries lactiques

I.1.5.1. *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 qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990).

I.1.5.2. *Streptococcus*

Appartenant à la famille des *Streptococcaceae*. Les espèces de ce genre sont des cellules ovoïdes, sphériques ou quelque fois allongées en fuseaux en paires ou en chaînettes. Les streptocoques lactiques se distinguent par leur capacité de croître à 45°C.

I.1.5.3. *Lactococcus*

Le groupe de lactocoques correspond aux streptocoques mésophiles de la flore lactique. Elles sont généralement microaérophiles et se développent à 30°C.

Leur fermentation de sucre est homolactique et donne l'acide lactique comme produit final.

Les lactocoques peuvent se trouver dans les aliments comme les produits laitiers, elles sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire, les espèces les plus importantes sont : *Lactococcus lactis* et *Lactococcus cremoris* (Stiles et Holzapfel 1997)

I.1.5.4. *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* regroupe les *streptocoques* fécaux qui présentent une hémolyse de type α , β , et qui appartiennent au groupe sérologique D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *E.faecalis* (auparavant *Streptococcus faecalis*), et ses variétés *E.durans* et *E.bovis*). Les *Enterococcus* sont les bactéries lactiques les plus controversées (Franz *et al.*, 2003).

I.1.5.5. *Leuconostoc*

Ils représentent les coques hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol, et se regroupent en paires ou en chainettes mésophiles. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Ho *et al.*, 2007).

I.1.5.6. *Bifidobacterium*

Traditionnellement, le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C > mol 50% et affecté au phylum des Actinobacteria (Gomez et Malcata, 1999 ; Leahy *et al.*, 2005). Néanmoins, les bifidobactéries sont également considérées comme des bactéries lactiques, en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro-intestinal (Klein *et al.*, 1998). En effet, elles ont généralement un pH optimal de croissance autour de 6.5 à 7 et une température de croissance comprise entre 37°C et 41°C. Elles ont la forme irrégulière d'un V ou une morphologie bifide en forme de Y. Elles sont hétérofermentaires et dégradent les hexoses en produisant de l'acide lactique et acétique (Gomez et Malcata, 1999).

I.1.6. Métabolismes des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent des microorganismes appartenant à plusieurs genres ayant la capacité de fermenter les sucres en acide lactique. Les sucres peuvent être des monosaccharides tels que les hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), des hexitols ou des pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des dissaccharides (lactose, saccharose, cellobiose, maltose, tréhalose). La capacité à métaboliser les sucres est fonction des souches considérées (Axelsson, 2004).

I.1.7. Principale voie fermentaire des bactéries lactiques

Les fermentations lactiques ont comme produit final l'acide lactique, un acide faible qui fait baisser le pH. Un milieu dépourvu de dioxygène favorise les fermentations lactiques, bien que la présence de dioxygène n'inhibe pas les enzymes impliquées dans ces voies métaboliques. On distingue deux voies de fermentations lactiques la figure 2 démontre les deux voies de fermentation lactiques

I.1.7.1. La fermentation homolactique

Constituée de la voie de la glycolyse (également appelée voie d'EmbdenMeyerhof) puis de la conversion de 2 molécules de pyruvate en 2 molécules de lactate. Divers hexoses (glucides à 6 carbones), comme le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le lactose ou le saccharose peuvent être oxydés par cette voie. La fermentation homolactique apporte un gain net de 2 ATP par molécule de glucose oxydée. Cette voie est réalisée par les bactéries dites homofermentaires, appartenant aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, et *Streptococcus*.

I.1.7.2. La fermentation hétérolactique

Aussi appelée voie des transcétolases. En plus de l'acide lactique, les produits finaux de cette fermentation sont également le CO₂, l'éthanol, et en plus faible proportion selon le substrat initial oxydé, l'acide acétique et le glycérol. Des hexoses, voire certains pentoses (glucides à 5 carbones), peuvent être utilisés comme substrat initial. La fermentation hétérolactique à partir du glucose apporte un gain net d'une seule molécule d'ATP. Les bactéries dites hétérofermentaires, appartenant aux genres *Lactococcus* ou *Leuconostoc*, réalisent la fermentation hétérolactique. D'autres voies métaboliques fermentaires, comme la voie du citrate, sont à l'origine de composés carbonés volatils conférant un arôme particulier aux aliments fermentés. (Mlouka , 2018)

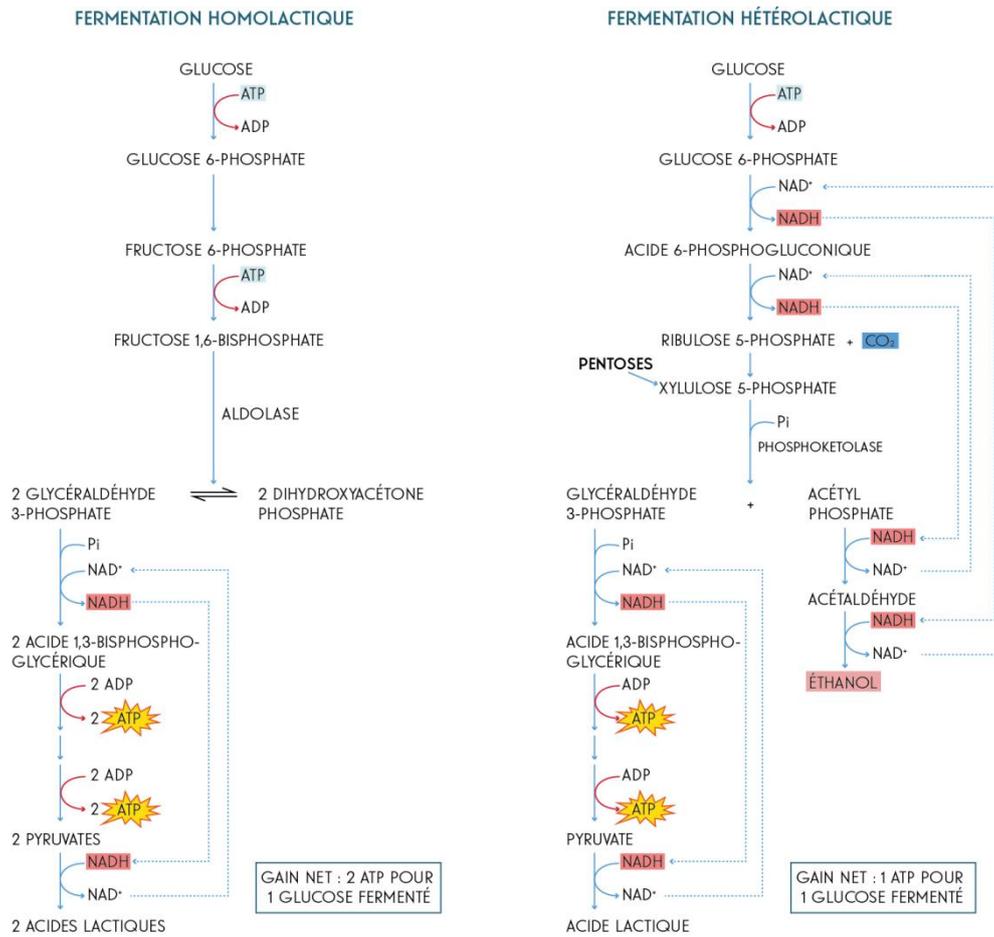


Figure 2 : Deux voies de fermentations lactiques (Mlouka, 2018)

I.1.8. Les bactéries lactiques dans la flore intestinale

Le microbiote intestinal est propre à chaque individu, d'un point de vue qualitatif et quantitatif, la figure suivante démontre que les bactéries lactiques sont observées tout au long du tube digestif. La concentration en bactéries le long de tube digestif est illustrée sur la figure 3.

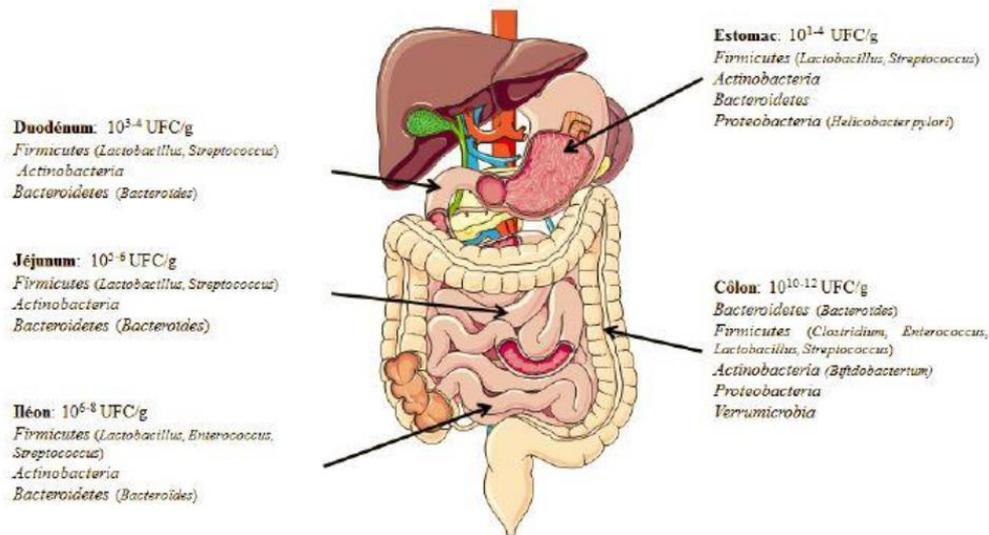


Figure 3 : Concentration en bactéries le long du tube digestif. (Dolié, 2018)

I.1.9. Interaction avec d'autres microorganismes

Dans les aliments ou boissons amylicés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest, les bactéries lactiques coexistent souvent avec d'autres micro-organismes, Les bactéries lactiques et les levures sont les micro-organismes dominants généralement rencontrés dans la plupart des produits fermentés à base de céréales et de manioc en Afrique de l'Ouest. Le développement des bactéries lactiques pourrait être stimulé par la présence de composés azotés solubles et de facteurs (vitamines B, CO₂, pyruvate, propionate, succinate, acétate) produits par les levures.

De plus, l'environnement acide créé par les bactéries lactiques favoriserait la croissance des levures. Ainsi l'alcool produit par la levure, les acides produits par les bactéries et l'anaérobiose induite par la fermentation, permettraient de supprimer les champignons filamenteux et les bactéries associées à la détérioration des aliments (YAO *et al.*, 2009)

I.1.10. Rôle et intérêt des bactéries lactique

I.1.10.1. Dans le domaine de l'industrie alimentaire

L'implication des bactéries lactiques dans la fermentation et la bioconservation des aliments est connue depuis très longtemps. Les souches de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* sont utilisés pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateen *et al.*, 2008). Les bactéries lactiques sont aussi responsables de l'ouverture des fromages par production de CO₂, de la texture produits fermentés, par production des

exopolysaccharides ainsi que de la production de peroxyde d'hydrogène ou de bactériocines qui inhibent la croissance de bactéries indésirables (Doleyres,2003).

I.1.10.2. Dans la conservation des aliments

L'utilisation des bactéries lactiques a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et par conséquent augmenter la durée de leur conservation sans ajout de conservateurs chimiques (Mlouka , 2018).

I.1.10.2.1. L'acidification du pH par l'acide lactique

C'est la base de la conservation des aliments fermentés, qui peuvent être ainsi gardés à température ambiante pendant plusieurs mois. Elle procure également le goût aigre de certains aliments fermentés. De plus, certaines bactéries lactiques produisent également des substances antibiotiques de nature peptidique, appelées bactériocines, pour éliminer les bactéries compétitrices. Par exemple, *Lactococcus lactis* produit de la nisine, une bactériocine inhibant la croissance des pathogènes alimentaires *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*. La nisine est d'ailleurs utilisée actuellement comme conservateur alimentaire (Mlouka , 2018)

I.1.10.2.2. Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents microorganismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires, son action se manifestera aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux qui sont indispensables au bon déroulement de la fermentation. Il est donc rarement utilisé pour son activité inhibitrice. D'autre part, son action oxydante peut avoir un effet néfaste sur la santé humaine (Zalan *et al.*, 2005).

I.1.10.2.3. Le dioxyde de carbone

Celui-ci est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (Ammor et Mayo, 2007).

I.2. Propriétés probiotiques

I.2.1. Historique

Le début de l'histoire des probiotiques dans le domaine scientifique est associé à la microbiologiste russe Ilya Metchnikoff (1845-1916), auteur de l'ouvrage du début du XXe siècle intitulé «La dépendance des microbes intestinaux à l'égard des aliments permet d'adopter des mesures de modifier la flore de notre corps et de remplacer les microbes nuisibles par des microbes utiles ». Metchnikoff a associé la bonne santé et la longévité exceptionnelle des groupes d'habitants d'Europe de l'Est à leur consommation ordonnée de produits laitiers fermentés, Selon les auteurs contemporains Havenaar et Huis In't Veld (Havenaar & Huis In't Veld, 1992), un probiotique est une culture mono ou mixte de micro-organismes vivants qui, appliquée à l'animal ou à l'homme, affecte avantageusement l'hôte en améliorant les propriétés de la microflore indigène »

I.2.2. Définition

En 2001, un comité d'experts de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture (Food and Agricultural Organization, FAO) et de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) définissait les probiotiques comme des micro-organismes vivants, qui, lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante dans l'alimentation, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (Food and Agricultural Organization et World Health Organization, 2001).

Ils peuvent être intégrés dans différent types de produits, y compris les aliments, les médicaments et les suppléments alimentaires (Guarner *et al.*, 2011).

I.2.3. Souches à fort potentiel probiotique

Les principales souches reconnues en tant que probiotiques chez l'humain sont des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et des levures du genre *Saccharomyces*. Les espèces associées à chacun de ces groupes sont présentées au Tableau 1.

Tableau 1 : Liste des principales souches microbiennes considérées comme probiotiques. (Gagnon, 2007)

Lactobacilles	Bifidobactéries	Autres bactéries lactiques	Autre micro-organismes non lactiques
---------------	-----------------	----------------------------	--------------------------------------

<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>thermophilus</i>	<i>cerevisiae</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. breve</i>		
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. paracasei</i>	<i>B. lactis</i>		
<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

I.2.4. Les critères de sélections

Les micro-organismes doivent posséder diverses propriétés de survie, d'activité et de persistance dans le tractus digestif qui leurs permettront d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte. Ces propriétés sont propres à chaque souche et ne peuvent pas être extrapolées d'une souche à l'autre même au sein d'une seule espèce (Dunne *et al.*, 2001)

I.2.4.1. La résistance à l'acidité gastrique

Avant d'atteindre le tractus intestinal, les bactéries probiotiques doivent d'abord survivre au transit par l'estomac, où la sécrétion d'acide gastrique constitue un mécanisme de défense primaire contre la plupart des micro-organismes ingérés. (Dunne *et al.*, 2001) et aussi avoir la capacité de proliférer dans l'intestin pour exercer leur effets bénéfiques sur l'hôte.

I.2.4.2. La résistance aux sels biliaires

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotique. Les bactéries qui surviennent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels en les hydrolyses avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité (Ammor et Mayo, 2007)

I.2.4.3. La production de substances antimicrobiennes

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide\bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Labioui *et al.*,2005).

I.2.4.4. La résistance aux antibiotiques

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leur structure et physiologie. Les travaux de Temmerman *et al.* (2003) ont montré que 68,4 des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. Des souches de *Lactobacillus* ont été trouvées résistantes à la Kanamycine 81, à la tétracycline 29,5, à l'érythromycine 12 et au chloramphénicol 8,5.38 des isolats d'*Enterococcus faecium* ont été trouvés résistants à la vancomycine.

I.2.5. Rôle des Probiotiques

Effets intestinaux : Contrôle des troubles suivants :

- Mauvaise digestion du lactose, Diarrhée, Syndrome du côlon irritable, Constipation
- Infection par *Helicobacter pylori*, Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle
- Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (colite ulcéreuse et maladie de Crohn)
- Prévention de l'entéocolite nécrosante du nouveau-né

Effets sur le système immunitaire :

- Modulation immunitaire
- Répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation
- Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (*Salmonella*, *Shigella*)

Autres effets :

Réduction du risque de :

- Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein)
- Coronaropathie
- Maladie des voies urinaires
- Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes
- Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle (Patterson, 2008).

I.2.6. Applications des Probiotiques

Les différents produits commercialisés en tant que probiotiques humains ou animaux sont constitués soit d'un seul microorganisme (produits dits mono-souches) ou d'une association de plusieurs espèces (produits dits pluri-souches). De nos jours, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes (Patterson, 2008) :

-Un concentré de culture ajouté à des aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales.

-Un ingrédient ajouté à un aliment à base de lait ou de soja et auquel on permet d'atteindre une concentration élevée par fermentation.

-Des cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsule ou en comprimés.

Les probiotiques sont généralement associés aux produits laitiers de culture. la gamme de produits probiotiques comprend maintenant des fromages, des crèmes glacées et des yogourts glacés de même que des aliments et boissons non laitiers (Patterson, 2008).

I.2.7. La capacité antioxydante des bactéries lactiques

Différentes capacités antioxydantes des espèces de *lactobacilles* pour modifier le profil bactérien et prévenir le stress oxydatif dans le côlon de souris surchargées en Fe ont été étudiées, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle ainsi que la croissance des bactéries Fe dépendent sont encouragés par le fer (Fe). Les résultats de cette étude ont montré que le temps de survie de la souche de *L. rhamnosus GG* était significativement plus long en présence de H₂O₂ et de radical hydroxyle par rapport aux souches non antioxydantes, *L.paracasei* Fn032 et *plantarum* Fn001, respectivement. De plus, *L. paracasei* Fn032 et *L.plantarum* Fn001 étaient spécifiques des activités d'élimination des radicaux libres de leurs extraits libres intracellulaires. (Mishra *et al.*, 2015)

Chapitre II

Le Stress Oxydatif

II. Stress oxydatif et activité antioxydant

II.1. Histoire des radicaux libres

Au milieu des années 50, parmi les premiers, Gerschman et al, montrent que l'oxygène, molécule pourtant indispensable à la vie, présente également une toxicité pour l'organisme. Inspiré par ces travaux, Harman propose la «free radical theory of ageing»: via la production de radicaux libres (entités chimiques très instables et réactionnelles suite à la présence d'un électron libre dans leur structure), l'oxygène est à l'origine du processus de vieillissement cellulaire. En 1969, date clé dans l'histoire du stress oxydant, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant : le superoxyde dismutase (SOD) qui élimine le radical libre anion superoxyde produit par réduction univalente de l'oxygène. Cette découverte fondamentale montre indirectement que des radicaux libres sont produits dans notre organisme. (DEFRAIGNE et PINCEMAIL, 2008).

II.2. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est la cause de diverses maladies chroniques humaines. Il est causé par une activité accrue des espèces oxydantes réactives (ROS) par le processus d'oxydation. L'oxydation est une réaction chimique qui transfère les électrons d'une substance à un agent oxydant. Les réactions d'oxydation peuvent produire des radicaux libres ayant un électron non apparié et sont capables d'effectuer une réaction en chaîne rapide, déstabilisant ainsi d'autres molécules et générant d'autres radicaux libres. (Mishra *et al.*, 2015)

Le stress oxydatif se produira si la concentration d'oxygène est supérieure au niveau normal. De nombreux facteurs peuvent obliger les organismes à subir un stress oxydatif tels que les cigarettes, les herbicides, les oxydes d'azote, l'ozone, les radiations et certains métaux (Wang *et al.*, 2017)

II.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ERO sont présentes dans la cellule à des doses raisonnables : leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants (Migdal et Serres, 2011)

Les ROS, y compris les ions oxygène et les peroxydes, sont les produits d'un processus métabolique consommateur d'oxygène normal et sont souvent associés au principe du stress oxydatif. Les ROS peuvent être générés de manière endogène et exogène. (figure4) En raison de leur nature hautement réactive, les ROS peuvent modifier d'autres espèces d'oxygène, ADN, protéines ou lipides. On pense que des quantités excessives de ROS peuvent provoquer une instabilité génomique, conduisant à une variété de maladies chroniques, notamment l'athérosclérose, l'arthrite, le diabète, la maladie d'Alzheimer, les maladies neurodégénératives et les maladies cardiovasculaires. (Wang *et al.*, 2017)

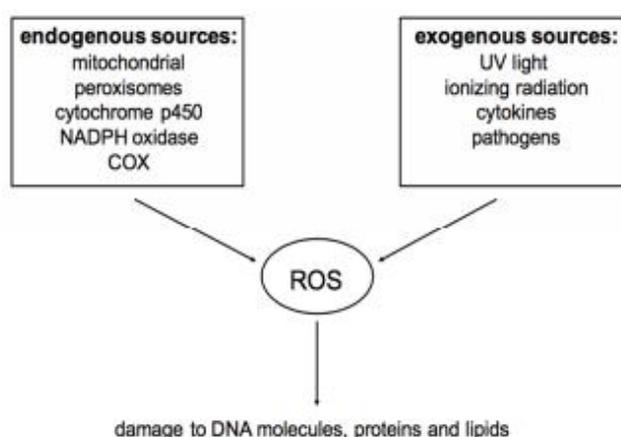


Figure 4 : Sources d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Wang *et al.*, 2017)

II.2.2. L'oxydation des protéines

Les protéines peuvent être modifiées par oxydation de trois manières: modification oxydative d'acides aminés spécifiques, clivage des peptides Médie par les radicaux libres et formation de la réticulation des protéines en raison de la réaction avec les produits de peroxydation lipidique. (Lobo *et al.*, 2010)

Le degré d'altération d'une protéine par oxydation dépend de plusieurs facteurs dont la nature de l'oxydant, la proximité d'un radical et du métal de transition par rapport à la protéine cible, la composition et la structure de la protéine. (baraibar *et al.*, 2013)

II.2.3. La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un processus de radicaux libres impliquant une source de radicaux libres secondaires, qui peut agir comme second messenger ou peut réagir directement avec d'autres biomolécules, améliorant les lésions biochimiques. La peroxydation lipidique se

produit sur l'acide gras polysaturé situé sur les membranes cellulaires et se poursuit en outre par une réaction en chaîne radicalaire. On pense que le radical hydroxyle initie le ROS et élimine l'atome d'hydrogène, produisant ainsi un radical lipidique et ensuite converti en conjugué diénique. De plus, par addition d'oxygène, il forme un radical peroxyde; ce radical hautement réactif attaque un autre acide gras formant un hydroperoxyde lipidique (LOOH) et un nouveau radical. Ainsi la peroxydation lipidique se propage. En raison de la peroxydation lipidique, un certain nombre de composés se forment, par exemple des alcanes, du malanoaldéhyde et des isoprotanes. Ces composés sont utilisés comme marqueurs dans le test de peroxydation lipidique et ont été vérifiés dans de nombreuses maladies telles que les maladies neurogénératives, les lésions de reperfusion ischémique et le diabète. (Lobo *et al.*, 2010)

La biosynthèse des peroxydes lipidiques peut être réalisée par des enzymes ou via des processus non enzymatiques. (Gaschler et Stockwell., 2017)

II.3. L'activité antioxydante

II.3.1. Les antioxydants

Un antioxydant est une molécule suffisamment stable pour donner un électron à un radical libre déchaîné et le neutraliser, réduisant ainsi sa capacité d'endommager. Ces antioxydants retardent ou inhibent les dommages cellulaires principalement par leur propriété d'élimination des radicaux libres. Ces antioxydants de faible poids moléculaire peuvent interagir en toute sécurité avec les radicaux libres et interrompre la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. (Lobo *et al.*, 2010)

II.3.1.1. Les antioxydants enzymatiques

Le système humain possède des enzymes qui neutralisent les espèces réactives formées. La superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase sont des enzymes antioxydantes qui jouent non seulement un rôle fondamental mais indispensable dans la capacité de protection antioxydante des systèmes biologiques contre les attaques des radicaux libres. (Ighodaro et Akinloye, 2018).

II.3.1.1.1. La superoxyde dismutase (SOD)

la première enzyme de détoxification et l'antioxydant le plus puissant de la cellule. Il s'agit d'une enzyme antioxydante endogène importante qui agit comme un composant du système de défense de première ligne contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Il catalyse la dismutation de deux molécules d'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène moléculaire (O_2), rendant ainsi l'anion superoxyde potentiellement dangereux moins dangereux. (Ighodaro et Akinloye, 2018).

II.3.1.1.2. Catalase

La catalase est une enzyme commune présente dans presque tous les organismes vivants, qui sont exposés à l'oxygène, où elle fonctionne pour catalyser rapidement la décomposition du peroxyde d'hydrogène en molécules d'oxygène gazeux et d'eau moins réactives. Tous les animaux connus utilisent la catalase dans tous les organes, avec des concentrations particulièrement élevées dans le foie. (Lobo *et al.*, 2010)

II.3.1.1.3. Le glutathion

Le glutathion ou γ -glutamylcystéinyglycine est le principal antioxydant non enzymatique, impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires. C'est un tripeptide omniprésent qui régule l'homéostasie redox intracellulaire et est présent sous forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG). (Ali *et al.*, 2019)

II.3.1.2. Les antioxydants non enzymatiques

Les micronutriments alimentaires constituent de nombreux antioxydants non enzymatiques solubles dans l'eau et les lipides trouvés dans le système mammifère. Les antioxydants importants comprennent la vitamine A, la vitamine C (acide ascorbique) et la vitamine E (tocophérol et tocotriénol). Ces antioxydants agissent comme une barrière de défense contre les radicaux libres et les oxydants non radicaux et empêchent l'agression de l'ADN, des protéines, des lipides et d'autres molécules induites par les oxydants. (Ali *et al.*, 2019)

II.3.2. Mécanisme d'action des antioxydants

Deux principaux mécanismes d'action ont été proposés pour les antioxydants : Le premier est un mécanisme de rupture de chaîne par lequel l'antioxydant primaire donne un électron au radical libre présent dans les systèmes. Le second mécanisme implique l'élimination des ROS / initiateurs d'espèces réactives de l'azote (antioxydants secondaires) par trempe du catalyseur initiateur de chaîne. (Lobo *et al.*, 2010)

II.3.3. L'activité antioxydante de certaines bactéries probiotiques

Le potentiel antioxydant du LAB probiotique pourrait être particulièrement pertinent pour l'infection à médiation par *Clostridium difficile*, car elle implique une toxicité intestinale à médiation par entérotoxine, qui est associée à une production accrue de radicaux libres et à une régulation à la hausse des voies inflammatoires. Étant donné que les souches LAB possèdent de multiples mécanismes d'action antioxydante, des combinaisons de ces probiotiques pourraient augmenter la capacité de réguler les changements d'état redox causés par une infection à *C. difficile*.

À ce jour, *Saccharomyces boulardii* est le seul probiotique signalé à montrer une réponse efficace aux entérotoxines produites par *C. difficile*, ce qui pourrait inclure des mécanismes de protection indirects impliquant une réduction de la génération de radicaux libres. Il existe peu de documentation sur les propriétés antioxydantes directes de *S. boulardii*, mais Suryavanshi et al, ont montré que ce probiotique peut agir, dans les cultures en croissance, comme un puissant piègeur de radicaux libres via la production de métabolites antioxydants. Certaines études ont également montré une réduction de la diarrhée associée à *C. difficile* lorsqu'elle est complétée par *S. boulardii* et *Lactobacillus rhamnosus*. (Gaisawat *et al.*, 2019)

II.3.4. Mode d'action du pouvoir antioxydante des probiotique

Plusieurs études ont démontré que différentes souches de bactéries probiotiques pouvaient exercer une capacité antioxydante de différentes manières. Cependant, peu d'examens concernant la base des mécanismes antioxydants des probiotiques ont été trouvés. La figure 5 montre le mode d'action du pouvoir antioxydante des probiotique. (Wang *et al.*, 2017)

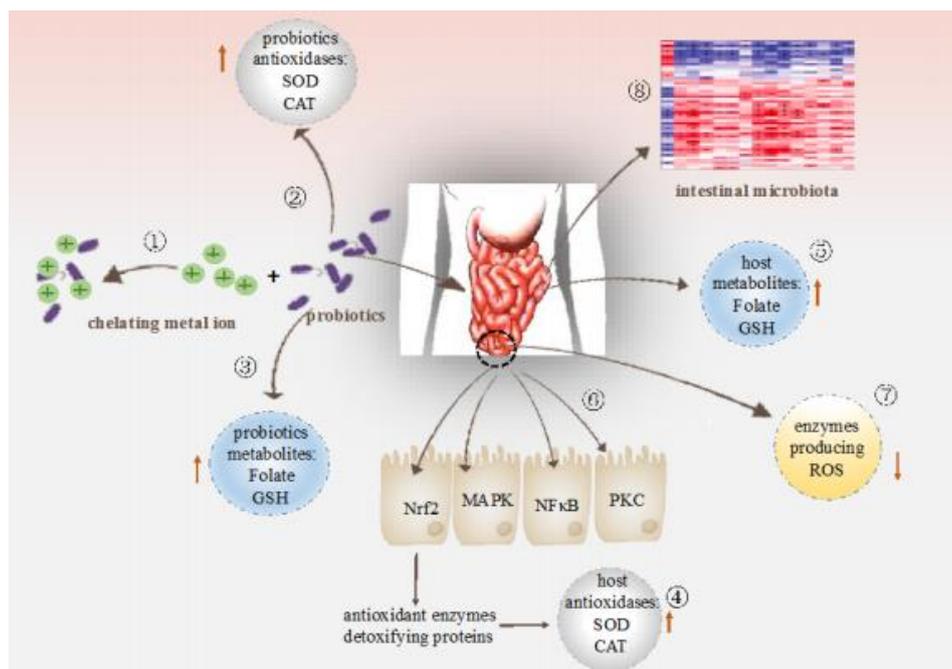


Figure 5: Modulation de l'antioxydation par les probiotiques. (Wang *et al.*, 2017)

(1) Probiotiques chélate un ion métallique. (2) Les probiotiques possèdent leurs propres antioxydases. (3) Les probiotiques produisent des métabolites antioxydants. (4) Les probiotiques régulent à la hausse les activités antioxydases de l'hôte. (5) Les probiotiques augmentent les niveaux de métabolites antioxydants de l'hôte. (6) Les probiotiques régulent les voies de signalisation. (7) Les probiotiques régulent à la baisse les activités des enzymes produisant des ROS. (8) Les probiotiques régulent le microbiote intestinal.

II.3.4.1. Capacité de chélation des ions métalliques

Des chélateurs, tels que l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), l'acide bathophénantrolinisolulfonique (BPS), la pénicillamine et la desferrioxamine, auraient capturé des ions métalliques et empêcher les ions métalliques de catalyser l'oxydation.

La capacité de chélation des ions métalliques de 19 souches LAB a été mesurée par Lin et Yen en 1999. Les résultats ont montré que *Streptococcus thermophilus* 821 présentait la meilleure capacité de chélation à la fois pour Fe_2^+ et Cu_2^+ . D'autres souches ont également montré une capacité de chélation pour Fe_2^+ ou Cu_2^+ . De plus, une autre souche LAB, *Lactobacillus casei* KCTC 3260, s'est avérée posséder une capacité antioxydante élevée en chélatant Fe_2^+ ou Cu_2^+ , bien qu'aucune activité SOD détectable n'ait été observée. De même, l'extrait intracellulaire de la souche *Lactobacillus helveticus* CD6 a également montré une chélation ionique Fe_2^+ plus élevée. (Wang *et al.*, 2017)

II.3.4.2. Système impliquant les enzymes antioxydantes

L'étude de Kullisaar et al en 2002 a démontré que les souches *Lactobacillus fermentum* E-3 et E-18 ont pu exprimer Mn-SOD pour résister au stress oxydatif. Bien que l'activité antioxydante de la SOD soit bien connue, son application thérapeutique est limitée, principalement en raison de sa courte demi-vie circulatoire, ce qui restreint sa biodisponibilité. Afin de résoudre ce problème, des efforts ont été faits pour trouver des véhicules adaptés à la SOD. Les bactéries probiotiques capables de délivrer localement la SOD ouvrent une nouvelle approche aux maladies intestinales caractérisées par la production de ROS. Récemment, une étude explorant l'impact des souches de *Lactobacillus casei* BL23 modifiées produisant de la SOD sur des souris atteintes de la maladie de Crohn a démontré que les souris recevant des souches modifiées avaient une récupération plus rapide de la perte de poids initiale, une augmentation des activités enzymatiques dans l'intestin et une moindre ampleur de l'inflammation intestinale que les souris témoins. (LeBlanc *et al.*, 2011)

Les probiotiques peuvent également stimuler le système antioxydant de l'hôte et élever efficacement les activités des antioxydases. Des études chez le porc ont montré que la supplémentation alimentaire en *Lactobacillus fermentum* pouvait augmenter la SOD et la GPx sériques et améliorer la CAT hépatique, la SOD musculaire et la Cu et Zn-SOD par rapport au groupe témoin. (Wang *et al.*, 2017)

II.3.4.3. Métabolites antioxydantes

Les probiotiques peuvent produire divers métabolites ayant une activité antioxydante, tels que le glutathion (GSH), le butyrate et le folate. Le folate est une vitamine qui accepte les unités à un carbone des molécules du donneur et est impliquée dans de nombreuses voies métaboliques. L'efficacité de la réplication, de la réparation et de la méthylation de l'ADN est affectée par la disponibilité des folates. (Pompei *et al.*, 2007)

Ahire et al ont rapporté que l'extrait intracellulaire acellulaire de folate produisant du probiotique *Lactobacillus helveticus* CD6, a démontré les mêmes potentiels antioxydants que la cellule intacte. (Ahire *et al.*, 2013)

Kullisaar et al ont découvert que les deux souches antioxydantes de *Lactobacillus fermentum*, E-3 et E-18, contenaient des niveaux remarquables de GSH. De plus, pour la première fois,

leur groupe de recherche a découvert qu'un système GSH entier existait dans *Lactobacillus fermentum* ME-3. (Kullisaar *et al.*, 2010)

II.3.5. Les influences antioxydantes des probiotiques en régulant la composition du microbiote

Lorsque le microbiote intestinal est anormal, les bactéries nocives prolifèrent de manière excessive, induisant l'endotoxine dans le sang et provoquant un stress oxydatif important. La génération de ROS épithéliale induite par contact microbien est un phénomène extrêmement conservé à travers les phylums. Ce mécanisme est un moyen général par lequel les communautés bactériennes peuvent affecter l'homéostasie redox chez l'hôte.

Les probiotiques sont des habitants réguliers du tractus gastro-intestinal des humains et des animaux, et ils peuvent réguler la composition du microbiote intestinal et inhiber la prolifération excessive de bactéries nocives, ce qui peut contribuer à réduire le stress oxydatif. (Wang *et al.*, 2017)

Chapitre III
Matériel et méthode

III.1. Matériel

III.1.1 L'objectif

Ce travail est une étude qui consiste à étudier l'effet antioxydant de 17 souches de bactéries lactiques isolées à partir des poissons.

III.1.2. Matériels utilisés

III.1.2.1. Origine des souches tests

Nous avons utilisé 17 souches des bactéries lactiques isolées à partir des poissons.

Les différentes souches utilisées sont représentée dans le tableau suivant (tableau02):

Tableau 02: Les différentes souches utilisées dans les tests étudiées

	S1
Souches sur milieu MRS	S2
	S3
	S6
	S7
	S1y
	S2y
	S3y
	S4y
	S1ryma
	S2ryma
Souches sur milieu M17	S3ryma
	S4ryma
	S1ch
	S2ch
	S4
	S5

III.1.2.3. Les milieux de culture

Les différents milieux de culture utilisés sont :

- Le milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe) avec un pH=6.8 + 0.1 ayant été utilisé pour la réactivation des Lactobacilles (De Man *et al.*, 1960).
- Milieu MRS agar : utilisé pour Favoriser la culture des bactéries lactiques du Genre *Lactobacillus spp* (De Man *et al.*, 1960)

- Milieu MRS bouillon acidifié avec un pH= 5.4: acidifié par l'addition de l'HCL
- Le milieu M17 avec un pH = 7.1 + 0.2 ayant été utilisé pour la réactivation des Lactocoques (Terzaghi et Sandine., 1975).
- Milieu M17 (agar) : utilisé pour Favoriser la culture des bactéries lactiques du Genre *Lactococcus spp* (Terzagui et Sandine., 1975)

III.2. Méthodes

III.2.1. Repiquage et revivification des souches

Les souches ont été réactivées et maintenues vivantes par un repiquage d'un inoculum de 1% dans le milieu MRS bouillon et le milieu M17 bouillon, incubées à 30°C A partir d'un tube les souches on prélève 1ml de ce bouillon et on l'ensemence dans un tube contenant du bouillon MRS et M17 et nous avons incubé à 30°C pendant 24 à 48 heures. Pour les souches conservées en géloses inclinées, Trois colonies sont ensemencées dans 5ml de bouillon MRS ou M17 puis on incube à 30°C pendant 18 à 24heures.

Après la croissance, un prélèvement a été réalisé à l'aide d'une anse de platine. Un ensemencement par stries sur boîte de Pétri contenant de la gélose MRS ou M17 à été effectué. Cette dernière est incubée à 30°C pendant 24 à 48heures et sont ensuite conservées à 4°C.

Les souches qui n'ont montré aucune croissance, nous avons les ensemencé dans bouillon MRS et les incubé en anaérobioses en utilisant un jar et une bougie puis les incubées à 30°C pendant 24 à 48heures.

Ensemencement dans bouillon MRS acidifié avec un pH= 5.4, à été effectué pour les souches qui n'ont montré aucune croissance dans bouillon MRS avec un pH=6.8.

III.2.2. Vérification de l'identité des souches

L'orientation de l'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques, phénotypique et biochimiques (Lamouliatte *et al.*, 1992) :

Avant de procéder aux cultures, les souches bactériennes utilisées ont été sujettes à la coloration de Gram et le test de la catalase :

III.2.2.1. Caractérisation macroscopique

Une observation macroscopique a permis de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu

solide (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité, couleur).

III.2.2.2. Caractérisation microscopique

L'observation microscopique avec l'objectif à immersion (G x 100) a permis de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association (amas, chaînette, tétrade) (Joffin et Leyral, 1996).

III.2.2.3. Coloration de Gram

III.2.2.3.1. Préparer un frottis

- Nettoyer une lame à l'alcool.
- Déposer une goutte d'H₂O sur la lame.
- Prélever une colonie à l'aide d'une anse de platine stérile.
- Frotter la colonie dans la goutte d'eau.
- Laisser sécher à l'air.
- Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

III.2.2.3.2. La coloration

- Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane (cristal violet) sur le frottis fixé et laisser agir 1 minute.
- Jeter l'excès de colorant.
- Déposer quelques gouttes de lugol sur le frottis et Laisser agir 1 minute.
- Jeter la solution de Lugol.
- Déposer quelques gouttes de l'alcool pendant 10 secondes.
- Rincer à l'H₂O
- Contre-colorer en déposant la solution de safranine pendant 1 minute.
- Rincer à l'H₂O
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope grossissement (G x 100) avec une goutte d'huile à immersion.

III.2.2.4. Test de la catalase

La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée, sa présence est mise en évidence en déposant, à l'aide d'une pipette Pasteur, quelques gouttes d'eau oxygénée à 10% sur une colonie isolée (Guiraud *et al.*, 2003). La décomposition de l'eau oxygénée se traduit par un dégagement de bulles de gaz selon la réaction suivante:



III.2.3. 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).

Effectuer une série de dilutions dans le PBS stérile jusqu'à 10^{-3} selon la technique des dilutions décimales.

III.2.4. Détermination de l'activité antioxydante

Ce test est 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 tubes au bain marie à 50°C pendant 20 minutes.
- Ajouter l'acide trichloroacétique à 10% après refroidissement des tubes.
- Centrifuger à 1399 pendant 5 mn.
- Mélanger 1ml de chaque surnageant avec 1ml d'eau distillée et 0.2 ml trichlorure de fer à 0.1%.
- Lire l'absorbance à 700 nm après 10 minutes et utiliser le PBS comme blanc.

Le pouvoir réducteur a été calculé par la formule suivante :

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

- A_s : L'absorbance de l'échantillon.
- A_b : l'absorbance du blanc.

III.2.5. Capacité de Piégeage des radicaux libres par 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH)

2.5.1. 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) Les antioxydants sont capables de réduire le radical DPPH libre, il est généralement utilisé comme réactif pour évaluer l'activité d'élimination des radicaux libres des antioxydants (Mishra *et al.*, 2015).

Il est avec une absorbance maximale à 517 nm dans l'éthanol. Lorsque le DPPH rencontre une substance donneuse de protons comme un antioxydant, le radical est piégé et l'absorbance est réduite (Yang *et al.*, 2008).

La réduction du radical libre DPPH° (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (MOLYNEUX, 2004). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2.2 Diphényl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (MAATAOUI *et al.*, 2006)

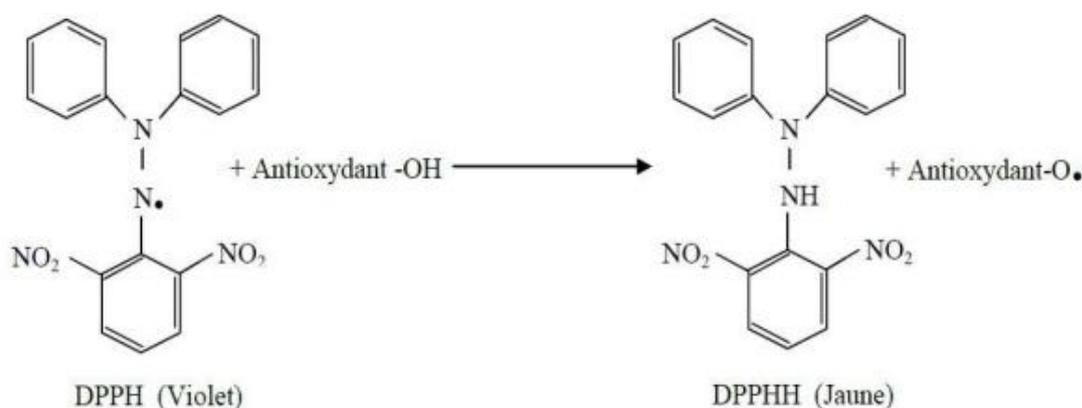


Figure06 : Réaction de test DPPH (2.2 Diphényl 1 picryl hydrazyl) (Congo, 2012).

III.2.5.2. Mode opératoire

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

- 1ml de solution DPPH (0.2mmol/l) préparée dans de l'éthanol a été ajoutée aux 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 control le même mélange a été préparé sans souches

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

- Aj : le control

III.2.6. Anti peroxydation lipidique

III.2.6.1. Principe

Le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbutirique (TBARS) est une méthode de référence caractérisée par sa simplicité et sa sensibilité, permet la mise en évidence d'un éventuel stress oxydatif, elle est bien établie pour le dépistage de la peroxydation lipidique qui est un indicateur du stress oxydatif dans les cellules et les tissus. (Armstrong et browne., 1994)

III.2.6.2. 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 des tubes stériles, mélanger 0.5ml de chaque souche bactérienne 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 des tubes contenant 2ml de l'acide thiobarbiturique (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 (As) 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 :

- Taux d'inhibition du peroxyde lipidique (%) = $(A0 - As) / A0 \times 100$

Résultats et discussion

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

Zhang et al. (2017) ont étudié l'activité antioxydante de *L. curvatus* SR6 et *L. paracasei* SR10-1, les résultats affichés sur le tableau 3 montrent que les deux souches ont des activités antioxydantes très élevées mais différentes.

L'activité de piégeage du DPPH a été examinée selon la méthode de Hsu et al. (2008)

L'activité de piégeage du DPPH de *L. curvatus* SR6 ($59,67\% \pm 6,68\%$) était significativement plus élevée que celle de *L. paracasei* SR10-1 ($49,48\% \pm 3,20\%$) Le DPPH est un radical libre synthétique stable, et l'activité de piégeage de la DPPH est couramment utilisée comme méthode efficace pour évaluer l'activité antioxydante.

Tableau 3 : Capacité antioxydante de *L. curvatus* SR6 et *L. paracasei* SR10-1

Souches LAB	DPPH• (%)
<i>L. curvatus</i> SR6	59.67 ± 6.68
<i>L. paracasei</i> SR10-1	49.48 ± 3.20

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Arasu et al. (2015) qui ont indiqué les capacités antioxydantes des isolats de LAB, y compris *L. brevis* P68 isolé à partir de cornichons qui a montré une activité de piégeage des radicaux la plus élevée (48,63%) à 4 mL de cellules (10^9 CFU mL⁻¹).

Dans cette étude, *L. curvatus* SR6 et *L. paracasei* SR10-1 ont été confirmées comme ayant une plus grande capacité antioxydante que ces souches.

D'une autre part, Abubakr et al. (2012) ont étudié l'activité antioxydante du lait écrémé fermenté par des bactéries lactiques (LAB), l'activité de piégeage des radicaux DPPH a été évaluée en utilisant la méthode de Son et Lewis (2002).

Le lait fermenté avec Gr1 et Gr2 a montré des valeurs de DPPH de 50,8% et 50,7%, respectivement et supérieures à *L. plantarum* ATCC8014. Les valeurs de DPPH du BHT, de l'acide ascorbique naturel et du Trolox® étaient respectivement de 97,7%, 98,5% et 96,7%.

L'activité du DPPH était significativement affectée par l'espèce de LAB utilisée et le temps de fermentation, les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4: Activité de piégeage (%) du lactosérum du lait fermenté avec des isolats LAB à différents temps de fermentation.

Échantillon	Fermentation time (h)		
	24	48	72
BHT	97.7 ± 0.2	98.7 ± 0.2	98.5 ± 0.2
acide Ascorbique	99.0 ± 0.5	99 ± 0.5	99 ± 0.5
Trolox	99.0 ± 0.1	99 ± 0.1	99 ± 0.1
Control milkb	10 ± 0.7	10 ± 0.4	10 ± 0.2
ATCC 8014	35.8 ± 2.4	40.5 ± 1.7	41.6 ± 1.8
Gr1	38.6 ± 5.8	35.2 ± 5.7	50.8 ± 4.5
Gr2	48.9 ± 7.5	31.4 ± 4.6	50.7 ± 16.3
Gr3	21.7 ± 3.1	22.5 ± 1.1	29.7 ± 5.4
Gr4	14.7 ± 1.8	24.8 ± 3.9	31.6 ± 1.7
Bn2	28 ± 3.3	36.9 ± 8.2	42.7 ± 10.7
Bn3	29.3 ± 7.7	41.6 ± 1.8	45.4 ± 2.5
Wg2	29 ± 2.3	38.6 ± 1.5	37.5 ± 7.4

Cette découverte a indiqué que le lait écrémé fermenté avec les différentes souches d'isolats LAB avec une bonne activité protéolytique exerçait une activité antioxydante plus élevée que le lait écrémé témoin.

Les activités de DPPH mesurées variaient avec la souche et l'activité de piégeage des radicaux libres allant de 14,7 à 50,8% v / v pendant 24 à 72 h de fermentation. Le lait fermenté avec *L. plantarum* 1 (Gr1 et Gr2) a montré des valeurs de DPPH de 50,8 et 50,7%, respectivement supérieures à *L. plantarum* ATCC8014 et celles rapportées par Osuntoki et Korie (2010) à partir de lait écrémé fermenté avec *L. plantarum* 1 a donné un DPPH plus élevé que le lait écrémé fermenté avec *L. mesenteroides*, après 72 h de fermentation.

Ces résultats sont en accord avec l'étude de riane et al. (2019) qui ont étudiée des propriétés probiotiques et efficacité antioxydante de *lactobacillus plantarum* 15 isolé du lait.

L'expérience a été réalisée par la méthode DPPH comme décrit par Mandal et al. (2013).

Toutes les souches bactériennes testées étaient capables de piéger les radicaux DPPH, les résultats résumés dans la figure 7 ont indiqué que le niveau d'activité de piégeage des radicaux libres variait avec les différentes souches, parmi les 7 souches testées, l'effet piégeur

des radicaux DPPH a montré un niveau important avec *L. plantarum* 15. Elle est la meilleure souche testée car elle a montré l'activité la plus élevée avec un pourcentage d'environ 82%.

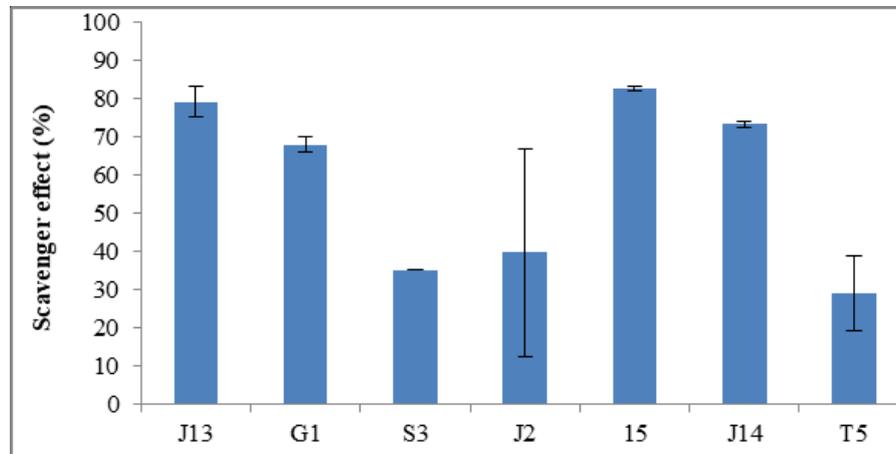


Figure 7 : Effet de piégeage de DPPH par des bactéries probiotiques. J13: *Lb. viridescens*, G1: *Lb. plantarum*, S3: *Lb. delbrueckii ssp lactis*, J2: *Lb. plantarum*, 15: *Lb. plantarum*, J14: *Lb. helveticus*, T5: *Lactobacillus sp.*

Cette étude a montré que *L. plantarum* 15, souche isolée du lait, résistait à l'acidité et aux sels biliaires et présentait une large activité antimicrobienne contre certaines bactéries testées.

Dans une autre étude de l'Activité antioxydante des bactéries lactiques dans le yaourt, réalisé par Zhang et al. (2011) L'activité de piégeage des radicaux DPPH a été mesurée par la méthode (Shimada *et al.*, 1992)

Les cellules intactes de *L. casei subsp. casei* SY13 et *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LJJ ont montré des valeurs de Piégeage de DPPH de 27,50% et 23,99%, respectivement. Les résultats ont également montré que les deux souches présentaient une activité antioxydante plus élevée pour piéger le radical DPPH que *L. rhamnosus* LGG, les résultats sont présentés dans la figure 8.

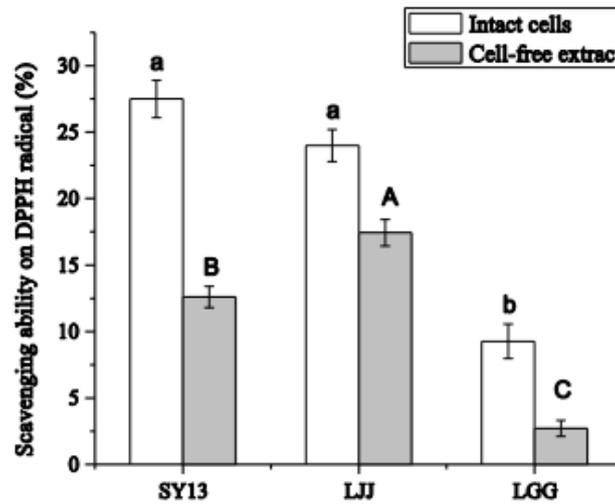


Figure 8 : Capacité de récupération de SY13 et LJJ sur le radical DPPH

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Lin et Chang (2000) qui ont découvert que *Bifidobacterium longum* et *Lactobacillus acidophilus* avaient une capacité de piéger les radicaux libres DPPH 43,2% à 52,1% respectivement, les résultats affichés sur le tableau 5 montrent que capacité de piégeage de DPPH par *B. longum* est plus élevés que *L. acidophilus*.

Tableau5 : Effet de Piégeage de *B. longum* ATCC 15708 et *L. acidophilus* ATCC 4356 sur les radicaux libres de DPPH

Souche	Piégeage de DPPH%
<i>B. longum</i> ATCC 15708	
Cellules intactes	52.1
Extrait intracellulaire	41.6
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	
Cellules intactes	43.2
Extrait intracellulaire	20.8

IV.2. Anti peroxydation lipidique

Les résultats obtenus par Zhang et al. (2017) qui ont réalisé le test de peroxydation lipidique sur les souches *L. paracasei* SR10-1 et *L. curvatus* SR6 sont affichés sur le tableau 6.

La peroxydation anti-lipidique (ALPO) de *L. paracasei* SR10-1 ($63,89\% \pm 0,93\%$) était significativement plus élevée que celles de *L. curvatus* SR6 ($55,00\% \pm 5,19\%$), le pouvoir réducteur et l'ALPO sont également des facteurs importants pour la capacité antioxydante.

Tableau 6 : Capacité antioxydante de *L. curvatus* SR6 et *L. paracasei* SR10-1

Souches LAB	ALPO (%)
<i>L. curvatus</i> SR6	55.00 ± 5.19
<i>L. paracasei</i> SR10-1	63.89 ± 0.93

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Zhang et al. (2011), les acides gras insaturés, tels que l'acide linoléique, sont généralement utilisés pour l'analyse de la capacité antioxydante, les résultats affichés dans le tableau 7 montrent que les cellules intactes et l'extrait acellulaire de SY13 et LJJ exercent l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique.

Les cellules intactes de 10^9 cellules de SY13 et 10^8 cellules de LJJ ont démontré une inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique de 62,95 et 59,63%, et l'extrait acellulaire de 44,4 et 66,16%, Par conséquent, les deux souches ont présenté une excellente inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique.

Tableau 7: l'antiperoxydation d'acide linoléique par *L. casei subsp. casei* SY13 et *L. delbrueckii subsp*

Souche	Cellules viables (cfu / ml)	Forme de cellule	Inhibition (%)
SY13	$2,54 \times 10^9$	Cellules intactes	62.95 ± 1.57
		Extrait intracellulaire	44.4 ± 1.38
LJJ	2.10×10^8	Cellules intactes	59.63 ± 1.42
		Extrait intracellulaire	66.16 ± 1.32

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Lin et al. (2000) qui ont démontré les effets de *B. longum* et *L. acidophilus* sur l'inhibition de la peroxydation des lipides plasmatiques, les résultats sont présentés dans le tableau 8.

Les deux souches intestinales étaient capables de protéger les lipides plasmatiques de l'oxydation à des degrés différents, les taux d'inhibition de la peroxydation des lipides plasmatiques allaient de 11 à 29% pour 10^9 cellules de *B. longum* et *L. acidophilus*. Les extraits intracellulaires ont démontré une inhibition plus élevée que les cellules intactes pour les deux souches.

Tableau 8 : Inhibition de la peroxydation des lipides plasmatiques par *B. longum* ATCC 15708 ET *L. acidophilus* ATCC 4356

Souche	Inhibition (%)
<i>B. longum</i> ATCC 15708	
Cellules intactes	16.2
Extrait intracellulaire	34.3
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	
Cellules intactes	11.3
Extrait intracellulaire	28.8

Des cellules intactes et des extraits intracellulaires cellules de *B. longum* et *L. acidophilus* ont démontré un effet antioxydant qui consiste à l'inhibition de la peroxydation lipidique, cela indique que *B. longum* et *L. acidophilus* ont un très bon effet antioxydant sur l'inhibition de la peroxydation lipidique.

Conclusion

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 antioxydants de certaines bactéries lactiques.

Les résultats indiquent que *L. curvatus* et *L. paracasei* ont d'excellentes activités de piégeage de DPPH et une inhibition de la peroxydation lipidique ainsi que *L. plantarum* et *L. mesenteroides* possèdent de bonnes propriétés antioxydantes.

Aussi une capacité antioxydante a été trouvée pour les cellules intactes et les extraits intracellulaires des bactéries intestinales *Bifidobacterium longum* et *Lactobacillus acidophilus* in vitro

La propriété antioxydante des bactéries lactiques serait utile dans l'industrie alimentaire. Ils pourraient avoir un effet bénéfique sur le consommateur en fournissant une source alimentaire efficace d'antioxydants ou en fournissant aux bactéries probiotiques le potentiel de produire des antioxydants au cours de leur croissance dans le tractus intestinal.

L'utilisation possible des probiotiques pour protéger les cellules et réduire les dommages possibles de ROS devrait être étudiée. Des études in vivo sont nécessaires pour confirmer la capacité de ces souches.

Référence bibliographique

Ammor M., Mayo B. (2007). *Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production.* *Meat Science*.76:138-146.

Abubakr, M., Hassan, Z., Imdakim, M., N. R. S. A, S. (2012). *Antioxidant activity of lactic acid bacteria (LAB) fermented skim milk as determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and ferrous chelating activity (FCA).* *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 6(34), pp. 6358-6364.

Abubakr, M A ., Hassan, Z., Imdakim M M et Sharifah. (2012). *Antioxidant activity of lactic acid bacteria (LAB) fermented skim milk as determined by 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl (DPPH) and ferrous chelating activity (FCA).* *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(34), pp. 6358-6364.

Ahire, J.J.; Mokashe, N.U.; Patil, H.J.; Chaudhari, B.L. *Antioxidative potential of folate producing probiotic Lactobacillus helveticus CD6.* *J. Food Sci. Technol.* 2013, 50, 26–34.

Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., & Khan, F. H. (2019). *Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players.* *Journal of Food Biochemistry.*

Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Rejiniemon, T. S., Lee, K. D., Huxley, V. A. J., Kim, D. H., ... Choi, K. C. (2014). *Identification and Characterization of Lactobacillus brevis P68 with Antifungal, Antioxidant and Probiotic Functional Properties.* *Indian Journal of Microbiology*, 55(1), 19–28.

Armstrong D, browne R. *the analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory.* *Free radic diag med*, 1994;366:43-58

Axelsson L. (2004). *Classification and physiology.* In: *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66

Baraibar, M. A., Ladouce, R., & Friguet, B. (2013). *Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging.* *Journal of Proteomics*, 92, 63–70

Caplice E., Fitzgerald G. (1999). *Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. Int. J. Microbiol*, 50 (1-2): 131-149

Charchoghlyan H, Park HD. (2013). *Characteristics of a novel bacterial polysaccharide consisted of glucose and mannose as major components. Food Hydrocolloids* 30(2):512–8.

CONGO, M. (2012). *Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de Salvadora Persica L. Salvadoraceae. Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso : 42p.*

DEFRAIGNE J.O., PINCEMAIL J. (2008). *Stress oxydant et antioxydants. Rev Med Liège.* 63: 10-1

Dellagio 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.*

Dolié E. (2018). *Rôle de la flore intestinale dans l'immunité : usage actuel des probiotiques et futures indications. Thèse de doctorat. universite toulouse iii paul sabatier faculte des sciences pharmaceutiques.france*

Dortu C. (2008). *Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse de doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique. Faculté des sciences universitaire agronomiques. Gembloux*

Dunne C, L.O'Mahony, et al. (2001). *In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. America journal of clinical nutrition* 73(suppl):386S–92S.

Franz C.M.A.P., Stiles M.E., Schleifer K.H., Holzapfel W.H. 2003. *Enterococci in foods - a conundrum for food safety. International Journal of Food Microbiology Enterococci in Foods. Functional and Safety Aspects. vol. 88,105-122.*

Gagnon M. (2007). *Rôle des probiotiques lors d'infection entériques d'origine bactérienne et virale : analyse in vitro et études in vivo chez des modèles murins*. Département des sciences des aliments et de nutrition Québec. Université laval. Ph.D :155

Gaisawat, M B., Iskandar, M M., MacPherson, C W., Tompkins, T A et Kubow, S .(2019). *Probiotic Supplementation is Associated with Increased Antioxidant Capacity and Copper Chelation in C. difficile-Infected Fecal Water*. *Nutrients*.

Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). *Lipid peroxidation in cell death*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 419–425

Gomez A.M.P and Malcata F.X.(1999). *Bifidobacterium sp and Lactobacillus acidophilus: biological, technological, biochemical and therapeutical properties relevant for use as probiotic*. *Trends in Food Science&Technology* 10: 139-157

Guarner F., Khan A ., Garisch J., Eliakim R.,Gangl A.,Thomson A., Krabshuis J., Lemair T., Gonvers J. (2011). *Probiotiques et Prébiotiques*. *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines*

Hassan A.N., 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., Tuan N.N., Deschamps A., 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.

Idoui, T., Sifour, M. (2016). *Novel isolates of lactobacilli from crop of Algerian poultry as potential probiotic for food industry*. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 5, 82-90.

Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2017). *First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid*. *Alexandria Journal of Medicine*.

Ikeda M., Weinert Jr E.,Chang k .,McGinn J., Miller S Kelihoomalulu C., et DuPont M. (2013). *Natural Farming: Lactic Acid Bacteria*. *College of Tropical Agriculture and Human Resources. University of Hawai'i*.

Khalid N.M., Marth E.H. 1990. *Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. Rev. Dairy Sci.* 73: 158-167.

Kullisaar, T.; Songisepp, E.; Aunapuu, M.; Kilk, K.; Arend, A.; Mikelsaar, M.; Rehema, A.; Zilmer, M. *Complete glutathione system in probiotic Lactobacillus fermentum ME-3. Prikl. Biokhimiia Mikrobiol.* 2010, 46, 481–486.

Laboui H.,ElmoualdiL., Elyachioui M et Ouhssine M. (2005). *Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes.Bull.Soc. Pharm.Bordeaux.*144 :237-250.

LeBlanc, J.G.; Del Carmen, S.; Miyoshi, A.; Azevedo, V.; Sesma, F.; Langella, P.; Bermudez-Humaran, L.; Watterlot, L.; Perdigon, G. *Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice. J. Biotechnol.* 2011, 151, 287–293.

Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B. (1991). *La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. 2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris.* 3: 240P.

Lin, M.-Y., & Chang, F.-J. (2000). *Digestive Diseases and Sciences*, 45(8), 1617–1622.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.

MAATAOUI, B S., HMYENE, A., HILALI S. (2006). *Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (Opuntia ficus indica). Lebanese Science Journal.* (1):3-8.42

Migdal, C., & Serres, M. (2011). *Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. Médecine/sciences*, 27(4), 405-412.

Mishra,V.,Shah,C.,Mokashe, N.,Chavan,R., Yadav, H.,& Prajapati,J.(2015).*Probiotics as potential antioxidants: A systematic review. Journal of agricultural and food chemistry*, 63, 3615–3626.

Nielsen D.S., Jacobsen T., JespersenL., KochA.G., Arneborg N.(2008). Occurrence and growth of yeasts in processed meat products -Implications for potential spoilage. *Meat Science*, vol. 80, p. 919-926.

Patterson. (2008). *Probiotiques : bien faits au-delà des fonctions nutritionnelles de base .AAFC.*1-4.

Pompei, A.; Cordisco, L.; Amaretti, A.; Zaroni, S.; Matteuzzi, D.; Rossi, M. (2007) *Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 179–185.

Riane, K., Sifour, M., Ouled-Haddar, H., Idoui, T., Bounar, S., Boussebt, S. (2019). *probiotic properties and antioxidant efficiency of lactobacillus plantarum 15 isolated from milk. J Microbiol Biotech Food Sci*, 9 (3) 516-520

Salminen S., von Wright A et Ouwehand A. (2004). *Lactic acid bacteria : microbiological and functional aspects. Third Edition*, vol.629 :15-52

Shuwen Zhang. (2011). *Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. African Journal of Microbiology Research*, 5(29). doi:10.5897/ajmr11.997

stiles M.E. et Holzapfel W.H., 1997. *lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29

Temmerman R., Pot B., Huys G et Swings J. (2003). *Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. Int. J. Food Microbiol.* 81 :1-10.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K et Swings J. (1996). *Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Ghent, Belgium* p.407-438

Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., ... Li, W. (2017). *Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. Nutrients*, 9(5), 521.

Yao a.A., Egounlety M, Kouame L.P et Thonart P. (2009). *Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l’Afrique de l’Ouest : leur utilisation actuelle. Analyse médicale vétérinaire* :153, 54-65

Zhang, Y., Hu, P., Lou, L., Zhan, J., Fan, M., Li, D., & Liao, Q. (2017). *Antioxidant Activities of Lactic Acid Bacteria for Quality Improvement of Fermented Sausage. Journal of Food Science*, 82(12), 2960–2967.

Annexe

ANNEXES

Milieu d'isolement

Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharp, 1960)

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone 10,00 g
- Extrait de viande..... 10,00 g
- Extrait de levure5,00 g
- Glucose 20,00 g
- Phosphat dipotassique2,00 g
- Acétate de sodium5,00 g
- Citrate d'ammonium2,00 g
- Sulfate de magnésium0,20 g
- Sulfate de manganèse0,05 g
- Agar bacteriologique15,00g
- Eau distillée1000 ml

pH = 6,8 ± 0,1 Autoclave 120° pendant 20 min

MRS liquide tout les ingrédients du **MRS solide** mais sans Agar

Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975) Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone2,50 g
- Peptone pepsique de viande2,50 g
- Peptone papaïnique de soja5,00 g
- Extrait de levure..... 2,50 g
- Extrait de viande5,00 g
- Lactose5,00 g
- Glycérophosphate de sodium19,00 g
- Sulfate de magnésium0,25 g
- Acide ascorbique0,50 g
- Agar bacteriologique15,00g
- Eau distillée1000 ml

pH = 7,1 \pm 0,2 pour MRS normal et 5,4 pour MRS acidifié Autoclave 120°
pendant 20 min

M17 liquide tout les ingrédients du **M17 solide** mais sans Agar