

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE 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 والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

GUERNOUG NADJET

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE

THÈME

**CAPACITE D'ASSIMILATION DU CHOLESTÉROL CHEZ
LES BACTÉRIES LACTIQUES.**

Déposé le 13juillet 2021

DEVANT LE JURY

Président : BAHRI Fouad

Pr

U.Mostaganem

Promotrice : KOUADRI BOUDJELTHIA Nacima

MAA

U.Mostaganem

Examinatrice : ZIAR Hasnia

MCA

U.Mostaganem

Année Universitaire :2020/2021

REMERCIEMENTS

Avant tout, Je tiens à remercier Allah tout puissant d m'avoir donné la santé et la volonté pour accomplir ce travail.

En premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma promotrice:

Mme. KOUADRI BOUDJELTHIA Nacima,

Maitre Assistante "A" à l'université de Mostaganem

d'avoir bien accepté de m'encadrer et pour la qualité de son encadrement, je la remercie infiniment de m'avoir été d'une grande efficacité, par sa disponibilité à tout moment, ses conseils constructifs, ses orientations et ses encouragements durant toute la période de réalisation de ce travail.

Merci de votre patience Madame.

Je tiens également à exprimer mes remerciements aux membres du jury :

Mr. BAHRI Fouad Professeur à l'université de Mostaganem;

Mme. ZIAR Hasnia Maitre de conférence "A" à l'université de Mostaganem

Merci chers enseignants d'avoir accepté d'examiner et évaluer ce modeste travail.

DÉDICACE

A mes très chers **parents**,

Maman, Papa...

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être, je vous remercie pour toute la patience, le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance jusqu'à ce jour et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toute la vie.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous n'acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut Puissant, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A Mon cher frère «**Hamza** » et mes sœurs « **Amel** », «**Fella**» , «**Amina**» et «**Khadija**»
Qui n'ont pas cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité dans la vie.

À ma meilleure amie **Ines** ;

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

À ma chère copine **wissam**,

Je te souhaite plein de bonheur et beaucoup d'autres succès dans ta vie.

À tous les membres de ma famille (grands et petits)

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحليل مقال "Ability of lactic acid bacteria isolated from mink to remove cholesterol: in vitro and in vivo studies by (Hanlu et al,2013)" ، تم تقييم خاصية خفض الكوليسترول لبكتيريا حمض اللاكتيك (LAC) المعزولة من المنك. تم عرض سلالتين ، *Lactobacillus plantarum* MDL1118 و *Enterococcus faecium* MDF1104 صفار بيض الدجاج الطبيعي والحليب منزوع الدسم. انخفض الكوليسترول في صفار البيض الدجاج بنسبة 58.15% و 38% بواسطة *E. faecium* و *L. plantarum* على التوالي. عند استخدام البكتيريا معًا ، تمت إزالة 48.95% ($p < 0.01$) من الكوليسترول من الحليب منزوع الدسم. بقيت الفئران التجريبية بصحة جيدة عند تغذيتها بجرعات مختلفة من LAB ، وكان تركيز الكوليسترول الكلي في الدم أقل (0.90 مليمول / لتر) ($p < 0.01$) عند استخدام مزيج من *E. faecium* و *L. plantarum* بناءً على نتائج المتحصل عليها تم اقتراح أنه *L. plantarum* MDL1118 أو *E. faecium* MDF1104 أو مزيج من السلالتين يمكن استخدامهما بروبيوتيكًا لخفض الكوليسترول.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك ، الكوليسترول ، الاستيعاب ، فرط كوليسترول الدم

Abstract:

This study aims to analyze the article "Ability of lactic acid bacteria isolated from mink to remove cholesterol: in vitro and in vivo studies by (Hanlu et al,2013)". The cholesterol-lowering property of lactic acid bacteria (LAB) isolated from mink is evaluated. Two strains, *Enterococcus faecium* MDF1104 and *Lactobacillus plantarum* MDL1118, were shown to remove cholesterol from broths of natural hen egg yolk and skimmed milk. The cholesterol in hen egg yolk was reduced by 58.15% and 38% by *L. plantarum* and *E. faecium*, respectively. When the bacteria were used in combination, 48.95% ($p < 0.01$) of cholesterol was removed from skimmed milk. Experimental mice remained healthy when fed different doses of the LAB, and the total serum cholesterol concentration was the lowest (0.90mmol/L) ($p < 0.01$) when a combination of *L. plantarum* and *E. faecium* was used. Based this results is suggested that *L. plantarum* MDL1118, *E. faecium* MDF1104, or a combination of the 2 strains could be considered as promising cholesterol-lowering probiotics.

Key words: lactic acid bacteria, cholesterol, assimilation, hypercholesterolemia.

RESUME

Dans ce travail l'article "Ability of lactic acid bacteria isolated from mink to remove cholesterol: in vitro and in vivo studies de (Hanlu et al ,2013)" est analysé. L'activité d'assimilation du cholestérol des deux souches, *Enterococcus faecium* MDF1104 et *Lactobacillus plantarum* MDL1118 est réalisées in vitro en utilisant différentes sources de cholestérol. L'effet hypocholestérolémiant des souches est confirmé par des essais in vivo chez les souris BALB/c et les visons. Les souches ont éliminé le cholestérol du jaune d'œuf (58,15 % de réduction) et du lait écrémé (38 % de réduction). Lorsque les bactéries sont utilisées en combinaison, 48,95 % ($p < 0,01$) de cholestérol a été retiré du lait écrémé. Le cholestérol synthétique (2% (m/v) de taurocholate de sodium) est réduit ($p < 0,01$) par *Enterococcus faecium* (93,13 %) et par *L. plantarum* (82,22 %). Les souris expérimentales sont restées en bonne santé lorsqu'elles ont été nourries avec différentes doses de LAB, et la concentration totale de cholestérol sérique était la plus faible (0,90 mmol/ L) ($p < 0,01$) lorsqu'une combinaison de *L. plantarum* et *E. faecium* a été utilisée. Le taux de cholestérol sérique totale rapporté par l'essai chez les visons mâles et femelles a considérablement diminué ($p = 0,0004$) et les taux sériques de triglycérides chez les visons mâles ($p = 0,45$) étaient inférieurs à ceux des visons femelles ($p = 0,32$) à la même dose des souches lactiques. Ces résultats affirment que *L. plantarum* MDL1118, *E. faecium* Le MDF1104, ou une combinaison des 2 souches, pourrait être considéré comme un probiotique hypocholestérolémiant prometteur.

Mots clés: bactéries lactiques, cholestérol, assimilation, hypercholesterolemia

Liste des abréviations

- Abs : acide biliaire secondaire
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- Co₂ : dioxydes de carbone
- EMP : Embden – Meyerhof – Parnas
- HDL : High density protein
- LAC : Acide lactique
- LDL : Low density protein
- LF : lait fermenté
- Lp : Lactobacillus paracasei
- OH : hydroxyde
- pH : potentiel hydrogène
- Pp : pentose phosphate
- SCORE : Systematic Coronary Risk Estimation
- TG : triglycérides

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 1	Arbre phylogénétique des bactéries lactiques	04
Figure 2	Formule développée du cholestérol	08
Figure 3	La croissance dans un bouillon sans sel biliaire	19
Figure 4	Élimination du cholestérol du lait écrémé par <i>Lactobacillus plantarum</i> MDL1118 et <i>Enterococcus faecium</i> MDF1104. PLUS représente la combinaison de MDL1118 et MDF1104.	20
Figure 5	Élimination du cholestérol par <i>Lactobacillus plantarum</i> MDL1118 et <i>Enterococcus faecium</i> MDF1104 dans un bouillon sans sel biliaire. PLUS fait référence à la combinaison de MDL1118 et MDF1104	21
Figure 6	Élimination du cholestérol par <i>Lactobacillus plantarum</i> MDL1118 et <i>Enterococcus faecium</i> MDF1104 dans un bouillon MRS additionné de 0,2% de thioglycolate de sodium. L'astérisque (*) indique une différence significative entre les 2 souches.	21
Figure 7	taux de cholestérol sérique chez la souris. con, pas d'ajout de bactéries; <i>lactobacillus plantarum</i> MDL1118, 1×10^9 ufc/ml ; <i>enterococcus faecium</i> MDF1104, 1×10^9 ufc/ml ; plus, MDL1118+MDF1104, 1×10^9 ufc/ml	23
Figure 8	Taux de cholestérol sérique total des visons femelles après addition de différentes quantités de <i>Lactobacillus plantarum</i> MDL1118 plus <i>Enterococcus faecium</i> MDF1104. CON, pas de supplément ; FAIBLE, 6×10^7 UFC/g ; MOYEN, 6×10^9 UFC/g ; HAUT, 6×10^{10} UFC/g.	25
Figure 9	Taux de cholestérol sérique total des visons mâles après addition de différentes quantités de <i>Lactobacillus plantarum</i> MDL1118 plus <i>Enterococcus faecium</i> MDF1104.	25
Figure 10	Taux de triglycérides des visons femelles après l'ajout de différentes quantités de <i>Lactobacillus plantarum</i> MDL1118 plus <i>Enterococcus faecium</i> MDF1104.	25
Figure 11	Taux de triglycérides du vison mâle après l'ajout de différentes quantités de <i>Lactobacillus plantarum</i> MDL1118 plus <i>Enterococcus faecium</i> MDF1104. CON, pas de supplément ; FAIBLE, 6×10^7 UFC/g ; MOYEN, 6×10^9 UFC/g ; HAUT, 6×10^{10} UFC/g	25

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 1	Les souches de bactéries lactiques utilisées dans les milieux des cultures	14

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Introduction	

Chapitre I: Rappels bibliographiques

I. Les Bactéries lactiques	02
I.1. Généralité	02
I.2. Classification des bactéries lactiques	02
I.2.1. Caractérisation phénotypique	03
I.2.2. Caractérisation moléculaire	03
I.2.3. Caractéristique des principaux genres de bactéries lactiques	03
I.2.3.1. Le genre <i>lactobacillus sp</i>	03
I.2.3.2. Le genre <i>streptococcus sp</i>	04
I.2.3.3. Le genre <i>leuconostoc sp</i>	05
I.2.3.4. Le genre <i>weissella</i>	05
I.2.3.5. Le genre <i>enterococcus sp</i>	05
I.2.3.6. Le genre <i>carnobacterium</i>	05
I. 2. Intérêt des bactéries lactiques	06
I.3. Domaine médicale (santé)	07
II. Les bactéries lactiques et hypercholestérolémie:	07
II.1. Le cholestérol sanguin	08
II.1.1. Les différentes formes de cholestérols	08
II.1.1.1. Le HDL-cholestérol ou "bon cholestérol"	08
II.1.1.2. Le LDL-cholestérol ou "mauvais cholestérol"	09
II.1.2. Métabolisme du cholestérol	09
II.1.3. Dégradation du Cholestérol	10
II.1.4. Rôle biologique du cholestérol	10
II.1.5. Pathologie provoqué par le cholestérol	11
II.2. Activité hypocholestérolémiante des bactéries lactiques	12

Chapitre II: Matériels et méthodes

I. Matériels:	14
I.1. Matériel biologique.....	14
I.2. Milieux de culture:	14
II. Méthodes:	14
II.1. Préparation des cultures bactériennes.....	14
II.2. Etudes in vivo	14
II.2.1.Élimination du cholestérol du jaune d'œuf.....	14
II.2.2.Élimination du cholestérol du lait écrémé.....	15
II.2.3. Élimination du cholestérol de synthèse en absence de sels biliaires.....	15
II.2.4. Élimination du cholestérol de synthèse en présence de sels biliaires.....	15
II.3. Etude in vivo.....	16
II.3.1. Expérimentation sur des souris BALB/c.....	16
II.3.1.1.Condition d'élevage et alimentation des souris.....	16
II.3.1.2. Protocole expérimentale.....	17
II.3.2. Expérimentation sur les visons.....	16
II.3.2.1. Condition d'élevage et alimentation.....	16
II.3.2.2. Protocole expérimentale.....	17
II.4. Etude statistique.....	17

Chapitre III: Résultats et Discussion

III.1. Résultats d'élimination du cholestérol de différentes sources in vitro.....	19
III.2. Effet in vivo des souches lactiques isolées du vison sur les taux de cholestérol sérique total chez la souris BALB/c.....	22
III.3. Effet in vivo des souches lactiques isolées du vison sur les taux sériques totaux de cholestérol et de triglycérides chez le vison	23
Conclusion	27
Références bibliographiques	29

Annexe

Introduction :

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, gram-positives, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont le plus souvent immobiles, a sporulées, catalase négative, oxydase négative, anaérobies facultatives, micro aérophiles, se trouvent dans différentes niches écologiques très riches en éléments nutritifs comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif, ce qui explique leurs exigences nutritionnelles notamment en acides aminés, acides gras, peptides, vitamines, sels minéraux et sucres fermentescibles (**Tailliez, 2001**).

L'intérêt des bactéries lactiques pour la santé des consommateurs est reconnu depuis longtemps et les effets bénéfiques potentiels cités sont nombreux et variés. Parmi ces effets, leur activité hypocholestérolémiant qui s'explique par trois principales observations faites selon la bibliographie. La première observation date de 1974, lorsque **Mann et Spoerry (1974)** démontrèrent que chez les tribus Masaï, qui pratiquent l'élevage du bétail, le taux bas de cholestérol dans le sang s'explique par la consommation journalière de lait fermenté par des souches sauvages de bactéries lactiques. La deuxième observation est celle de **Eyssen (1973)** qui a montré par des expériences menées sur des animaux « axéniques » que la microflore intestinale a un effet direct sur la teneur en cholestérol du sang. Et la troisième observation est de **Gilliland (1985)** qui a montré que certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité d'assimiler le cholestérol. Les probiotiques semblent également posséder une action anti-cholestérolémiant. En effet, certaines bactéries lactiques inhiberaient la conversion de l'acétate en cholestérol. L'ingestion de *Lb acidophilus* diminue le taux de cholestérol dans le sérum sanguin de la rate (**Aly et Alfred, 2011**).

Le but de ce travail consiste en une analyse d'un article de recherche qui met en évidence cette capacité à éliminer le cholestérol selon deux études in vitro et in vivo chez des bactéries lactiques isolées du vison afin contribuer à créer des starter de bactéries à potentiel probiotique ayant un effet bénéfique concernant les différentes maladies d'hypercholestérolémie.

A cet effet le manuscrit est structuré en Trois Chapitres; le premier chapitre est consacré à des rappels bibliographiques sur les bactéries lactiques, le cholestérol et l'effet anti-cholestérolémie. Ensuite, le deuxième chapitre concerne l'analyse de l'article en y détaillant la partie Matériels et méthodes et dans le dernier chapitre, les résultats des auteurs de l'article y sont exploités et discutés.

Chapitre I: Rappels bibliographiques

I.1. Les bactéries lactiques:

I.1.1 Généralité:

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, gram-positives, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont le plus souvent immobiles, a sporulées, catalase négative, oxydase négative, anaérobies facultatives, micro aérophiles (Tailliez, 2001).

Elles sont ubiquistes, se trouvent dans différentes niches écologiques très riches en éléments nutritifs comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif, ce qui explique leurs exigences nutritionnelles notamment en acides aminés, acides gras, peptides, vitamines, sels minéraux et sucres fermentescibles (Tailliez, 2001).

Ces bactéries, généralement non pathogènes, peuvent être sous forme de coques ou de bacilles, et sont parmi les groupes les plus importants de microorganismes utilisés dans la fermentation alimentaire, ce qui contribue au goût et à la textures des produits fermentés et à l'inhibition de la détérioration des aliments causée par d'autres microorganismes (Nordqvist, 2004 ; David *et al.*,2013).

Selon leurs voies métaboliques empruntées pour la production de métabolites, elles sont classées en deux grandes catégories homofermentaires ou homolactiques, produisant exclusivement de l'acide lactique et hétérofermentaires, pour celles qui produisent en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique (hétérolactiques facultatives) ou encore de l'éthanol et du CO₂ (hétérolactiques strict). (Frey et Hubert, 1993).

Les bactéries lactiques se réfèrent à un grand groupe de bactéries représentées par divers genres appartenant au phylum *Firmicutes*: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. et au phylum *Actinobacteria*: *Aerococcus*, *Microbacterium* et *Propionibacterium* ou alors faisant partie des *Bifidobacterium* (Figure 1).(Makarova *et al.*, 2006).

I.1.2. Classification des bactéries lactiques :

Plusieurs caractéristiques physiologiques, biochimiques et moléculaires contribuent à l'identification des bactéries lactiques et permettent de les classer selon les différents genres bactériens du groupe des bactéries lactiques:

I.1.2.1. Caractérisation phénotypique:

Il s'agit essentiellement des caractéristiques physiologiques et morphologiques ce qui permet de classer les bactéries lactiques selon la forme cellulaire, selon la température de croissance, le mode de fermentation du glucose et de la forme de l'acide lactique produit (**de Roissart et Luquet, 1994b ; Orla-Jensen, 1919**).

I.1.2.2. Caractérisation moléculaire : Les méthodes d'extraction d'ADN: d'hybridation ADN-ADN (PCR et amorce ADN) et le séquençage du gène de l'ARNr 16S, ont permis classification plus rigoureuse des bactéries lactiques en regroupant certaines espèces et/ou en séparant d'autres avec la création même de nouveaux genres comme la séparation du genre *Streptococcus* en : *Streptococcus sensu stricto*, *Lactococcus* et *Enterococcus* (**Hardie et Whiley, 1997**), le regroupement des espèces proches de *Lactobacillus* pour la création du genre *Carnobacterium* (**Hammes et Hertel, 2006**), ou celui des bactéries isolées du vin pour en créer le genre *Oenococcus* (précédemment classées dans le genre *Leuconostoc* (**Dicks et al., 1995**) et l'apparition des genres *Tetragenococcus* et *Aerococcus* à partir du genre *Pediococcus*; formant ainsi des lignées phylogénétiques distinctes(**Figure 1**).

I.1.2.3. Caractéristiques des principaux genres de bactéries lactiques:

1.2.3.1. Le genre Lactobacillus sp :

Les lactobacilles sont des cellules allongées, régulières en forme de bâtonnets ou coccobacilles isolés ou en chainettes de taille variable, apyrogène immobiles ou mobiles grâce à des flagelles périt riches anaérobies facultatifs. Leurs exigences nutritionnelles complexes et leurs températures de croissance sont très variables d'une espèce à l'autre (2 à 53°C) mais elles sont toutes acidophiles avec un Ph optimal de croissance de 5,5 à 6,2. Leur GC% sont de 36 à 47 (**de Roissart et Luquet, 1994b ; Salvetti et al., 2012**).

Selon le type fermentaire et le résultat des produits de fermentation, les *lactobacilles* sont subdivisés en trois sous-groupes (**Salvetti et al., 2012**) :

➤ **Groupe A “*Thermobacterium*”** : représenté par les *lactobacilles* homofermentaires obligatoires **thermophiles**, ce groupe ne fermente que les hexoses en acide lactique via la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP ou glycolyse). Il est principalement connu par les espèces : *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. Acidophilus*; souvent utilisées en industrie laitière.

➤ **Groupe B “*Streptobacterium*”**: comprenant les *lactobacilles* hétérofermentaires facultatifs et mésophiles. Ce groupe connu par les espèces: *Lb.plantarum*, *Lb.casei*,

Lb.rhamnosus, *Lb.graminis*...etc, est caractérisé par la capacité à fermenter les hexoses en acide lactique via la voie EMP ; et à dégrader les pentoses et le gluconate par la voie du pentose phosphate (PP). Ceci par l'intervention de l'enzyme phosphoketolase, produisant de l'acide acétique, de l'éthanol et de l'acide formique.

➤ **Groupe C “ Betabacterium ”** : englobant les *lactobacilles* hétérofermentaires stricts ; les bactéries de ce groupe transforment, exclusivement, les hexoses et les pentoses en acide lactique, éthanol (ou acide acétique) et CO₂ à travers la voie du phosphogluconate. Ce groupe comprend des espèces à faible capacité acidifiante (0.5% d'acide lactique) tel que : *Lb.brevis*,*Lb.buchneri*, *Lb.fermentum*, *Lb.kefir*...etc.

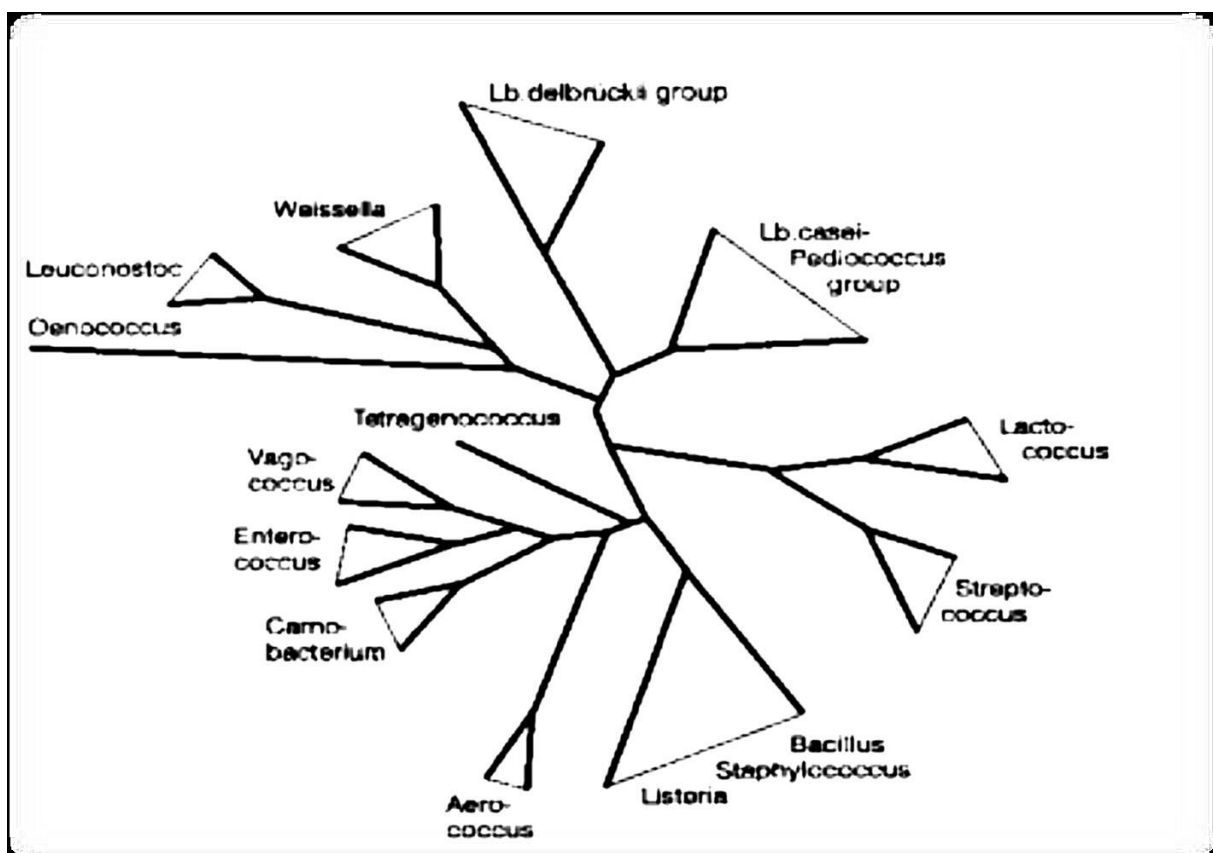


Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Axelsson et Ahrné, 2000).

1.2.3.2. Le genre *Streptococcus sp* :

Les streptocoques sont des cocci à Gram positif non mobiles, appartenant à la famille des Streptococcaceae. Actuellement, 66 espèces et 12 sous-espèces sont reconnues comme membres du genre *Streptococcus* ;*Streptococcus thermophilus* est perçue comme une bactérie alimentaire qui a récemment émergée et qui a évolué à partir d'un ancêtre commensal par la perte et le gain de fonctions (Delorme *et al.*, 2010).

Streptococcus thermophilus est une bactérie lactique d'importance économique majeure provenant des produits laitiers. Cette espèce est généralement reconnue comme sûre pour les produits alimentaires et le statut de présomption d'innocuité reconnue en Europe lui a été accordé. Elle est historiquement largement utilisée pour la fabrication de yaourt et de fromage en association avec d'autres bactéries lactiques tels que *Lactobacillus delbrueckii sub sp. Bulgaricus* et *Lactococcus lactis* (Hols et al., 2005).

1.2.3.3. Le genre Leuconostoc sp:

Ce sont des cellules de formes coccoïde ou ovoïde, disposées par paires ou en chaînes. Elles se distinguent des autres coques par leur métabolisme hétérofermentaire, elles ne produisent pas d'ammoniaque à partir de l'arginine et ferment à partir du glucose de l'acide lactique de forme D (-). Ce genre de bactéries lactiques peut croître à une température variant de 1 à 30°C, avec une température optimale de croissance de 25 à 30°C. Il est représenté par l'espèce modèle *Leuconostoc mesenteroides* (Björkroth et Holzappel, 2006).

1.2.3.4. Le genre Weissella :

Découvertes en 1993 par Collins et ses collègues, après une analyse phylogénétique de l'ARNr 16S d'un genre de *Leuconostoca* typique. Les cellules de ce genre sont en forme de bâtonnet courts ou coccoïdes, non mobiles, séparées par paires ou en courtes chaînes. Possédant un métabolisme hétéro fermentaire, et produisent généralement à partir du glucose de l'acide lactique de forme (DL). Les *Weissella* poussent à 15°C mais certaines d'entre elles supportent une température de 45°C (Björkroth et Holzappel, 2006 ; Fusco et al., 2015).

1.2.3.5. Le genre Enterococcus sp:

Ce genre découle des *streptococcus* après l'apparition de la caractérisation moléculaire et il est reconnu par l'espèce type *Enterococcus faecalis* responsable de certaines infections humaines. Il se caractérise par un métabolisme homofermentaire, et se distingue par une aptitude de croissance dans un intervalle de température variant de 10°C à 45°C, dans un milieu salé à 6,5% de NaCl, à un pH de 9,6 ou dans un milieu contenant 40% de bile. (Hardie et Whiley, 1997).

1.2.3.6. Le genre Carnobacterium :

Considéré pendant longtemps comme des *lactobacilles* atypiques, isolés généralement des produits d'origine animale (bœuf, volaille, poisson...), réfrigérés ou emballés sous vide. Ce genre de bactéries est étroitement lié au lactobacille, et peut partager les mêmes niches

écologiques. Il se présente sous forme de petits bâtonnets isolés, par paires ou en courtes chaînes, asporogènes, mobiles ou non ; ces bactéries peuvent se développer à 10°C mais pas à 45°C, ni en présence de 8% de Na Cl, comme elles peuvent supporter un pH allant de 6.8 à 9. Ce genre est désigné par l'espèce type *Carnobacterium divergens* et cinq autres: *Cb. mobile*, *Cb. funditum*, *Cb. alterfunditum*, *Cb. gallinarum*, *Cb. piscicola* (Hammes et Hertel, 2006).

I.2. Intérêt des Bactéries Lactiques:

L'importance des bactéries lactiques connaît une croissance industrielle par leur mécanisme fermentaire, leur permettant de transformer des sucres simples comme le lactose ou le glucose en acide lactique ou autres acides et alcool, ce qui confère aux aliments d'importantes propriétés organoleptiques; c'est le cas notamment du genre *Lactobacillus sp* qui est largement utilisé dans les fermentations laitières, et en fromagerie pour apporter un meilleur goût et une meilleure texture au produits; ces propriétés organoleptiques permettent d'abonner la nourriture et d'améliorer l'appétence et la texture ; et augmentent la popularité des aliments fermentés par rapport aux non fermentés. L'addition d'acide citrique dans certains produits alimentaires, afin d'abaisser le pH, n'a pas réussi à rivaliser les résultats obtenus par les acides produits par les aliments fermentés, principalement dans l'influence de la texture et les qualités induites par les bactéries lactiques. Cependant, les mécanismes spécifiques par lesquels est produite la saveur sont encore peu connus (Chelule *et al.*, 2010).

En effet, la fermentation traditionnelle est un processus alimentaire dans lequel les bactéries utilisent les sources de carbone comme substrat pour se propager. Ce type de fermentation est connu depuis bien longtemps, notamment dans les pays de l'Afrique où beaucoup d'aliments traditionnels ne se conservaient que de cette manière. Dans le nord-africain comme dans le sud, une importante consommation de produits laitiers fermentés (jben, lben, smen, raib, zabadi, sethemi, Kule, naoto, Susac, Amasi...), de végétaux et céréales (olives de table, citron, figues, concombre, hrissa, amahewu, ancwancwa, togwa ...), ou encore de viande et de poisson (gueddid, khlii, lanhouin...) est enregistrée (Chelule *et al.*, 2010 ; Benkerroum, 2013).

Casalta et Bona (2009) démontrent l'importance des ferments lactiques spécifiques pour l'amélioration des qualités sensorielles et sanitaires des fromages traditionnels. Cependant, les mécanismes spécifiques par lesquels est produite la saveur sont encore peu connus (Chelule *et al.*, 2010).

Aussi, certains aliments aux valeurs nutritives pauvres, comme les céréales; acquièrent grâce aux enzymes activées par les bactéries lactiques après fermentation (protéase, amylase,

lypase...), l'augmentation de leurs valeurs nutritives, en hydrolysant les polysaccharides, les protéines, et les lipides qu'ils contiennent. D'un autre côté, les ferments lactiques peuvent augmenter le niveau de vitamines dans les aliments, ou réduire celui de l'acide phytique, et des tannins engendrant la biodisponibilité des minéraux tels que le fer, des protéines et des sucres simples (**Chelule et al, 2010**).

Par ailleurs, les bactéries lactiques jouent un rôle important comme supplément dans la bioconversion des produits laitiers fermentés, des viandes et des légumes. Elles sont aussi impliquées dans la bio préservation de nombreux produits alimentaires fermentés réservées tant à l'alimentation humaine qu'à l'alimentation animale (vins, café, cacao, levains, ensilage...) (**Matamoros, 2008**). En effet, plusieurs recherches ont mis en évidence l'efficacité antimicrobienne des bactéries lactiques, notamment dans le rôle de la bio préservation des aliments contre les bactéries indésirables et pathogènes (*Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Clostridium botulinum., E-coli*) et ceci soit en inoculant directement les aliments avec ces bactéries ou en leur additionnant l'agent anti bactérien purifié (**Schillinger et al., 1996 ; Ponce et al., 2008**).

3. Domaine médicale (santé):

Plusieurs effet santé ont été rapportés par la littérature sur les bactéries lactiques au vue de leurs potentialités probiotique , surtout qu'ils colonisent l'intestin de la plupart des animaux et de l'homme, et exercent un effet sur leurs systèmes immunitaires, souvent, en tant que probiotique pour améliorer certaines fonctions biologiques de leurs hôtes (**Perdigon et al., 2001**) et interviennent dans le contrôle des infections intestinales comme la prévention des diarrhées (**Herich et Levkut, 2002**).La propriété d'antagonisme bactérien vis-à-vis de plusieurs microbes pathogènes et la production de différents agents antimicrobiens permet l'utilisation des bactéries lactiques comme alternative à l'usage des antibiotiques (**Nicolas et al., 2007**). Certaines études ont aussi démontré l'implication de bactéries lactiques dans l'amélioration de la digestion du lactose (**Robin et Rouchy, 2001**), la régulation du taux de cholestérol dans le sang ainsi que le contrôle de quelques types de cancer en agissant comme anti tumoral (**Gilliland, 1990 ; Perdigon et al., 2001 ; Chelule et al., 2010**).

II. Les bactéries lactiques ethypercholestérolémie:

Certains probiotiques peuvent prévenir de l'hypercholestérolémie en favorisant l'utilisation du cholestérol par le foie, notamment par leur activité BSH (**Klaver et van der Meer, 1993**). Il existe de nombreuses études reliant la réduction du cholestérol et la capacité des probiotiques

à déconjuguer les sels biliaires(Klaver et van der Meer, 1993) et leur capacité à précipiter le cholestérol in vitro pourrait avoir la même conséquence physiologique (Mathara et al.,2008).

En effet, chez des rats hypercholestérolémiques, l'ingestion de *Lb. acidophilus* ATCC 43121 permet de réduire le cholestérol du sérum (Park et al., 2007). D'autres auteurs ont montré que l'ingestion de *Lb. plantarum* KCTC3928 chez la souris a des effets hypocholestérolémiants en modulant les gènes et enzymes clés impliqués dans le métabolisme hépatique du cholestérol (Jeun et al.,2009). Le cholestérol restant peut être oxydé par les espèces réactives de l'oxygène et promouvoir ainsi la formation de thrombus. La consommation de lait fermenté par *Lb.fermentum* ME-3 possédant des propriétés antioxydantes est capable d'améliorer les marqueurs anti-artérogènes chez l'Homme sain (Kullisaar et al., 2003).

II.1. Le cholestérol sanguin:

Le cholestérol est une substance molle et cireuse de couleur laiteuse, fabriquée par l'organisme humain et animal. Il fait partie des graisses ou lipides (de la famille des stérols) des organismes vivants et est indispensable à leur bon fonctionnement, que l'on retrouve normalement dans le sang dont il joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques (Genest, 2000). C'est une molécule biologique .Il porte un groupe hydroxyle OH sur le carbone-3 (figure2) (Hames et al., 2000; Borg et Reeber, 2004).

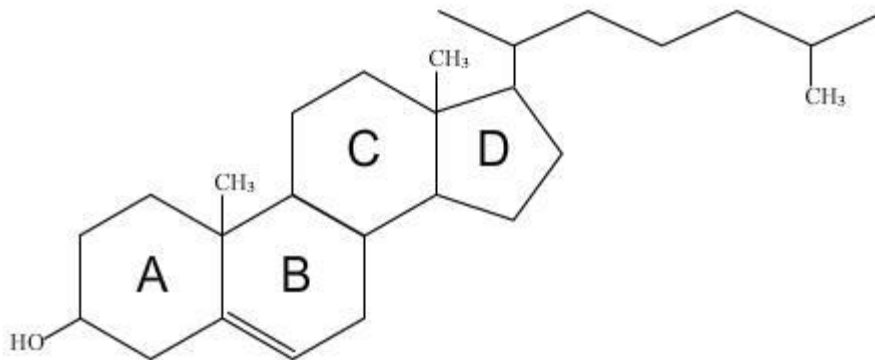


Figure 2 : Formule développée du cholestérol (Camus, 2018)

II.1.1. Les différentes formes de cholestérols :

II.1.1.1. Le HDL-cholestérol ou "bon cholestérol" :

Il s'agit d'une lipoprotéine de haute densité (HDL ou "high density protein"), qui a pour fonction de transporter l'excédent de cholestérol dans le sang vers le foie et qui participe ainsi à l'élimination de cette graisse par l'organisme. Cette variable représente le "bon" cholestérol, celui pour lequel il est préférable d'obtenir des valeurs fortes. Plus le taux sanguin de HDL-

cholestérol est élevé, plus le risque d'athérosclérose (lorsqu'il y a des plaques d'athéromes) est faible. On considère habituellement que sa concentration doit dépasser au minimum 35 mg/dl ou 0,9 mmol/l. Les valeurs observées sont, en règle générale, plus importantes chez les femmes. À partir du HDL-cholestérol, on peut également mesurer le rapport Cholestérol total/HDL-cholestérol, dont la valeur standard est de 4,0. Au-dessus de ce chiffre, on estime que le risque artériel est important. (**Tutin., 2018**).

II.1.1.2. Le LDL-cholestérol ou "mauvais cholestérol»:

Il s'agit d'une lipoprotéine de basse densité (LDL ou "low density protein"), qui transporte le cholestérol provenant des aliments vers les tissus. Il représente le "mauvais" cholestérol et il est bon d'avoir de faibles taux de LDL-cholestérol. La probabilité d'athérosclérose est, en effet, d'autant plus forte que la valeur du LDL-cholestérol est élevée. Le taux du LDL-cholestérol est, en général, calculé à partir des triglycérides (TG), une autre variable lipidique, du HDL-cholestérol et du cholestérol total selon la formule de Friedewald*. On peut aussi mesurer le taux de LDL-cholestérol par technique d'ultracentrifugation, mais ce dosage n'est pas effectué en routine. Le taux de LDL-cholestérol à atteindre dépend du risque cardiovasculaire de chaque patient. Le niveau de risque est calculé pour chaque patient, en fonction de facteurs de risque cardiovasculaire connu, en se basant sur le *Systematic Coronary Risk Estimation* (SCORE) qui évalue ce risque à 10 ans. Le SCORE permet ainsi de définir : Un risque faible (SCORE < 1%) ; Un risque modéré ($1\% \leq \text{SCORE} < 5\%$) ; Un risque élevé ($5\% \leq \text{SCORE} < 10\%$) ; Un risque très élevé (SCORE $\geq 10\%$). (**Tutin., 2018**).

II.1.2. Métabolisme du cholestérol:

Le cholestérol présent dans l'organisme provient de deux sources distinctes le Métabolisme endogène qui est principalement hépatique et intestinale mais également dans les surrénales, les testicules, la peau et le système nerveux et le Métabolisme exogène est fourni par l'alimentation en graisses animales. Les aliments les plus riches en cholestérol sont : les abats (foie, cervelle), crustacés et mollusques, jaune d'œuf, beurre. L'apport endogène couvre environ 75%, alors que l'apport exogène constitue environ 25% et lorsque la consommation de cholestérol diminue, le foie compense en le produisant en plus grande quantité (**Charrel et al., 1991**). En effet, en plus de l'apport exogène en cholestérol, toutes les cellules sont capables de synthétiser leur propre cholestérol même si le lieu principal de synthèse est le foie (50% de la synthèse) (**Repa et Mangelsdorf, 2000**). Il est synthétisé dans le réticulum endoplasmique des cellules, où se trouvent la plupart des enzymes responsables de sa

biosynthèse (Luu *et al.*, 2015).

II.1.3. Dégradation du Cholestérol:

Le Cholestérol est majoritairement converti en Acides Biliaires dans le Foie, sécrété dans la bile puis excrété dans le Tube Digestif. Les Acides Biliaires peuvent y être métabolisés par des bactéries et sont soit éliminés dans les fèces, soit récupérés dans le cycle entéro-hépatique et recyclés. (Raymond, 2012).

Dans le Tube Digestif, les Acides Biliaires ont pour rôles principaux : l'émulsification des grosses gouttelettes lipidiques en gouttelettes plus petites et la formation de micelles avec les lipides alimentaires (AG, TAG, Vitamines, Phospholipides) pour faciliter leur absorption. (Raymond, 2012). Ces acides biliaires, appelés AB primaires (ABI) sont de deux types chez l'Homme : l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique. Ils sont ensuite conjugués avec de la glycine ou de la taurine formant ainsi les acides glyco- et tauro-choliques et les acides glyco- et tauro-chénodésoxycholiques. Sécrétés dans la bile grâce au système vésiculaire des hépatocytes, leurs propriétés amphiphiles leur permettent de s'associer avec des phospholipides et du cholestérol pour former des micelles. Cet ensemble appelé sels biliaires est ensuite sécrété dans le duodénum et avant d'atteindre l'anus, ils passent par le côlon où ils rencontrent les bactéries du microbiote intestinal qui vont modifier les ABs : déconjugaison, oxydation, épimérisation, désulfatation, etc. Les molécules ainsi générées sont alors appelées acides biliaires secondaires (ABII) (Li et Chiang, 2009). Cependant, la spécificité des acides biliaires et leur mécanisme d'action restent un vaste sujet d'étude à approfondir pour mieux les comprendre. (Vítek et Haluzík, 2016).

II.1.4. Rôle biologique du cholestérol:

Le cholestérol est indispensable à nos cellules puisqu'il possède deux rôles essentiels. Comme élément structural; il entre dans la composition des membranes cellulaires pour contribuer à leur fluidité et leur bon fonctionnement mais aussi dans la couche externe des lipoprotéines plasmatiques (qui permettent le transport des lipides dans le plasma) et comme précurseur de composés biologiques : c'est un précurseur de la vitamine D3 appelée cholécalciférol. Sa synthèse se fait au niveau de la peau grâce à l'action des UV donc le cholestérol contribue au maintien de l'intégrité du squelette. C'est également un précurseur indispensable pour la biosynthèse des hormones stéroïdes (œstradiol et testostérone) ainsi que des corticostéroïdes (cortisone, cortisol et aldostérone) et des composants de la bile que sont les acides biliaires.

Ceux-ci sont indispensables à l'absorption intestinale des vitamines liposolubles. (**Lehmann-Che, 2012**).

II.1.5. Pathologie provoqué par le cholestérol:

Des complications liées à l'hypercholestérolémie peuvent apparaître. L'hypercholestérolémie est soit dite primaire d'origine endogène génétique, soit secondaire, liée à des facteurs socio-économique et au mode de vie tel que les habitudes alimentaires (un régime riche en cholestérol et acides gras trans), le manque d'exercice physique, la sédentarité, le tabagisme, l'alcool et l'obésité, sont tous à l'origine de l'excès du mauvais cholestérol. L'insuffisance rénale chronique, le syndrome néphrotique, l'hypothyroïdie et la prise de certains médicaments tel que la progestérone, peuvent entraîner une hypercholestérolémie secondaire. En effet, L'hypercholestérolémie se définit par un excès de cholestérol dans le sang, dont la teneur est supérieure ou égal à 2,5 g.L⁻¹, ce n'est pas une maladie en soi mais un trouble métabolique dont le caractère pathogène est lié à la répartition du cholestérol dans les lipoprotéines, qui peuvent se révéler athérogène, car un excès de LDL et de VLDL par rapport aux HDL est considéré comme un facteur de risque de maladies cardiovasculaire(**Holewijn et al.,2010**) L'hypercholestérolémie provoque un dysfonctionnement cardiovasculaire, en raison de son action directe sur la fluidité membranaire, les activités enzymatiques et les transporteurs cationiques dans les cellules endothéliales, les cellules du muscle lisse vasculaire et les cardiomyocytes, ainsi que l'apparition de la plaque d'athérome, en raison des produits oxydatifs du cholestérol (**Stapleton et al.,2010**).

Par ailleurs, un taux élevé de cholestérol augmente le risque de maladies cardiovasculaires, d'AVC et de dépôt de corps gras dans les artères ou sur les tissus. Ce dépôt graisseux forme une plaque sur les vaisseaux sanguins, et peut également boucher les artères, dont l'artère coronarienne qui irrigue le cœur. Ce phénomène est appelé athérosclérose, il s'agit d'un durcissement des artères qui accroît le risque de douleurs thoraciques et de crises cardiaques. En général, lorsque l'on se rend compte de ce trouble, les artères ont déjà perdu 75% à 90% de leur fonctionnalité. C'est pour cela qu'il est important de vérifier régulièrement ses taux de cholestérol total et de triglycérides sanguins afin de prendre le plus rapidement possible les mesures nécessaires (**Pierre,2016**).

En fin, leCholestérol apporté par l'alimentaire peut provoquer des troubles lipidiques. En effet, Des études réalisées chez le rat ont montré qu'un régime enrichi en cholestérol alimentaire (1%), entraîne au niveau plasmatique une augmentation du CT et du C-LDL et une diminution des teneurs en TG et en C-HDL, alors qu'au niveau hépatique, ces deux

derniers paramètres sont augmentés (Wang *et al.*, 2010).

II.2. Activité hypocholestérolémiante des bactéries lactiques:

Plusieurs recherches, ont démontré les différents mécanismes régulant le taux du cholestérol par les bactéries lactiques. En effet, (Tahri *et al.*, 1995) ont étudié l'action réductrice du cholestérol chez les bifidobactéries et ont observé qu'il existe une forte affinité de liaison entre la paroi cellulaire des souches bifides et la molécule de cholestérol. Cette liaison a été considérée comme étant une assimilation qui dépendrait, selon les auteurs, de la croissance des souches. Par ailleurs, la présence de sels biliaires dans le milieu de culture est indispensable pour l'expression de toute activité significative réductrice de cholestérol de la part des bifidobactéries. De ce fait, ces auteurs ont suggéré que le mécanisme bactérien réducteur de cholestérol est l'union des deux effets: assimilation bactérienne directe de cholestérol et/ou co-précipitation avec les sels biliaires déconjugués. (Ziar, 2013).

Aussi l'utilisation des prébiotiques en association des probiotiques lactiques permet, d'améliorer l'action hypocholestérolémiante des bactéries lactiques. Effectivement La fermentation des fructo-oligo saccharides par *Lactobacillus acidophilus* a provoqué une suppression de la synthèse des triglycérides et du cholestérol-VLDL au niveau du foie, aboutissant à une diminution marquée de la triglycéridémie, et dans une moindre mesure, de la cholestérolémie (Bengmark, 2000 ; Ziar, 2013). Chez le rat, l'administration du raffinose et de *Lactobacillus acidophilus* réduit significativement la triglycéridémie et résulte en une augmentation de la synthèse hépatique du cholestérol-HDL et du butyrate, l'acide gras à courte chaîne qui représente la source privilégiée (absorbé par le côlon) d'énergie nécessaire au renouvellement des cellules coliques (Tortuero *et al.*, 1997). Le butyrate stimule également la prolifération des cellules épithéliales et favorise l'absorption du Ca²⁺, Mg²⁺ et Fe²⁺ (Delzenne et Roberfroid, 1994; Ziar, 2013).

Partie II:

Matériels et méthodes

Partie II: Matériels et méthodes

Dans cette partie nous avons analysé l'article ; Ability of lactic acid bacteria isolated from mink to remove cholesterol: in vitro and in vivo studies de (Hanlu *et al.*, 2013), qui consiste à déterminer la Capacité des bactéries lactiques isolées du vison à éliminer le cholestérol selon deux études in vitro et in vivo.

I. Matériels:

I.1. Matériel biologique:

Les souches de bactéries lactiques utilisées sont représentées dans le tableau 01:

Souches	Origine	Références
<i>Lactobacillus plantarum</i> MDL1118	isolées à partir de l'intestin de vison	(Garrity <i>et al.</i> 2004).
<i>Enterococcus faecium</i> MDF1104	isolées à partir de l'intestin de vison	(Garrity <i>et al.</i> 2004).

I.2. Milieux de culture:

Les cultures lactiques ont été maintenues et repiquées dans le bouillon de (MRS) (Demann *et al.*, 1960) (bouillon MRS (Oxoid) et bouillon MRS supplémenté avec 0,2% (m / v) de thioglycolate de sodium (Sigma))

II. Méthodes:

II.1. Préparation des cultures bactériennes:

Les souches sont transférées trois fois dans le bouillon MRS et incubées à 37 ° C pendant 24 h. Des grains de culture de chaque souche de 10⁹ufc / mL sont par la suite conservés à 4 ° C et sont repiqués deux fois avant l'utilisation expérimentale. La croissance bactérienne de chaque souche est suivie trois fois toutes les 02h pendant 36 h, en mesurant la densité optique des bouillons de culture à 650 nm par spectrophotométrie visible (Specord 50, Jena, Analytikjena, Allemagne). Un bouillon stérile non inoculé a été utilisé comme témoin.

II.2. Etudes in vivo:

II.2.1.Élimination du cholestérol du jaune d'œuf:

Le protocole de (Hua *et al.*, 2007), est adapté pour la réalisation de ce test, brièvement, un bouillon MRS fraîchement préparé a été complété avec 4% de jaune d'œuf de poule frais du commerce comme source de cholestérol, est inoculé par 100 µL de culture de 18 h de *L plantarum* MDL1118 ou *E. faecium* MDF1104, puis incubés à 37 ° C pendant 24 h. Les

cellules sont retirées du bouillon par centrifugation à 5400 g pendant 15 minutes à 4 ° C aux intervalles de temps de 4, 8, 12, 16 et 24 h après inoculation afin de mesurer l'élimination du cholestérol du jaune d'œuf par une méthode colorimétrique modifiée, telle que décrite par (Rudel et Morris, 1973), qui permet de déterminer la quantité de cholestérol dans le surnageant. Le pourcentage de cholestérol éliminé a été estimé à l'aide de la formule suivante:

Pourcentage de cholestérol éliminé = [(quantité de cholestérol du contrôle - quantité de cholestérol du groupe inoculé) / (quantité de cholestérol du contrôle)] × 100

II.2.2.Élimination du cholestérol du lait écrémé:

Le bouillon de lait écrémé est préparé avec 12 % de lait écrémé comme source de cholestérol et 8 % de glucose. 5 ml de bouillon sont inoculés par 100µL de culture de 18 h de *L. plantarum* MDL1118, *E. faecium* MDF1104, et d'autre 5ml sont inoculés par une combinaison des 2 bactéries. Les bouillons sont incubés pendant 24 h à 37°C avant d'être centrifugé à 5400g pendant 15min à 4°C et La même méthode décrite ci-dessus a été utilisée pour mesurer l'élimination du cholestérol. (Rudel et Morris, 1973).

Le pourcentage de cholestérol éliminé a été estimé à l'aide de la formule suivante:

Pourcentage de cholestérol éliminé = [(quantité de cholestérol du contrôle - quantité de cholestérol du groupe inoculé) / (quantité de cholestérol du contrôle)] × 100

II.2.3.Élimination du cholestérol de synthèse en absence de sels biliaires:

Une solution de cholestérol stérilisée par filtration (10 mg/mL dans de l'éthanol) a est ajoutée au bouillon MRS à une concentration finale de 70 g/ mL (Kimoto *et al.*,2002). Le bouillon est ensuiteensemencé avec 1% de culture de 18 h de *L. plantarum* (MDL1118), *E. faecium* (MDF1104), ou une combinaison des 2 bactéries puis incubées pendant 24 h à 37°C. Après incubation, les cellules sont éliminées par centrifugation comme décrit ci-dessus (Rudel et Morris, 1973) et le pourcentage de cholestérol est déterminé dans les deux bouillons.

II.2.4. Élimination du cholestérol de synthèse en présence de sels biliaires:

Un bouillon MRS fraîchement préparé additionné de 0,2% de thioglycolate de sodium comme source de sel biliaire. 1 % de chacune des 2 LAB, à servi à l'inoculation du bouillon MRS (0,2% sels biliaires) additionné de cholestérol soluble dans l'eau (sébacate de polyoxyéthanylcholestéryle) (Sigma, USA) stérilisé par filtration avant d'être ajouté au

bouillon à une concentration finale de 70 g/mL (Kimoto *et al.*, 2002), puis incubé à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, les cellules sont centrifugées et la concentration de cholestérol restant dans le bouillon est déterminée en utilisant la méthode colorimétrique modifiée comme décrit ci-dessus (Rudel et Morris, 1973).

II.3. Etude in vivo:

II.3.1. Expérimentation sur des Souris BALB/c:

II.3.1.1. Condition d'élevage et alimentation des souris:

Au total, 60 souris mâles BALB/c âgées de 45 jours ($22,1 \pm 0,2$ g) ont été réparties au hasard en 4 groupes (15 par groupe). Les souris étaient logées dans des cages en plastique par groupes de 5 par cage, avec 3 cages répétées par groupe, et nourries avec un régime commercial normal (c'est-à-dire 21 % de protéines, 8 % de fibres, 10,5 % de minéraux et vitamines, 1,4 % de calcium, 0,7 % de phosphore, et 87 % de matière sèche) pendant 40 jours avec de l'eau ad libitum. Les groupes expérimentaux étaient les suivants:

- (1) Groupe témoin,
- (2) Régime de base supplémenté en MDL1118.
- (3) Régime de base supplémenté en MDF1104
- (4) Régime de base supplémenté en MDL1118 et MDF1104

II.3.1.2. Protocole expérimentale:

Des cultures d'une nuit de LAB sont fraîchement préparées chaque jour, centrifugées à 5400g pendant 15 min à 4 °C, puis le culot cellulaire est remis en suspension à environ 1×10^9 UFC/mL dans une solution saline normale. Chaque souris reçoit 0,3 mL de suspensions (environ 3×10^8 UFC) par gavage intragastrique pendant 35 jours. Le groupe témoin a reçu la même quantité de solution saline par gavage. A la fin de la phase expérimentale de 5 semaines, les souris sont mis à jeun 12 h avant le sacrifice sous anesthésie avec du pentobarbital sodique par injection intrapéritonéale.

1 mL de sang prélevé immédiatement dans des tubes stériles par ponction cardiaque et centrifugé à 5000g pendant 10 min à 4°C, ont servi pour mesurer les taux sériques de cholestérol total à l'aide d'un analyseur biochimique automatique (AMS-18, Medsoul, Chine)

II.3.2. Expérimentation sur les visons:

II.3.2.1. Condition d'élevage et alimentation:

Un total de 160 (moitié mâle et moitié femelle), visons de 30 jours (*Mustela vison*) ont été

répartis au hasard en 4 groupes (40 par groupe). Les groupes expérimentaux étaient les suivants:

(1) Groupe témoin (pas de supplément).

(2) Groupe dont l'aliment est supplémenté avec une faible dose de MDL1118 ou MDF1104 (c'est-à-dire 6×10^6 UFC/g).

(3) Groupe dont l'aliment est supplémenté avec une dose intermédiaire de MDL1118 ou MDF1104 (c'est-à-dire 6×10^9 UFC/g).

(4) Groupe dont l'aliment est supplémenté avec une dose élevée de MDL1118 et MDF1104 (c'est-à-dire 6×10^{10} UFC/g).

II.3.2.2. Protocole expérimentale:

Le complément alimentaire est donné au vison après avoir été correctement mélangé est composé de courbine jaune (65,00 %), foies de poulet (7,01 %), proventricule de poulet (9,00 %), additifs minéraux et vitaminiques (0,99 %), maïs extrudé (6,00 %) et de l'eau (12,00 %). Les cultures fraîches de LAB sont préparées chaque jour et récupérées après centrifugation à 3000g pendant 15 minutes, sous forme de culot bactérien, puis le surnageant a été jeté et la viabilité des souches est suivi par dénombrement des colonies obtenues en étalant 100 μ L de la culture bactérienne sur des plaques de gélose MRS, après incubation pendant 72 h à 37 °C.

Au bout de 30 jours de phase expérimentale, des échantillons de sang de vison, à jeun depuis 12 h, ont été prélevés via l'ongle de la patte arrière puis centrifugés à 5000g pendant 10 min à 4°C. Le sérum est collecté et congelé à -20 °C pour les analyses du taux de cholestérol sérique total et de triglycérides. (Hanlu *et al.*, 2013).

II.4. Etude statistique:

Toutes les données ont été analysées en utilisant SAS version 8.2 (SAS, Cary, North Caroline). Une analyse de variance à un facteur (ANOVA) est réalisée, et les différences entre les moyennes sont comparées à l'aide du test de Duncan. Les effets du traitement sont considérés comme significative à $p < 0,05$, tandis que des tendances sont observées à $p < 0,10$, sauf indication contraire.

Partie III:
Résultats et Discussion

Partie III: Résultats et Discussion

Dans cette partie les résultats obtenue par (Hanlu *et al.*, 2013), sont exploités, discutés et comparés à d'autres recherches selon la bibliographie

III.1. Résultats d'élimination du cholestérol de différentes sources *in vitro*:

En premier lieu, les pourcentages du cholestérol du jaune d'œuf éliminé sont estimés durant la croissance des deux LAB pendant 24 h et sont indiqués dans la **figure 03**.

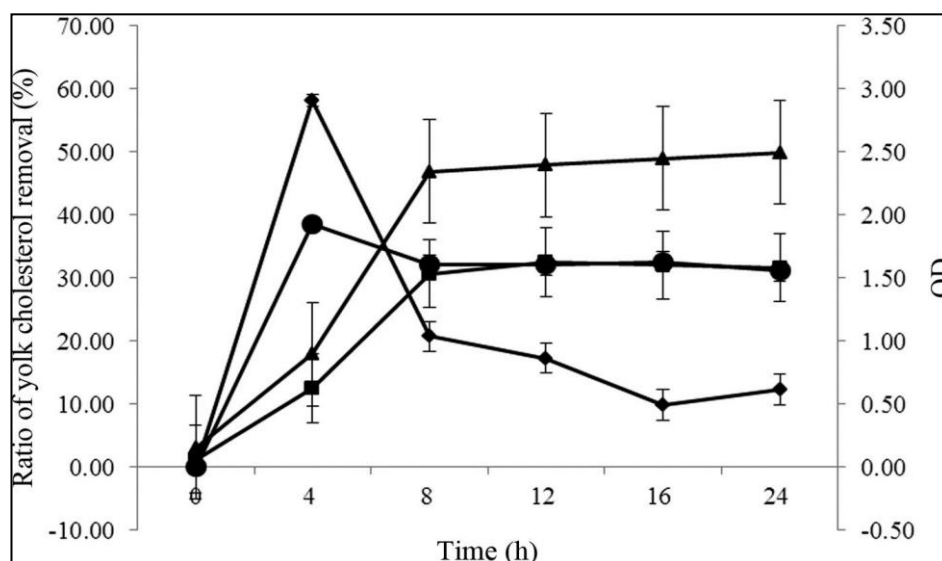


Figure 3. La croissance (*Lactobacillus plantarum* MDL1118 (▲) et *Entérocoque* MDL1114 (■) et le rapport d'élimination du cholestérol du jaune d'œuf (MDL1118 (◆) et MDL1114 (●) dans un bouillon sans sel biliaire. (Hanlu *et al.*, 2013).

Le taux d'élimination du cholestérol est variable selon la souche considéré entre 10 % à 58 %. Ces valeurs sont significative car ($p < 0,05$). La courbe montre clairement l'assimilation du cholestérol qui augmente avec la croissance bactérienne, mais diminue soudainement après 4 à 8 heures, avec des changements mineurs après 8 heures. Les valeurs d'élimination du cholestérol et les courbes de croissance indiquent que l'élimination du cholestérol était associée à la croissance pendant les premières heures d'incubation, mais que l'élimination diminuait à mesure que le temps d'incubation s'allongeait. *Lactobacillus plantarum* a assimilé plus de cholestérol dans les milieux contenant du jaune d'oeuf par rapport à *E. faecalis*. Effectivement , en présence de jaune d'oeuf, les deux LAB ont montré des schémas de croissance brusques pendant les 2 à 4 premières heures, et le pourcentage d'élimination du cholestérol a atteint le maximum à 4 heures, avec une valeur de 58,15 % pour *L. plantarum* et 38,45% pour *E. faecalis*.(Hanlu *et al.*, 2013).

Les pourcentages d'élimination du cholestérol du lait écrémé sont représentés par la figure 04. La teneur en cholestérol du lait écrémé en poudre utilisé dans cette étude était de 28 mg pour 100 mg. Les taux d'assimilation du cholestérol naturel du lait écrémé, varient selon la souche considérée. La combinaison de *L. Plantarum* et *E. faecium* atteint le plus haut taux ($p < 0,01$) d'élimination du cholestérol du lait écrémé (48,95 %), et c'est bien supérieur comparé à l'assimilation de chaque souche seule. (Hanlu *et al.*, 2013).

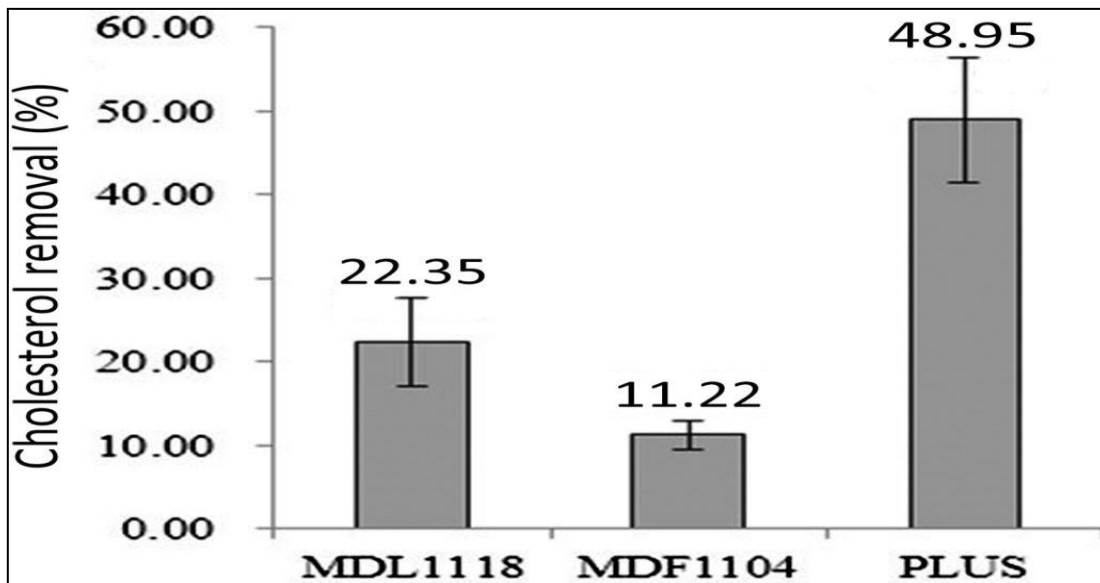


Figure 4. Élimination du cholestérol du lait écrémé par *Lactobacillus plantarum* MDL1118 et *Enterococcus faecium* MDF1104. PLUS représente la combinaison de MDL1118 et MDF1104. (Hanlu *et al.*, 2013).

Les taux d'élimination du cholestérol synthétique sans et/ou avec sel biliaire sont représentés dans la figure 06 & 07. Les résultats de la figure 05 reflètent, que ni les bactéries seules ni la combinaison des deux n'ont pu éliminer le cholestérol du bouillon MRS sans taurocholate de sodium; cela est indiqué par le taux d'enlèvement négatif illustré. En contre partie, les deux LAB ont éliminé le cholestérol synthétique douillon MRS en présence de 2% (m/v) de taurocholate de sodium (Fig. 06). La quantité du cholestérol éliminé était spécifique aux LAB et significative. *Enterococcus faecium* (93,13 %) ont éliminé un pourcentage significativement plus élevé ($p < 0,01$) de cholestérol que *L. plantarum* (82,22 %). (Hanlu *et al.*, 2013).

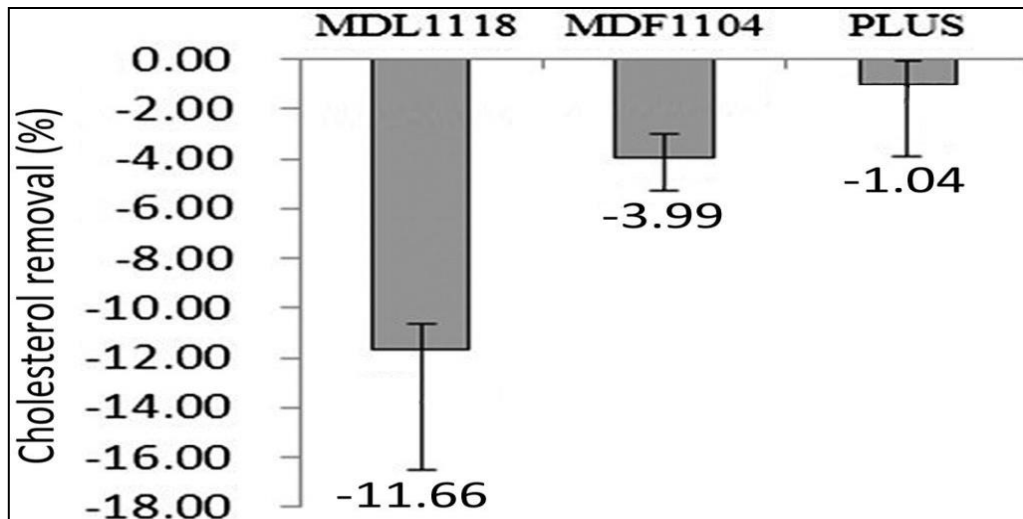


Figure 5. Élimination du cholestérol par *Lactobacillus plantarum* MDL1118 et *Enterococcus faecium* MDF1104 dans un bouillon sans sel biliaire. PLUS fait référence à la combinaison de MDL1118 et MDF1104. (Hanlu *et al.*, 2013).

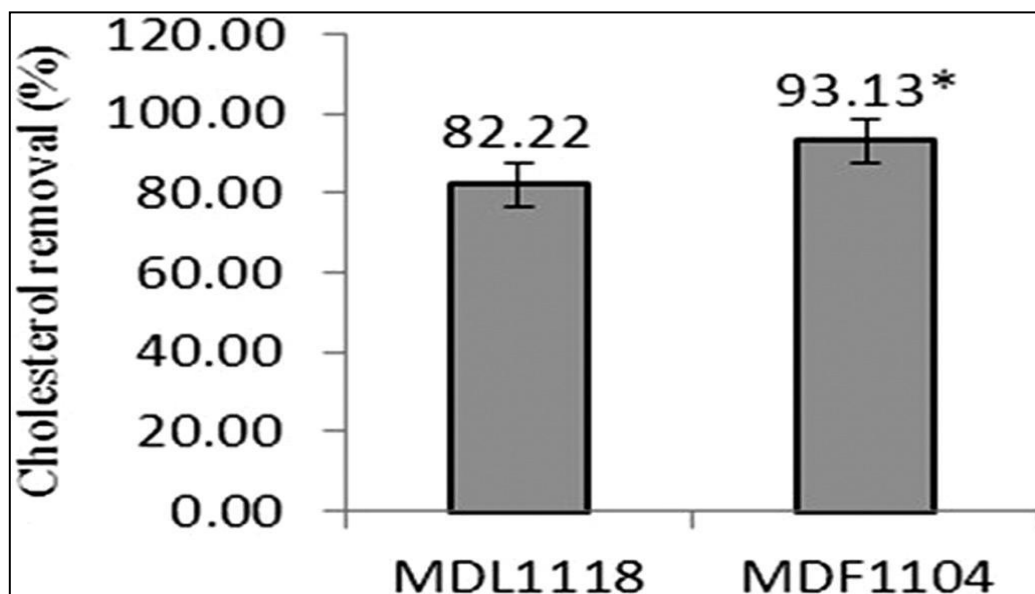


Figure 6. Élimination du cholestérol par *Lactobacillus plantarum* MDL1118 et *Enterococcus faecium* MDF1104 dans un bouillon MRS additionné de 0,2% dethioglycolate de sodium. L'astérisque (*) indique une différence significative entre les 2 souches. (Hanlu *et al.*, 2013).

Par ailleurs; les bactéries lactiques peuvent éliminer le cholestérol grâce aux sels biliaires présents in vitro (Lye *et al.*, 2010, Liong et Shah, 2005, Philippe, 2011). Très peu de cholestérol a été éliminé après 8 h, car les souches sont passées en phase stationnaire et leur

capacité d'élimination du cholestérol a diminué. Ces résultats indiquent que l'élimination du cholestérol est liée à la croissance bactérienne et qu'une élimination rapide du cholestérol existe pendant la phase de latence de la croissance (**Hanlu et al., 2013**).

Ces résultats sont en contradiction avec l'étude de (**Lin et al., 2007**), qui a rapporté que l'élimination maximale du cholestérol se produisait après 20 h de croissance. (**Lin et al., 2007; Hanlu et al., 2013**).

Au cours de la croissance cellulaire, la présence de cholestérol permet d'augmenter la concentration d'acides gras saturés et insaturés, entraînant une résistance accrue de la membrane et une résistance cellulaire plus élevée à la lyse (**Ooi et Liang, 2010**). Cependant, le cholestérol synthétique n'a pas pu être éliminé dans un milieu exempt de sels biliaires. En d'autres termes, la présence de sels biliaires a un effet positif sur l'élimination du cholestérol (**Tok et Aslim, 2010**).

En revanche, (**Lim et al., 2004**) ont découvert que certaines souches de LAB étaient capables de réduire le cholestérol dans le bouillon MRS sans la présence de bile bovine. Ces résultats contradictoires soulignent en outre que l'élimination du cholestérol semble être spécifique à la souche (**Hanlu et al., 2013**).

Ziar (2013), a rapporté que des souches starters du yaourt, assimilent plus de cholestérol que la souche à statut probiotique avéré (*Bifidobacterium animalissub sp lactis*) et que les sources glucidiques ou azotées seraient les clés dans la modulation sélective de l'expression bactérienne en présence de la bile, bien que toxique, est indispensable à l'établissement du pouvoir d'assimilation de cholestérol chez les bactéries ainsi que sa viabilité (**Ziar, 2013**).

III.2. Effet in vivo des souches lactiques isolées du vison sur les taux de cholestérol sérique total chez la souris BALB/c:

Les résultats du dosage des taux de cholestérol dans le sérum des souris sont représentés la **Figure 07**. Aucune des souris qui ont été nourries avec les souches lactiques n'est morte au cours des expériences. Les taux de cholestérol sérique total affichés varient selon que les souris nourries par gavage avec *L. plantarum*, *E. faecium* seule ou en combinaison des 2. La plus faible quantité de cholestérol ($p < 0,01$) (0,90 mmol/L) est déterminée chez les souris nourries par la combinaison de *L. plantarum* et *E. faecium*. Par contre des taux plus ou moins importants sont affichés sans différence significative ($p > 0,05$) dans la teneur en cholestérol par les autres groupes, mais une tendance à la baisse est enregistrée chez *L. plantarum* (1,08 mmol/L) ou *E. faecium* (1,13 mmol/L) appliqués seuls, par rapport au témoin (1,39 mmol/L).

Par conséquent, une combinaison de *L. plantarum* et *E. faecium* a été sélectionné pour compléter le régime alimentaire des visons afin de déterminer leur effet sur les taux de cholestérol sérique total des visons. (Hanlu *et al.*, 2013).

Les bactéries lactiques isolées du vison peuvent diminuer les taux de cholestérol sérique total chez la souris, ce qui est en accord avec les résultats de (Nguyen *et al.*, 2007). Leur étude a montré que *L. plantarum* PH04 a abaissé le cholestérol sérique isolé des selles de nourrissons. En outre, il a été démontré que l'alimentation des rats et des hamsters avec des lactobacilles ou du lait fermenté est efficace pour réduire le cholestérol sérique, le cholestérol des lipoprotéines de basse densité et les taux de triglycérides (Xie *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2009 dans Hanlu *et al.*, 2013).

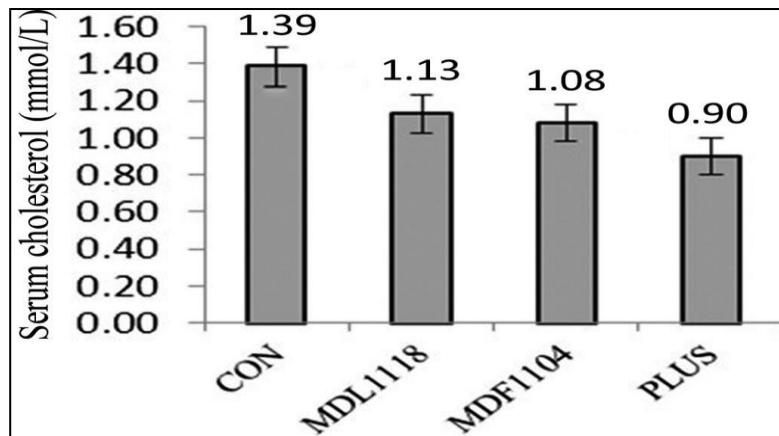


Figure 7 : taux de cholestérol sérique chez la souris. con, pas d'ajout de bactéries; *lactobacillus plantarum* mdl1118, 1×10^9 ufc/ml ; *enterococcus faecium* mdf1104, 1×10^9 ufc/ml ; plus, mdl1118+mdf1104, 1×10^9 ufc/ml. (Hanlu *et al.*, 2013).

III.3. Effet in vivo des souches lactiques isolées du vison sur les taux sériques totaux de cholestérol et de triglycérides chez le vison :

Les différents résultats du dosage des taux de cholestérol et des triglycérides chez les groupes femelles et mâles, sont illustrés dans les figures 08; 09;10 et 11. Le taux de cholestérol sérique a considérablement diminué ($p = 0,0004$) dans le groupe des mâles à dose élevée par rapport au groupe témoin et aux autres groupes de visons femelles (figure 08). La teneur totale en cholestérol sérique chez les visons mâles, dans le groupe recevant la dose élevée était similaire ($p = 0,21$) à celui du groupe témoin et des autres groupes mâles (figure 09). La teneur totale en cholestérol sérique était de 6,49, 6,43, 5,94 et 5,81 mmol/L dans les groupes témoins, à dose faible, moyenne et élevée, respectivement. Il n'y avait aucune différence

significative dans les taux sériques de triglycérides chez les femmes (**figure10**) ($p = 0,32$) ou des groupes mâles(**figure 11**)($p = 0,45$). Fait intéressant, les niveaux de triglycérides chez les visons mâles étaient inférieurs à ceux des visons femelles à la même dose de souches lactiques (**Hanlu et al., 2013**).

Les taux de cholestérol sérique total ont diminué davantage chez les visons femelles que chez les visons mâles. Cela contradictoire avec l'étude de (**Kenneth et al., 1983**), qui ont rapporté que les taux de cholestérol n'étaient pas significativement affectés par les hormones sexuelles, telles que les œstrogènes et la testostérone. Cependant, le fait que la synthèse cutanée des stérols soit plus élevée chez les animaux mâles pourrait expliquer pourquoi il existe des variations du taux de cholestérol chez les visons mâles (**Kenneth et al., 1983**).

Le taux de cholestérol a diminué davantage chez les visons femelles que chez les visons mâles après un traitement par LAB. Cela peut être expliqué par la présence d'une charge bactérienne plus importante par unité de masse corporelle (**Hanlu et al., 2013**).

Les triglycérides sériques ont également été réduits lors du traitement par les souches lactiques, ce qui suggère que peut-être l'effet hypolipémiant de la bactérie n'était pas dû à une redistribution des lipides du plasma mais plutôt à une diminution de l'absorption intestinale des lipides ou à une augmentation du catabolisme lipidique (**Nguyen et al., 2007**).

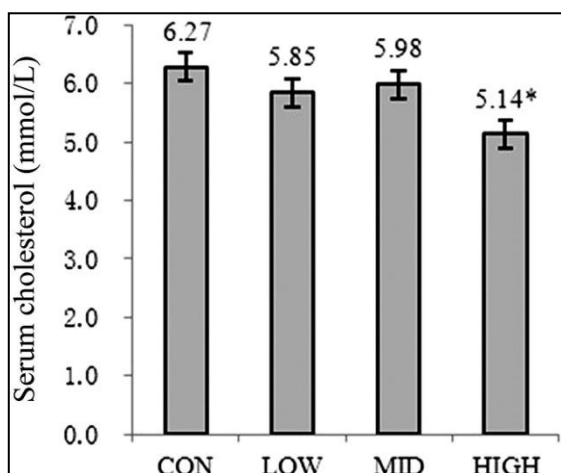


Fig. 8. Taux de cholestérol sérique total des visons femelles après addition de différentes quantités de *Lactobacillus plantarum* MDL1118 plus *Enterococcus faecium* MDF1104. CON, pas de supplément ; FAIBLE, 6×10^7 UFC/g ; MOYEN, 6×10^9 UFC/g ; HAUT, 6×10^{10} UFC/g. (Hanlu *et al.*, 2013).

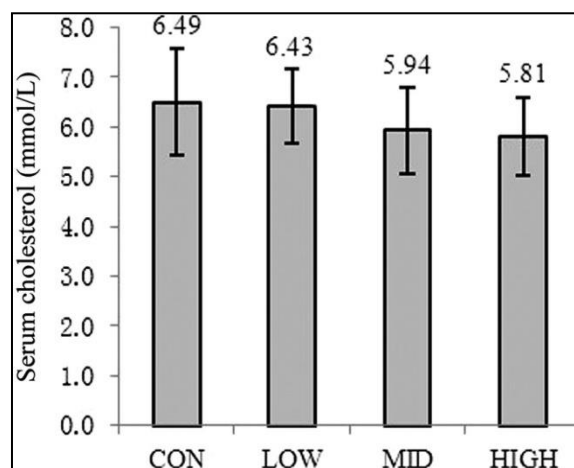


Fig. 9. Taux de cholestérol sérique total des visons mâles après addition de différentes quantités de *Lactobacillus plantarum* MDL1118 plus *Enterococcus faecium* MDF1104. CON, pas de supplément ; FAIBLE, 6×10^7 UFC/g ; MOYEN, 6×10^9 UFC/g ; HAUT, 6×10^{10} UFC/g. (Hanlu *et al.*, 2013).

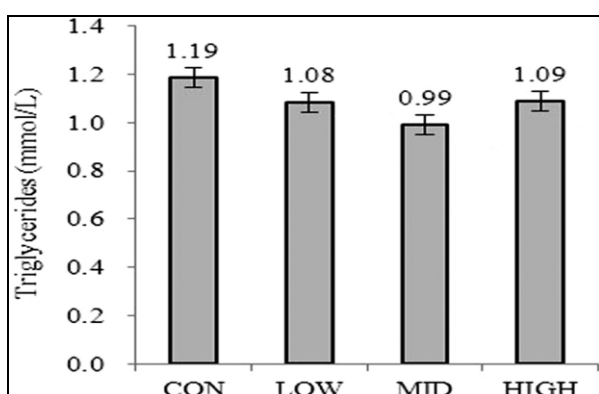


Fig.10. Taux de triglycérides des visons femelles après l'ajout de différentes quantités de *Lactobacillus plantarum* MDL1118 plus *Enterococcus faecium* MDF1104. CON, pas de supplément ; FAIBLE, 6×10^7 UFC/g ; MOYEN, 6×10^9 UFC/g ; HAUT, 6×10^{10} UFC/g (Hanlu *et al.*, 2013).

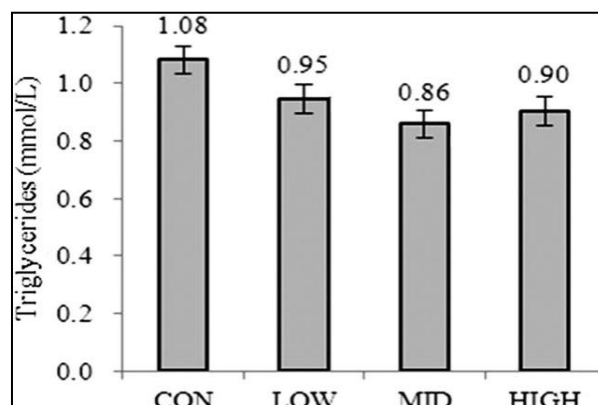


Fig.11. Taux de triglycérides du vison mâle après l'ajout de différentes quantités de *Lactobacillus plantarum* MDL1118 plus *Enterococcus faecium* MDF1104. CON, pas de supplément ; FAIBLE, 6×10^7 UFC/g ; MOYEN, 6×10^9 UFC/g ; HAUT, 6×10^{10} UFC/g (Hanlu *et al.*, 2013).

Plusieurs autres recherches précédentes ont confirmé que les bactéries lactiques peuvent éliminer le cholestérol in vitro et in vivo (**Lye et al. 2010; Liong et Shah, 2005; Danielson et al., 1989; Gilliland et al., 1985**). Cependant, les travaux de **Hanlu et al. (2013)** ont également trouvé des différences significatives dans l'abaissement du taux de cholestérol in vitro et in vivo et déterminent que *Lactobacillus plantarum* ne correspondait pas à son effet hypocholestérolémiant élevé in vivo. En plus, *E. faecium* MDF1104 a éliminé plus de cholestérol sérique que *L. plantarum* MDL1118 in vivo (**Hanlu et al., 2013**).

Par ailleurs, les travaux de (**Dilmi et al., 2002**) dont l'étude de l'effet de deux souches de *Lactobacillus paracasei* (*Lactobacillus paracasei* 6 (Lp6) et *Lactobacillus paracasei* 9 (Lp9)) a été testé sur la cholestérolémie du lapin; les souches ont servi pour la fabrication d'un lait fermenté (LF) qui a été utilisé pour nourrir des lapins mâles de même espèce (*O. cuniculus*) dans l'expérimentation. Leurs résultats concluent qu'en présence d'un taux normal de cholestérol sanguin, l'action hypocholestérolémiante du lait fermenté (LF) n'est pas significative ($P > 0,05$) et le taux du cholestérol des lapins reste inchangé durant toute la période de l'expérimentation. (**Dilmi et al., 2002**).

Ce phénomène est expliqué aussi par la régulation endogène du cholestérol. En effet, dans les conditions physiologiques (chez l'homme ou l'animal) l'apport exogène du cholestérol hépatique aux divers tissus est suffisant pour que la synthèse endogène dans ces tissus soit inhibée (**Agerback et al., 1995**). De même, l'arrivée du cholestérol dans les cellules permet l'autorégulation de la synthèse cellulaire du cholestérol et par la suite son entrée dans le sang est également autorégulée (**Chanu et al., 1998**). Il est possible que les Lp6 et Lp9 en association (LF) assimilent le cholestérol, et que cette assimilation soit compensée par la synthèse endogène. (**Dilmi et al., 2002**).

Conclusion :

Les résultats de la présente étude ont pu démontrer un effet bénéfique de *L. plantarum* MDL1118 et *E. faecium* MDF1104 pour éliminer le cholestérol issue de différentes sources à savoir; du jaune d'œuf, du lait écrémé et du cholestérol synthétique pendant leurs différentes phases de croissances. In vitro en présence de jaune d'oeuf, les deux souches étudiées ont montré des schémas de croissance brusques pendant les 2 à 4 premières heures, et le pourcentage d'élimination du cholestérol a atteint le maximum à 4 heures, avec une valeur de 58,15 % pour *L. plantarum* et 38,45% pour *E. faecalis*.

Les taux d'assimilation du cholestérol naturel du lait écrémé, varient selon la souche considérée. La combinaison de *L. Plantarum* et *E. faecium* atteint le plus haut taux ($p < 0,01$) d'élimination du cholestérol du lait écrémé (48,95 %), ce qui est supérieur comparé à l'assimilation de chaque souche seule.

La quantité du cholestérol synthétique en absence de 2% (m/v) de taurocholate de sodium , n'a présenté aucune élimination, ni par les bactéries seules ni par la combinaison des deux mais en contre partie , les deux souches ont éliminé le cholestérol synthétique en présence de 2% (m/v) de taurocholate de sodium dans le milieu MRS et les résultats sont significatives et est souche dépendantes ; *Enterococcus faecium* (93,13 %) ont éliminé un pourcentage significativement plus élevé ($p < 0,01$) de cholestérol que *L. plantarum* (82,22 %).

In vivo; les taux de cholestérol sérique total affichés dans l'essai chez les souris BALB/c, varient selon que les souris nourries par gavage avec *L. plantarum*, *E. faecium* seule ou en combinaison des 2. La plus faible quantité de cholestérol ($p < 0,01$) (0,90 mmol/L) est déterminé chez les souris nourries par la combinaison de *L. plantarum* et *E. faecium*. Par contre des taux plus ou moins importants sont affichés sans différence significative ($p > 0,05$) dans la teneur en cholestérol par les autres groupes, mais une tendance à la baisse est enregistrée chez *L. plantarum* (1,08 mmol/L) ou *E. faecium* (1,13 mmol/L) appliqués seuls, par rapport au témoin (1,39 mmol/L).

Le taux de cholestérol sérique totale rapporté par l'essai chez les visons mâles et femelles a considérablement diminué ($p = 0,0004$) dans le groupe des mâles à dose élevée par rapport au groupe témoin et aux autres groupes de visons femelles et la teneur totale en cholestérol sérique chez les visons mâles, dans le groupe recevant la dose élevée était similaire ($p = 0,21$)

à celui du groupe témoin et des autres groupes mâles . Aussi, la teneur totale en cholestérol sérique était de 6,49, 6,43, 5,94 et 5,81 mmol/L dans les groupes témoins, à dose faible, moyenne et élevée, respectivement. Pour les taux sériques de triglycérides il n'y avait aucune différence significative dans les groupes femelles ($p = 0,32$) ou des groupes mâles ($p = 0,45$) et les niveaux de triglycérides chez les visons mâles étaient inférieurs à ceux des visons femelles à la même dose des souches lactiques.

Sur la base des constatations faites lors de l'analyse de cet article, *L. plantarum* MDL1118, *E. faecium* MDF1104 et leur combinaison peuvent être des candidats prometteurs pour une utilisation en tant que probiotiques.

Références
Bibliographiques

- **Agerback M, Gerdes LU, Richelsen B. (1995).**Hypercholesterolemic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. *Eur. J. Clin. Nutr.* 49: 346 - 352.
- **Axelsson L. et Ahrné S. (2000).**Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbial Systematics*, Springer: 367-388.
- **Bengmark S. (2000).**Colonic food: pre-and probiotics, *American Journal of Gastroenterology*, 95 (1):5-7.
- **Benkerroum N. (2013).** Traditional Fermented Foods of North African Countries: Technology and Food Safety Challenges with Regard to Microbiological Risks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 12(1): 54-89.
- **Björkroth J. et Holzapfel W. (2006).** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *The Prokaryotes*, Springer: 267-319.
- **Borg J. et Reeber A. (2004).** *Biochimie métabolique*. Ed Ellipses. France: p82.
- **Camus G. (2018).**Formule développée du cholestérol, 02 mai 2018; ([https://planet-vie.ens.fr/content/ Les différents types de lipoprotéine](https://planet-vie.ens.fr/content/Les%20diff%C3%A9rents%20types%20de%20lipoprot%C3%A9ine))
- **Chanu B, Chalier L, Jacotot B. (1998).** Athérosclérose : Physiopathologie des hyperlipoprotéïnémies primaires. *Actualité d'angiologie* 222 : 37-42.
- **Charrel M. (1991).** *Sémiologie biochimique*. Ed Marketing ellipses. Paris: 96P.
- **Chelule P., Mokoena M. et Gqaleni N. (2010).**Advantages of Traditional Lactic Acid Bacteria Fermentation of Food in Africa. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* 2: 1160-1167.
- **Corinne Tutin. (2018), Bon cholestérol, mauvais cholestérol et cholestérol total .Médecin et journaliste santé/le 01 octobre 2018; (https://www.doctissimo.fr/html/dossiers/cholesterol/sa5370_cholesterol_analyses.htm)**
- **Danielson, A.D., Peo, E.R., Jr., Shahani, K.M., Lewis, A.J., Whalen, P.J., and Amer, M.A. (1989).** Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J. Anim. Sci.* PMID:2497098.67: 966–974.
- **David, M. I., Eric Weinert, J., Kim, C.S. C, McGinn, J.M., Miller, S.M .,Cheyanne, K & DuPonte, M.W. (2013).** Natural Farming: Lactic Acid Bacteria. *Sustainable Agriculture for food. Nature Reviews Microbiology*, 3,777-788.
- **De Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, E. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol* doi:10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x.. 23(1): 130–135.
- **De Roissart H. et Luquet F. (1994) Bacteries Lactiques I: Aspects Fondamenteaux Et Technologiques.** Loriga , Uriage edn. France. vol 1

- **Delorme C, Bartholini C, Bolotine A, Ehrlich SD, Renault P. (2010).** Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Apl. Env. Microbiol.*, 76(2): 451-460.
- **Delzenne N.M. & Roberfroid M.B. (1994).** Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 27:1-6.
- **Dicks L., Dellaglio F. et Collins M. (1995).** Proposal to Reclassify *Leuconostoc Oenos* as *Oenococcus Oeni* [Corrig.] **Gen. Nov., Comb. Nov.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 45(2): 395-397.
- **Dilmi-Bouras A., Sadoun D. (2002).** Effet du yaourt à *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* sur le cholestérol sanguin chez le lapin. *Méd. Nutr.*, 38 (1), p. 24-32.
- **Eysen H.J., Parmentier G.G., Compennolle F.C., De Pauw G., and Piessens-Denef M., 1973.** Biohydrogenation of sterols by Eubacterium ATCC 21,408--Nova species. *Eur. J Biochem.*, 36,411-421.
- **Frey L. et Hubert J. (1993).** Lactobacilles, Oxygène, Métabolisme Et Antagonisme. *Le lait*. 73(2): 133-144.
- **Fusco V., Quero G. M., Cho G.-S., Kabisch J., Meske D., Neve H., Bockelmann W. et Franz C. M. (2015).** The Genus *Weissella*: Taxonomy, Ecology and Biotechnological Potential. *Frontiers in Microbiology*. 6: 155
- **Garrity, G.M., Bell, J.A., and Lilburn, T.G. (2004).** *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 3. 2nd ed. New York.
- **Genest G. (2000).** Vivre avec le cholestérol. Commandité par Astrazeneca. Canada: p1-2
- **Gilliland S. E. (1990).** Health and Nutritional Benefits from Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 7(1-2): 175-188
- **Gilliland, S.E; Nelson, C.R; et Maxwell, C. (1985).** Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. PMID:3920964. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:377-381.
- **Hames B.D., Hooper N.M., et Houghton J.D. (2000).** *L'essentiel en biochimie*. Ed Berti. Paris: p 321-325.
- **Hammes W. P. et Hertel C. (2006).** The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *The Prokaryotes*, Springer : 320-403.
- **Han Liu, C. Yang, Y. Jing, Z. Li, W. Zhong et G. Li (2013).** Institut des sciences animales et végétales spéciales, Académie chinoise des sciences agricoles, République populaire de Chine. Jilin, 130122

- **Hardie J. et Whiley R. (1997).** Classification and Overview of the Genera Streptococcus and Enterococcus. *Journal of Applied Microbiology*. 83(S1).
- **Herich R. et Levkut M. (2002).** Lactic Acid Bacteria, Probiotics and Immune System. *Veterinari Medicina - Czech*. 47(6): 169-180.
- **Holewijn S., Den Heijer M., Swinkels DW., Stalenhoef AF., De Graaf J. (2010).** Apolipoprotein B, non-HDL cholesterol and LDL cholesterol for identifying individuals at increased cardiovascular risk. *J Intern Med.*, 268(6):567-77.
- **Hols P, Hancy F, Fontaine L, Grossiord B, Prozzi D., Leblond-Bourget N, Decaris B, Bolotin, Delorme C, Dusko Ehrlich S, Gue´don E, Monnet V, Renault P, Kleerebezem M. (2005).** New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus Thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 435–463.
- **Hua, J., Liu, S.L., Ling, A., et Wang, Y. (2007).** Study on characteristics of growth, screening and identification of cholesterol-reducing lactic acid bacteria. *China Dairy Industry*. 35: 7–10.
- **Jeun J, Kim S, Cho SY, Jun HJ, Park HJ, Seo JG, Chung MJ & Lee SJ (2009) .** Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition* 26, 321-330.
- **Kenneth, R.F., Macrae, G., Moser, A.H., Wu, J., Siperstein, M.D., and Wiley, M.H. (1983).** Differences in de novo cholesterol synthesis between the intact male and female rat. *Endocrinology*, 112: 96–103. doi:10.1210/endo-112-1-96. PMID: 6847837.
- **Kimoto, H., Ohmomo, S., and Okamoto, T. (2002).** Cholesterol removal from media by lactococci. *J. Dairy Sci.* doi:10.3168/jds.S00220302(02)74406-8. PMID:12512591. 85: 3182–3188.
- **Klaver FA & van der Meer R (1993).** The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl Environ Microbiol* 59, 1120-1124.
- **Kullisaar T, Songisepp E, Mikelsaar M, Zilmer K, Vihalemm T & Zilmer M (2003).** Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *Br J Nutr* 90, 449-456.
- **Lehmann-Che J. (2016).** Lipoprotéines, cholestérol et dyslipidémies, rôle de cholestérol, Bichat, (http://12bichat2012-2013.weebly.com/uploads/1/3/9/0/13905422/ue8_-_cours_n6.pdf)
- **Li, T. & Chiang, J.Y.L., (2009).** Regulation of Bile Acid and Cholesterol Metabolism by PPARs. *PPAR research*, 2009, p.11.

- **Lim, H.-J., Kim, S.-Y., and Lee, W.-K. (2004).** Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *J. Vet. Sci.* PMID:15613825.5(4):391–395.
- **Lin, W.-H., Yu, B., Jang, S.-H., et Tsen, H.-Y. (2007).** Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe.*, doi:10.1016/j.anaerobe.2007.04.006. PMID:17544731. p13(3-4): 107–113
- **Liong, M.T., et Shah, N.P. (2005).** Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *J. Dairy Sci.* doi:10.3168/jds.S00220302(05)72662-X. PMID:15591367. 88(1): 55–66.
- **Luu, W. et al., (2015).** The terminal enzymes of cholesterol synthesis, DHCR24 and DHCR7, interact physically and functionally. *Journal of Lipid Research*, 56(4), pp.888–897. Available at: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M056986>.
- **Lye, H.-S., GulamRusul, R.-A., and Liong, M.-T. (2010).** Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *Int. Dairy J.* 20(3): 169–175. doi:10.1016/j.idairyj.2009.10.003.
- **Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, other authors. (2006).** Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 15611–15616.
- **Mann G.V. and Spoerry A., 1974.** Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. *Technologie de production. Am. J Clin. Nutr.*, 61, 353-359. 23. Marmur J., 1961. A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, 3, 208-218.
- **Matamoros S. (2008).** Caractérisation De Bactéries Lactiques Psychrotrophes En Vue De Leur Utilisation Dans La Biopréservation Des Aliments: Étude Physiologique Et Moléculaire Des Mécanismes D'adaptation Au Froid. Thèse de doctorat. Nantes.
- **Matsumoto M & Benno Y (2004).** Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutat Res* 568, 147-153.
- **Nguyen, T.D.T., Kang, J.H., and Lee, M.S. (2007).** Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int. J. Food Microbiol.* 113:358–361. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.015. PMID:17140690.
- **Nicolas J. L., Gatesoupe J., Frouel S., Bachere E. et Gueguen Y. (2007).** Quelles Stratégies Alternatives Aux Antibiotiques En Aquaculture? *INRA Production Animale.* 20(3): 253-258.

- **Nordqvist, C. (2004).** Lactic acid bacteria - their uses in food. Medical News Today. Retrieved from [http:// www.medicalnewstoday.com/releases/14023.php](http://www.medicalnewstoday.com/releases/14023.php)
- **Ooi, L.G., and Liong, M.T. (2010).** Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 2499– 2522. doi:10.3390/ijms11062499. PMID:20640165
- **Park YH, Kim JG, Shin YW, Kim SH & Whang KY (2007).** Effect of dietary inclusion of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats. *J MicrobiolBiotechnol* 17, 655-662.
- **Perdigon G., Fuller R. et Raya R. (2001).** Lactic Acid Bacteria and Their Effect on the Immune System. *Current Issues in Intestinal Microbiology.* 2(1): 27-42
- **Philipp, B. (2011).** Bacterial degradation of bile salts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 903– 915. doi:10.1007/s00253-010-2998-0. PMID:21088832.
- **Ponce A., Moreira M., Del Valle C. et Roura S. (2008).** Preliminary Characterization of Bacteriocin-Like Substances from Lactic Acid Bacteria Isolated from Organic Leafy Vegetables. *LWT-Food Science and Technology.* 41(3): 432-441.
- **Raymond Mengual , (2012).** Métabolisme du Cholestérol. Alistair Baber®, Alistair , UE Nutrition, 26/01/2012.
- **Repa, J.J. et Mangelsdorf, D.J., (2000).** The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annual review of cell and developmental biology*, 16, pp.459–481.
- **Robin J. M. et Rouchy A. (2001).** Les Probiotiques. *Nutrithérapie Info*, Centre d’Etude et de Développement de la Nutrithérapie. 6: 1-4.
- **Rudel, L.L., and Morris, M.D. (1973).** Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *J. Lipid Res.* 14: 364–366. PMID:14580182.
- **Salveti E., Torriani S. et Felis G. E. (2012).** The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* 4(4): 217-226.
- **SAVADOGO A. et A. TRAORE, (2011) /** *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5(5): 2057-2075.
- **Schillinger U., Geisen R. et Holzapfel W. (1996).** Potential of Antagonistic Microorganisms and Bacteriocins for the Biological Preservation of Foods. *Trends in Food Science & Technology.* 7(5): 158-164.
- **Stapleton PA., Goodwill AG., James ME., Brock RW., Frisbee JC. (2010).** Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. *J Inflamm.*, 7:54.

- **Tahri K., Crociani J., Ballongue J. & Schneider, F. (1995).** Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 149–151.
- **Tailliez P., (2001).** Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait*, 8], 1-11.
- **Tok, E., and Aslim, B. (2010).** Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiol. Immunol.* 54: 257–264. doi:10.1111/j.13480421.2010.00219.x. PMID:20536722.
- **Tortuero F., Fernandez E., Ruperez P. & Moreno M. (1997).** Raffinose and lactic acid bacteria influence caecal fermentation and serum cholesterol in rats. *Nutrition Research*, 17:41-49.
- **Tsai, T.Y., Chu, L.H., Lee, C.L., and Pan, T.M. (2009).** Atherosclerosis-preventing activity of lactic acid bacteria-fermented milk–soymilk supplemented with *Momordica charantia*. *J. Agric. Food Chem.* 57: 2065–2071. doi:10.1021/jf802936c. PMID:19216552.
- **Vítek, L. & Haluzík, M., (2016).** The role of bile acids in metabolic regulation. *The Journal of endocrinology*, 228(3), pp.85–96.
- **Wang YM., Zhang B., Xue Y., Li ZJ., Wang JF., Xue CH., Yanagita T. (2010).** The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats. *Lipids Health Dis.*, 9:4.
- **Xie, N., Cui, Y., Yin, Y.-N., Zhao, X., Yang, J.-W., Wang, Z.-G., Fu, N., Tang, Y., Wang, X.-H., Liu, X.-W., Wang, C.-L., and Lu, F.-G. (2011).** Effects of two *Lactobacillus* sur le métabolisme des lipides et la microflore intestinale chez des rats nourris avec un régime riche en cholestérol. *Complément BMC. Alternatif. Méd.* 11 : 53. doi:10.1186/1472-6882-11-53. PMID : 21722398.
- **Ziar H. (2013).** *Les bactéries lactiques: Survie et Assimilation de cholestérol. Thèse de doctorat, Univ. Mostaganem, pp. 43-44*

Annexes

Annexe 01

Résultats de la croissance bactérienne (Densité optique)

Figure 1 montre la courbe de croissance des souches MDL1118 et MDF1104 après culture pendant 36 h. La phase de croissance exponentielle a été observée entre 2 et 10 h d'incubation par les deux souches. Cela a été suivi d'une phase stationnaire d'au moins 36 h. (Hanlu *et al*, 2013)

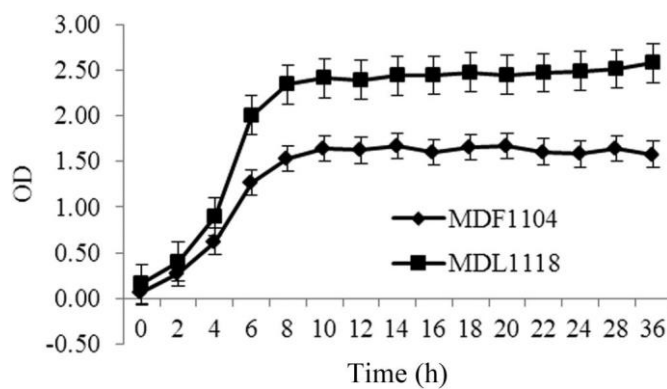


Fig. 12. Courbes de croissance de *Enterococcus faecium* MDF1104 et *Lactobacillus plantarum* MDL1118 (Hanlu *et al*, 2013)

See discussions, stats, and author profiles for this publication at:

<https://www.researchgate.net/publication/253337317>

Ability of lactic acid bacteria isolated from mink to remove cholesterol: In vitro and in vivo studies

Article in *Canadian Journal of Microbiology* · August 2013

DOI: 10.1139/cjm-2013-0200 · Source: PubMed

CITATIONS
12

READS
744

6 authors, including:



Han Lu Liu

Chinese Academy of
Agricultural Sciences

20 PUBLICATIONS
195 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Zhi Peng Li

Jilin Agricultural University

62 PUBLICATIONS 383 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Guangyu Li

[SEE PROFILE](#)

148 PUBLICATIONS 1,982 CITATIONS

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Juvenile deer GIT microbiome [View project](#)



Rumen Microbiome [View project](#)

All content following this page was uploaded by [Zhi Peng Li](#) on 10 November 2014.

The user has requested enhancement of the downloaded file.

Ability of lactic acid bacteria isolated from mink to remove cholesterol: in vitro and in vivo studies

Hanlu Liu, Chenjie Yang, Yi Jing, Zhipeng Li, Wei Zhong, and Guangyu Li

Abstract: This study evaluated the cholesterol-lowering property of lactic acid bacteria (LAB) isolated from mink. Two strains, *Enterococcus faecium* MDF1104 and *Lactobacillus plantarum* MDL1118, were shown to remove cholesterol from broths of natural hen egg yolk and skimmed milk. The cholesterol in hen egg yolk was reduced by 58.15% and 38% by *L. plantarum* and *E. faecium*, respectively. When the bacteria were used in combination, 48.95% ($p < 0.01$) of cholesterol was removed from skimmed milk. Experimental mice remained healthy when fed different doses of the LAB, and the total serum cholesterol concentration was the lowest (0.90 mmol/L) ($p < 0.01$) when a combination of *L. plantarum* and *E. faecium* was used. Based on our results, we suggest that *L. plantarum* MDL1118, *E. faecium* MDF1104, or a combination of the 2 strains could be considered as promising cholesterol-lowering probiotics.

Key words: mink source, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, cholesterol removal.

Résumé : La présente étude a évalué la capacité de bactéries lactiques (BL) provenant de visons à faire baisser le cholestérol. On révèle que deux souches, *Enterococcus faecium* MDF1104 et *Lactobacillus plantarum* MDL1118, éliminent le cholestérol contenu dans des bouillons à base de jaune d'œuf naturel de poule et à base de lait écrémé. La teneur en cholestérol du jaune d'œuf de poule a reculé de 58,15 % et 38 %, en présence de *E. faecium* et *L. plantarum*, respectivement. Lorsque les bactéries ont été jumelées, 48,96 % ($p < 0,01$) du cholestérol a été éliminé du lait écrémé. La santé de souris expérimentales n'a pas souffert de différentes doses orales de BL, et leur concentration de cholestérol sérique total a atteint son plus bas niveau (0,90 mmol/L) ($p < 0,01$) en présence de la combinaison de *L. plantarum* et *E. faecium*. À la lumière de nos résultats, nous proposons que *L. plantarum* MDL1118 et *E. faecium* MDF1104, seuls ou ensemble, pourraient représenter des probiotiques anticholestérolémiques prometteurs. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : provenance du vison, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, élimination du cholestérol.

Introduction

Cholesterol is an important structural component of the animal cell membrane (Boone et al. 2011). However, an imbalance in the blood has serious consequences. Indeed, hypercholesterolemia is a well-known major risk factor for coronary heart disease (Ai et al. 2010). In addition, high cholesterol levels in serum and diet are strongly associated with increased incidences of human colon cancer (Hu et al. 2012). An estimated 9.4 million deaths each year, or 16.5% of all deaths, can be attributed to cerebrovascular diseases (Chiang and Pan 2012; Lim et al. 2013). The number of people who die from cerebrovascular diseases is expected to reach 23.3 million by 2030 (WHO 2013). Even a small reduction in total serum cholesterol by 1% can lower the risk of coronary heart disease by 2%–3% (Pereira et al. 2003). Studies have shown that the risk of coronary heart disease is approximately 35% higher for each 1 mmol above the normal cholesterol level. Drugs for hypercholesterolemia usually have some undesirable side effects, which have caused concerns with their therapeutic use. Hence, there is a need for a more natural method to decrease the serum cholesterol concentration in humans (Sridevi et al. 2009).

Probiotics have potential health-promoting benefits as biotherapeutic agents (Park et al. 2007; Begley et al. 2006). Several studies have shown that consumption of dairy products containing probiotics results in decreased serum cholesterol levels (Anderson and Gilliland 1999; Noh et al. 1997). Other studies have reported that some lactic acid bacteria (LAB) can lower both total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels

(Anderson and Gilliland 1999; Sanders 2000; Xie et al. 2011). Interestingly, these studies have also indicated that the removal of cholesterol varies depending on the source and species of LAB used (Sirilun et al. 2010; Kimoto et al. 2002; Zeng et al. 2010).

Mink (*Mustela vison*) are small carnivores that can tolerate up to 35% fat in their diets. We found that the average amount of fat in their diet is approximately 25%. Despite this high fat intake, cardiovascular and cerebrovascular disease in mink has never been reported. Therefore, we suspect that there is a microbial flora that assists in fat metabolism in mink intestine.

The aim of the present study was to investigate the effect of LAB isolated from mink on the removal of cholesterol both in vitro and in vivo. In addition, we investigated and evaluated mink source LAB probiotic properties. This study provides new information on cholesterol removal by probiotic bacteria isolated from mink.

Materials and methods

Strains and growth conditions

The strains used in this study, *Lactobacillus plantarum* MDL1118 and *Enterococcus faecium* MDF1104, were isolated from the intestine of mink. They are Gram-positive, non-spore-forming, anaerobic bacteria that were characterized by 16S rDNA sequencing and by their metabolic and growth characteristics using standard methods (Garrity et al. 2004). The bacteria have been deposited in the Chinese General Microbiology Culture Collection Center under accession codes CGMCC No. 4238 and CGMCC No. 4237 and are

Received 29 March 2013. Revision received 19 June 2013. Accepted 19 June 2013.

H. Liu, C. Yang, Y. Jing, Z. Li, W. Zhong, and G. Li. Institute of Special Animal and Plant Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin 130122, People's Republic of China.

Corresponding author: Guangyu Li (e-mail: tcslyg@126.com).

available upon request. Working cultures were maintained and subcultured in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth (Demain et al. 1960) (MRS broth (Oxoid) and MRS broth supplemented with 0.2% (m/v) sodium thioglycolate (Sigma)). Prior to assaying, the strains were serially transferred 3 times in broth and incubated at 37 °C for 24 h. Seed cultures of each strain were harvested at the end of the exponential growth phase at cell densities of approximately 10^9 CFU/mL. The cultures were stored at 4 °C between transfers and were subcultured twice before experimental use.

Optical density

Bacterial growth was monitored by measuring the optical density of the culture broth at 650 nm by visible spectrophotometry (Specord 50, Jena, Analytikjena, Germany). Each strain was constantly monitored for 36 h and tested every 2 h in triplicate. Uninoculated sterile broth was used as a control.

Egg yolk cholesterol removal from media in vitro

Freshly prepared MRS broth was supplemented with 4% commercial fresh hen egg yolk as a cholesterol source, according to Hua et al (2007), inoculated with 100 µL of an 18 h culture broth of either *L. plantarum* MDL1118 or *E. faecium* MDF1104, and then incubated at 37 °C for 24 h. Egg yolk cholesterol removal was measured at 4, 8, 12, 16, and 24 h following inoculation. After the incubation period, cells were removed from the broth by centrifugation at 5400g for 15 min at 4 °C. A modified colorimetric method, as described by Rudel and Morris (1973), was used to determine the amount of cholesterol in the supernatant. The percentage of cholesterol removed was estimated using the following formula:

$$\text{percentage of removed cholesterol} = \frac{[(\text{amount of cholesterol of the control}) - (\text{amount of cholesterol of the inoculated group})]}{(\text{amount of cholesterol amount of the control})} \times 100$$

Skimmed milk cholesterol removal from media in vitro

Skimmed milk broth was prepared with 12% skimmed milk as a cholesterol source and 8% glucose. The broth (5 mL) was inoculated with 100 µL of an 18 h culture broth of *L. plantarum* MDL1118, *E. faecium* MDF1104, or a combination of the 2 bacteria and then incubated for 24 h at 37 °C. The broth was then centrifuged at 5400g for 15 min at 4 °C. The same method as described above was used to measure cholesterol removal.

Cholesterol removal from media without bile salt in vitro

A filter-sterilized cholesterol solution (10 mg/mL in ethanol) was added to the MRS broth to a final concentration of 70 µg/mL (Kimoto et al. 2002). The broth was inoculated with 1% of an 18 h culture broth of *L. plantarum* (MDL1118), *E. faecium* (MDF1104), or a combination of the 2 bacteria and then incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, cells were removed by centrifugation as described above. The method described by Rudel and Morris (1973) was used to determine the percentage of cholesterol in the spent broth and uninoculated broth.

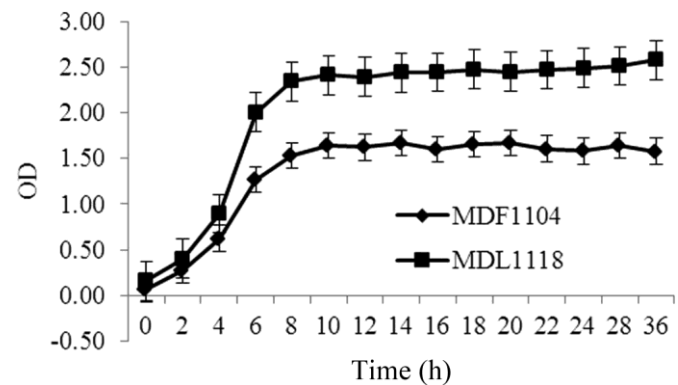
Cholesterol removal from media with bile salt in vitro

Freshly prepared MRS broth was supplemented with 0.2% sodium thioglycolate as a bile salt. Water-soluble cholesterol (polyoxyethanyl cholesteryl sebacate) (Sigma, USA) was filter-sterilized and added to the broth to a final concentration of 70 µg/mL (Kimoto et al. 2002), was inoculated with each of the 2 LAB (1%), and was then incubated at 37 °C for 24 h. After the incubation period, cells were centrifuged, and the remaining cholesterol concentration in the broth was determined using a modified colorimetric method as described above.

Animal feeding trials

All animal procedures were approved by the Wild Animal and Plant Subcommittee of the China Association of Agriculture Sci-

Fig. 1. Growth curves of *Enterococcus faecium* MDF1104 and *Lactobacillus plantarum* MDL1118.



ence Societies (WAPSCAASS). All experiments were performed in accordance with the animal health and well-being regulations.

Mice feeding

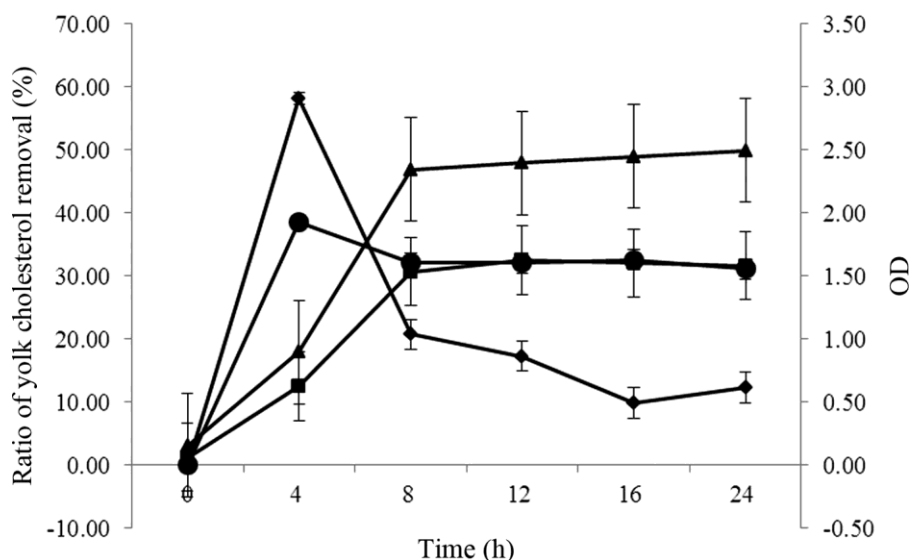
A total of 60, 45-day-old male BALB/c mice (22.1 ± 0.2 g) were divided randomly into 4 groups, with 15 mice per group. The mice were housed in plastic cages in groups of 5 per cage, with 3 replicate cages per group, and fed a normal commercial diet (i.e., 21% protein, 8% fiber, 10.5% minerals and vitamins, 1.4% calcium, 0.7% phosphorous, and 87% dry matter) for 40 days with water ad libitum. The experimental groups were as follows: (1) control group, (2) basal diet supplemented with MDL1118, (3) basal diet supplemented with MDF1104, and (4) basal diet supplemented with MDL1118 and MDF1104 (designated as PLUS group). Freshly prepared overnight cultures of LAB were prepared each day, centrifuged at 5400g for 15 min at 4 °C, and then the cell pellet was resuspended to approximately 1×10^9 CFU/mL in normal saline. Each mouse was fed 0.3 mL of suspensions (about 3×10^8 CFU) by intragastric gavage for 35 days. The control group was fed the same amount of saline via gavage. At the end of the 5-week feeding trial, the mice were fasted for 12 h and sacrificed under anesthesia with sodium pentobarbital by intraperitoneal injection. About 1 mL of blood was collected immediately in sterile tubes by heart puncture and centrifuged at 5000g for 10 min at 4 °C. The serum total cholesterol levels were measured using an automatic biochemical analyzer (AMS-18, Medsoul, China).

Mink experiment

A total of 160 (half male and half female), 30-day-old mink (*Mustela vison*) were divided randomly into 4 groups (40 per group). The experimental groups were as follows: (1) control group (no supplement), (2) feed supplemented with a low dose of MDL1118 or MDF1104 (i.e., 6×10^7 CFU/g), (3) feed supplemented with a mid-dose of MDL1118 or MDF1104 (i.e., 6×10^9 CFU/g), and (4) feed supplemented with a high dose of MDL1118 and MDF1104 (i.e., 6×10^{10} CFU/g). Fresh cultures of LAB were prepared each day. The cultures were centrifuged at 3000g for 15 min, and then the supernatant was discarded. The number of viable bacteria was counted by plating 100 µL of the bacterial culture onto MRS agar plates, incubating for 72 h at 37 °C, and then counting the number of colonies.

The following diet supplement was fed to the mink after being properly mixed: small yellow croaker (65.00%), chicken livers (7.01%), chicken proventriculus (9.00%), mineral and vitamin additives (0.99%), extruded corn (6.00%), and water (12.00%). After 30 days, blood samples from mink, which had fasted for 12 h, were collected via the hind leg toenail and then centrifuged at 5000g for 10 min at 4 °C. Serum was collected and frozen at -20 °C for total serum cholesterol and triglyceride level analyses.

Fig. 2. The growth (*Lactobacillus plantarum* MDL1118 (□) and *Enterococcus faecium* MDF1104 (■)) and the ratio of egg yolk cholesterol removal (MDL1118 (◆) and MDF1104 (●)) in bile-salt-free broth.



Statistical analysis

All data were analyzed using SAS version 8.2 (SAS, Cary, North Carolina) software. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed, and the differences between the means were compared using Duncan's multiple-range test. Treatment effects were considered significant at $p < 0.05$, while trends were observed at $p < 0.10$, unless otherwise noted.

Results

Optical density

Figure 1 shows the growth curve of strains MDL1118 and MDF1104 following culture for 36 h. The exponential growth phase was observed between 2 and 10 h of incubation by both strains. This was followed by a stationary phase of up to at least 36 h.

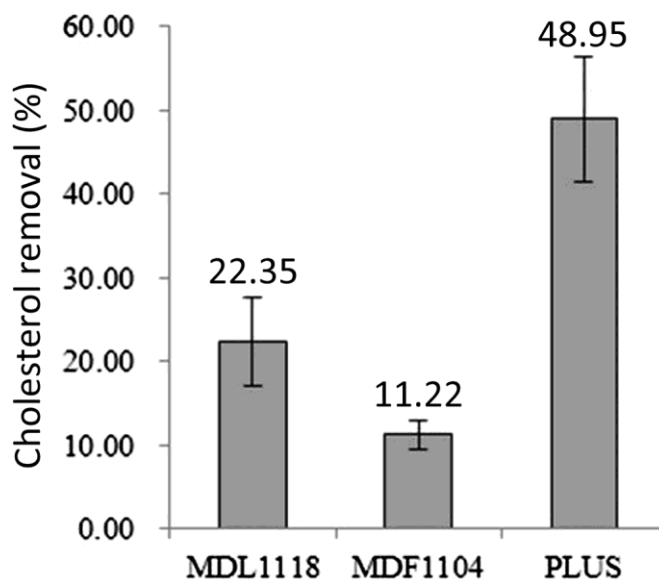
Egg yolk cholesterol removal from media without bile salt in vitro

Cholesterol levels during 24 h of growth of both LAB are shown in Fig. 2. The cholesterol removal ratio varied between the strains ($p < 0.05$) and ranged from 10% to 58%. *Lactobacillus plantarum* assimilated more cholesterol in the media containing yolk compared with *E. faecalis*. In the presence of yolk, both LAB showed sharp growth patterns for the first 2–4 h, and the removal percentage of cholesterol reached a maximum at 4 h, which was 58.15% for *L. plantarum* and 38.45% for *E. faecalis*. Cholesterol assimilation increased with bacterial growth but dropped suddenly after 4–8 h, with minor changes after 8 h. The cholesterol removal values and the growth curves indicated that cholesterol removal was growth associated during the first few hours of incubation, but removal decreased as the incubation time was extended.

Skimmed milk cholesterol removal from media without bile salt in vitro

The cholesterol content in the skimmed milk powder used in this study was 28 mg per 100 mg. Both LAB could remove natural skimmed milk cholesterol, but the removal percentage was different for each bacterium (Fig. 3). The combination of *L. plantarum* and *E. faecium* achieved the highest ($p < 0.01$) skimmed milk cholesterol removal (48.95%), which was far more than either LAB alone.

Fig. 3. Skimmed milk cholesterol removal by *Lactobacillus plantarum* MDL1118 and *Enterococcus faecium* MDF1104. PLUS represents the combination of MDL1118 and MDF1104.



Synthetic cholesterol removal from media without bile salt

Neither of the bacteria alone nor their combination could remove cholesterol from MRS broth without sodium taurocholate. This is indicated by the negative removal ratio shown in Fig. 4.

Synthetic cholesterol removal from media with bile salt

In contrast, both LAB could remove synthetic cholesterol from MRS broth with 2% (*m/v*) sodium taurocholate (Fig. 5). The amount of cholesterol removed was LAB specific. *Enterococcus faecium* (93.13%) removed a significantly higher ($p < 0.01$) percentage of cholesterol than *L. plantarum* (82.22%).

Minimum cholesterol removal was observed in the medium without bile, whereas maximum cholesterol removal was observed in the medium supplemented with 0.2% sodium taurocholate. In both groups more than 80% of cholesterol was removed.

Fig. 4. Cholesterol removal by *Lactobacillus plantarum* MDL1118 and *Enterococcus faecium* MDF1104 in bile-salt-free broth. PLUS refers to the combination of MDL1118 and MDF1104.

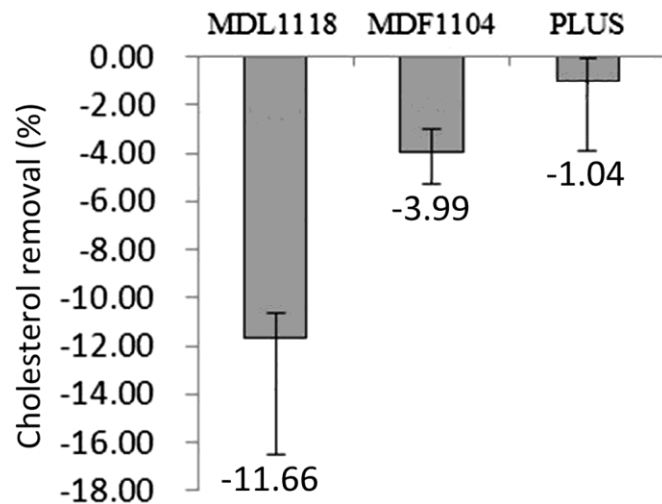
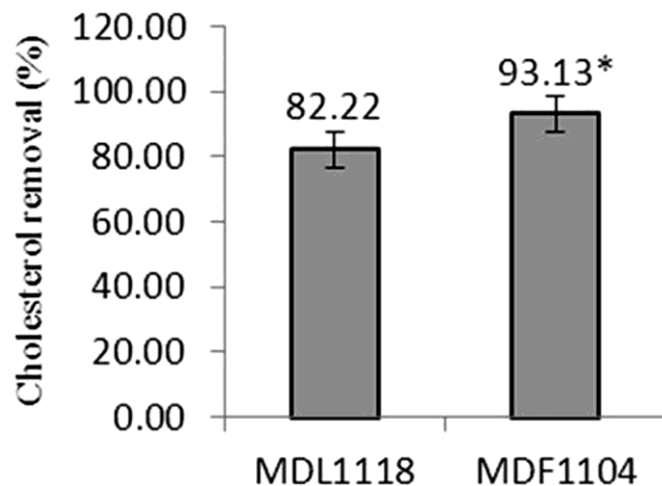


Fig. 5. Cholesterol removal by *Lactobacillus plantarum* MDL1118 and *Enterococcus faecium* MDF1104 in MRS broth supplemented with 0.2% sodium thioglycolate. The asterisk (*) indicates a significant difference between the 2 strains.



Effect of mink source LAB on total serum cholesterol levels in mice

None of the mice that were fed with the mink source LAB died during the experiments. Total serum cholesterol levels were different among the mice fed via gavage with *L. plantarum*, *E. faecium*, or the combination of the 2 (Fig. 6). The amount of cholesterol was lowest ($p < 0.01$) (0.90 mmol/L) when a combination of *L. plantarum* and *E. faecium* was used. There was no significant difference ($p > 0.05$) in the cholesterol content of the other groups, but a decreasing trend was found when *L. plantarum* (1.08 mmol/L) or *E. faecium* (1.13 mmol/L) were applied alone, as compared with the control (1.39 mmol/L). Therefore, a combination of *L. plantarum* and *E. faecium* was selected to supplement the mink diet to determine their effect on mink total serum cholesterol levels.

Effect of mink source LAB on total serum cholesterol and triglyceride levels in mink

The serum cholesterol level significantly decreased ($p = 0.0004$) in the high-dose group when compared with the control and other female mink groups (Fig. 7). The total serum cholesterol content

Fig. 6. Serum cholesterol levels in mice. CON, no addition of bacteria; *Lactobacillus plantarum* MDL1118, 1×10^9 CFU/mL; *Enterococcus faecium* MDF1104, 1×10^9 CFU/mL; PLUS, MDL1118+MDF1104, 1×10^9 CFU/mL.

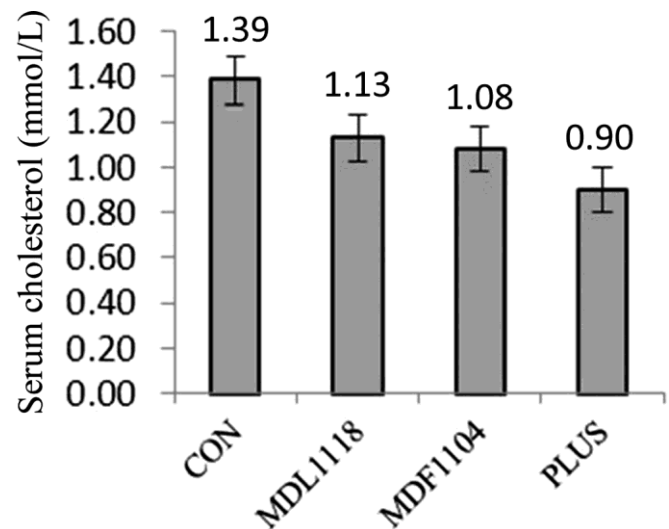
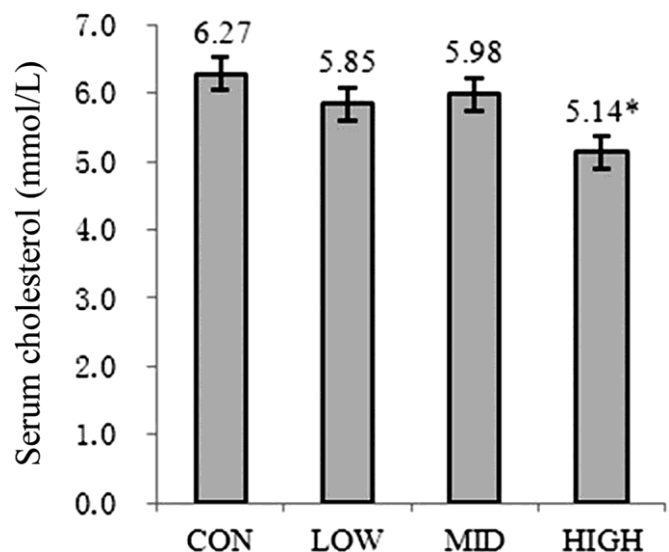


Fig. 7. Female mink total serum cholesterol levels after the addition of different quantities of *Lactobacillus plantarum* MDL1118 plus *Enterococcus faecium* MDF1104. CON, no supplement; LOW, 6×10^7 CFU/g; MID, 6×10^9 CFU/g; HIGH, 6×10^{10} CFU/g.



was decreased by 18.02%, 6.70%, and 4.63% in the high-, low-, and mid-dose groups, respectively. In male mink, the total serum cholesterol level in the high-dose group was similar ($p = 0.21$) to that of the control group and other groups (Fig. 8). The total serum cholesterol content was 6.49, 6.43, 5.94, and 5.81 mmol/L in the control, low-, mid-, and high-dose groups, respectively. There were no significant differences in serum triglycerides levels in either of the female (Fig. 9) ($p = 0.32$) or male mink groups (Fig. 10) ($p = 0.45$). Interestingly, the triglyceride levels in male mink were lower than that in female mink at the same LAB dose.

Discussion

Coronary heart disease, hypertension, and arteriosclerosis are major causes of mortality and morbidity in many countries (Pereira et al. 2003). Drug therapy for hypercholesterolemia is usually accompanied by undesirable side effects, and thus, there

Fig. 8. Male mink total serum cholesterol levels after the addition of different quantities of *Lactobacillus plantarum* MDL1118 plus *Enterococcus faecium* MDF1104. CON, no supplement; LOW, 6×10^7 CFU/g; MID, 6×10^9 CFU/g; HIGH, 6×10^{10} CFU/g.

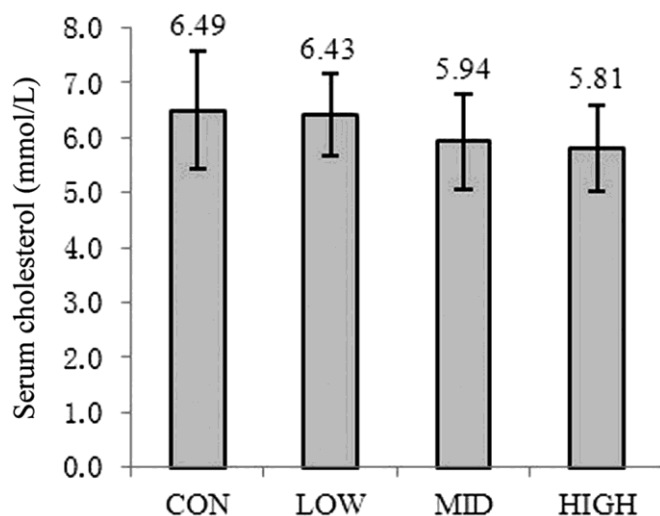
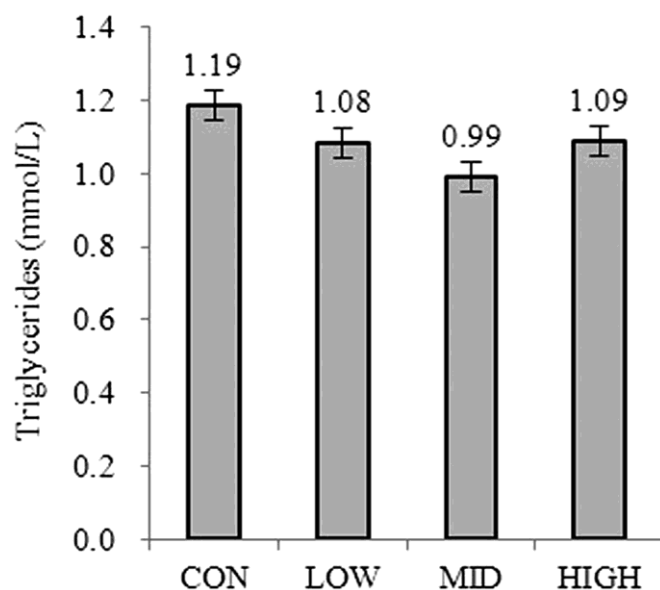


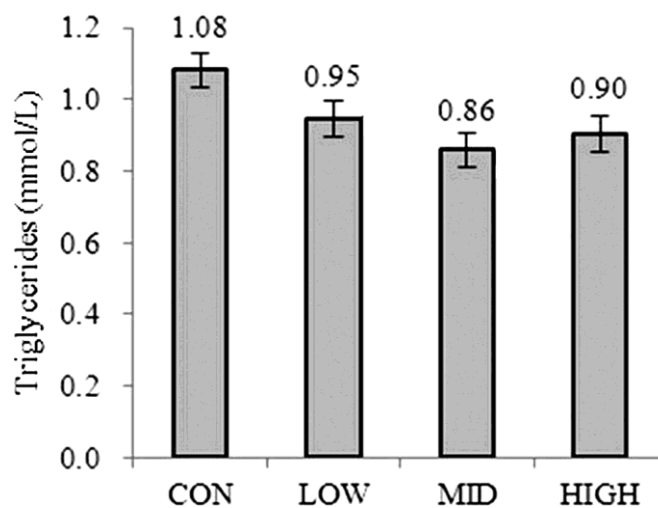
Fig. 9. Female mink triglycerides levels after the addition of different quantities of *Lactobacillus plantarum* MDL1118 plus *Enterococcus faecium* MDF1104. CON, no supplement; LOW, 6×10^7 CFU/g; MID, 6×10^9 CFU/g; HIGH, 6×10^{10} CFU/g.



is a need for more natural methods to decrease serum cholesterol levels in humans (Sridevi et al. 2009). Probiotic cultures of LAB have attracted much attention as potential cholesterol-lowering additives (de Roos and Katan 2000). The reduction of cholesterol levels with different LAB has been demonstrated in human, mice, pig, and broiler chicken studies (Haberer et al. 2003; Kawase et al. 2000; Kondo et al. 2010; Nguyen et al. 2007; Mansoub 2010). However, there is a lack of information on LAB isolated from mink.

Many reports have confirmed that LAB can remove cholesterol with bile salt present in vitro (Lye et al. 2010; Liong and Shah 2005; Philipp 2011); however, it is unknown whether LAB can remove cholesterol without bile salt. In this study, *L. plantarum* and *E. faecium* removed egg yolk and skimmed milk cholesterol from media without bile salt supplementation. Cholesterol removal

Fig. 10. Male mink triglyceride levels after the addition of different quantities of *Lactobacillus plantarum* MDL1118 plus *Enterococcus faecium* MDF1104. CON, no supplement; LOW, 6×10^7 CFU/g; MID, 6×10^9 CFU/g; HIGH, 6×10^{10} CFU/g.



was greatest between 0 and 8 h of incubation, which corresponded to their exponential growth phase. Very little cholesterol was removed after 8 h, as the strains passed into the stationary phase and their cholesterol removal capacity decreased. These results indicate that cholesterol removal is related to bacterial growth and that rapid cholesterol removal exists during the lag phase of growth. These findings are inconsistent with the study by Lin et al. (2007), which reported that maximum cholesterol removal occurred after 20 h of growth.

Cholesterol-lowering effects are also attributed to the ability of binding cholesterol, a process that is growth dependent and strain specific. During cell growth, the presence of cholesterol increases the concentration of saturated and unsaturated fatty acid, leading to increased membrane strength and higher cellular resistance toward lysis (Ooi and Liong 2010). However, synthetic cholesterol could not be removed in media free of bile salt. In other words, the presence of bile salts has a positive effect on cholesterol removal (Tok and Aslim 2010). In contrast, Lim et al. (2004) found that some LAB strains were able to reduce cholesterol in MRS broth without the presence of oxgall (bovine bile). These contradictory results further highlight that cholesterol removal appears to be strain specific.

Some studies have reported that LAB can remove cholesterol in vitro and in vivo (Lye et al. 2010; Liong and Shah 2005; Danielson et al. 1989; Gilliland et al. 1985). This study has confirmed these previous observations. However, our study also found significant differences in lowering cholesterol levels in vitro. *Lactobacillus plantarum* did not match its high-cholesterol-lowering effect in vivo. In addition, *E. faecium* MDF1104 removed more serum cholesterol than *L. plantarum* MDL1118 in vivo.

In this study, cholesterol was not removed without bile salt present in the broth. This was an unexpected result that requires further investigation. In contrast, the 2 strains showed excellent cholesterol-lowering characteristics in broth containing bile salt, and *E. faecium* was superior to *L. plantarum*, which was not the case for removal of yolk and skimmed milk natural cholesterol. Therefore, the presence of bile salt had a positive effect on cholesterol removal (Liong and Shah 2005).

This study indicated that LAB isolated from mink could decrease total serum cholesterol levels in mice, which is in agreement with the results from Nguyen et al. (2007). Their study showed that *L. plantarum* PHO4 lowered serum cholesterol isolated from infant feces. Also, it has been shown that feeding rats and

hamsters with lactobacilli or fermented milk is effective in reducing serum cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, and triglyceride levels (Xie et al. 2011; Tsai et al. 2009). In the present study, total serum cholesterol levels decreased more in female than in male mink. This is in contrast with the study by Kenneth et al. (1983) who reported that cholesterol levels were not significantly affected by sex hormones, such as estrogen and testosterone. However, the fact that skin sterol synthesis is higher in male animals (Kenneth et al. 1983) might explain why there are cholesterol level variations in male mink. Kondo et al. (2010) reported that mice fed with *Bifidobacterium breve* B-3 exhibited dose-dependent suppression of the accumulation of epididymal fat and an upregulation of genes related to fat metabolism and insulin sensitivity in the gut and epididymal fat tissue. In this study, although the reason is not presently clear, the cholesterol level was decreased more in female mink than in male mink following LAB treatment. This may be due to the presence of more LAB per unit of body mass. Serum triglycerides were also lowered as a result of the LAB treatment, suggesting that the hypolipemic effect of the bacteria may not have been due to a redistribution of lipids from the plasma but rather due to a decrease in intestinal absorption of lipids or increased lipid catabolism (Nguyen et al. 2007).

In conclusion, the results from the present study demonstrated a beneficial effect of *L. plantarum* MDL1118 and *E. faecium* MDF1104 strains in removing cholesterol from yolk, skimmed milk, and media during growth. Based on our findings, *L. plantarum* MDL1118, *E. faecium* MDF1104, and their combination may be promising candidates for use as probiotics.

Acknowledgements

This work was supported by a Young Researcher funded project (201101086), a Science and Technology development project (20090238), a Leading Talent and Creative Team project (20121810), and The Ministry of Agriculture Public Sector (Agriculture) Special Research Project (200903014). The paper was revised by Tzu-Ming Pan. The authors have no conflict of interest to declare.

References

Ai, M., Otokoza, S., Asztalos, B.F., Ito, Y., Nakajima, K., White, C.C., Cupples, L.A., Wilson, P.W., and Schaefer, E.J. 2010. Small dense LDL cholesterol and coronary heart disease: results from the Framingham Offspring Study. *Clin. Chem.* **56**: 967–976. doi:10.1373/clinchem.2009.137489. PMID: 20431054.

Anderson, J.W., and Gilliland, S.E. 1999. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J. Am. Coll. Nutr.* **18**: 43–50. doi:10.1080/07315724.1999.10718826. PMID:10067658.

Begley, M., Hill, C., and Gahan, C.G. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1729–1738. doi:10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006. PMID:16517616.

Boone, L.R., Lagor, W.R., Moya, M.D., Niesen, M.I., Rothblat, G.H., and Ness, G.C. 2011. Thyroid hormone enhances the ability of serum to accept cellular cholesterol via the ABCA1 transporter. *Atherosclerosis*, **218**: 77–82. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.028. PMID:21605865.

Chiang, S.S., and Pan, T.M. 2012. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**: 903–916. doi:10.1007/s00253-011-3753-x. PMID:22159887.

Danielson, A.D., Peo, E.R., Jr., Shahani, K.M., Lewis, A.J., Whalen, P.J., and Amer, M.A. 1989. Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J. Anim. Sci.* **67**: 966–974. PMID:2497098.

de Roos, N.M., and Katan, M.B. 2000. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 405–411. PMID:10648252.

De Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**(1): 130–135. doi:10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x.

Garrity, G.M., Bell, J.A., and Liburn, T.G. 2004. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 3, 2nd ed. New York.

Gilliland, S.E., Nelson, C.R., and Maxwell, C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 377–381. PMID:3920964.

Haberer, P., du Toit, M., Dicks, L.M.T., Ahrens, F., and Holzapfel, W.H. 2003. Effect of potentially probiotic lactobacilli on faecal enzyme activity in

minipigs on a high-fat, high-cholesterol diet — a preliminary in vivo trial. *Int. J. Food. Microbiol.* **87**: 287–291. doi:10.1016/S0168-1605(03)00076-X. PMID: 14527801.

Hu, J., La Vecchia, C., de Groh, M., Negri, E., Morrison, H., Mery, L., and Epidemiol, C.C.R. 2012. Dietary cholesterol intake and cancer. *Ann. Oncol.* **23**: 491–500. doi:10.1093/annonc/mdr155. PMID:21543628.

Hua, J., Liu, S.L., Ling, A., and Wang, Y. 2007. Study on characteristics of growth, screening and identification of cholesterol-reducing lactic acid bacteria. *China Dairy Industry.* **35**: 7–10.

Kawase, M., Hashimoto, H., Hosoda, M., Morita, H., and Hosono, A. 2000. Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J. Dairy Sci.* **83**: 255–263. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74872-7. PMID:10714858.

Kenneth, R.F., Macrae, G., Moser, A.H., Wu, J., Siperstein, M.D., and Wiley, M.H. 1983. Differences in de novo cholesterol synthesis between the intact male and female rat. *Endocrinology*, **112**: 96–103. doi:10.1210/endo-112-1-96. PMID: 6847837.

Kimoto, H., Ohmomo, S., and Okamoto, T. 2002. Cholesterol removal from media by lactococci. *J. Dairy Sci.* **85**: 3182–3188. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74406-8. PMID:12512591.

Kondo, S., Xiao, J.Z., Satoh, T., Odamak, T., Takahashi, S., Sugahara, H., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., Kamei, A., and Abe, K. 2010. Antiobesity effects of bifidobacterium breve strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 1656–1661. doi:10.1271/bbb.100267. PMID:20699581.

Lim, H.-J., Kim, S.-Y., and Lee, W.-K. 2004. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *J. Vet. Sci.* **5**(4): 391–395. PMID:15613825.

Lim, S.S., Vos, T., Flaxman, A.D., Danaei, G., Shibuya, K., Adair-Rohani, H., AlMazroa, M.A., et al. 2013. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*, **380**(9859): 2224–2260. doi:10.1016/S0140-6736(12)61766-8. PMID:23245609.

Lin, W.-H., Yu, B., Jang, S.-H., and Tsen, H.-Y. 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, **13**(3–4): 107–113. doi:10.1016/j.anaerobe.2007.04.006. PMID:17544731.

Liong, M.T., and Shah, N.P. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *J. Dairy Sci.* **88**(1): 55–66. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72662-X. PMID:15591367.

Lye, H.-S., Gulam Rusul, R.-A., and Liang, M.-T. 2010. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *Int. Dairy J.* **20**(3): 169–175. doi:10.1016/j.idairyj.2009.10.003.

Mansoub, N.H. 2010. Effect of probiotic bacteria utilization on serum cholesterol and triglycerides contents and performance of broiler chickens. *Global Veterinaria*, **5**: 184–186.

Nguyen, T.D.T., Kang, J.H., and Lee, M.S. 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int. J. Food Microbiol.* **113**: 358–361. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.015. PMID:17140690.

Noh, D.O., Kim, S.H., and Gilliland, S.E. 1997. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J. Dairy Sci.* **80**: 3107–3113. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76281-7. PMID:9436091.

Ooi, L.G., and Liang, M.T. 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *Int. J. Mol. Sci.* **11**: 2499–2522. doi:10.3390/ijms11062499. PMID:20640165.

Park, Y.H., Kim, J.G., Shin, Y.W., Kim, S.H., and Whang, K.Y. 2007. Effect of dietary inclusion of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**(4): 655–662. PMID:18051279.

Pereira, D.I.A., McCartney, A.L., and Gibson, G.R. 2003. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4743–4752. doi:10.1128/AEM.69.8.4743-4752.2003. PMID: 12902267.

Philipp, B. 2011. Bacterial degradation of bile salts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**: 903–915. doi:10.1007/s00253-010-2998-0. PMID:21088832.

Rudel, L.L., and Morris, M.D. 1973. Determination of cholesterol using *o*-phthalaldehyde. *J. Lipid Res.* **14**: 364–366. PMID:14580182.

Sanders, M.E. 2000. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutr.* **130**: 384S–390S. PMID:10721912.

Sirilun, S., Chaiyasut, C., Kantachote, D., and Luxananil, P. 2010. Characterisation of non human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering property. *Afr. J. Microbiol. Res.* **4**: 994–1000.

Sridevi, N., Vishwe, P., and Prabhune, A. 2009. Hypocholesteremic effect of bile salt hydrolase from *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005. *Food. Res. Int.* **42**: 516–520. doi:10.1016/j.foodres.2009.02.016.

Tok, E., and Aslim, B. 2010. Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiol. Immunol.* **54**: 257–264. doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00219.x. PMID:20536722.

Tsai, T.Y., Chu, L.H., Lee, C.L., and Pan, T.M. 2009. Atherosclerosis-preventing activity of lactic acid bacteria-fermented milk–soymilk supplemented

- with *Momordica charantia*. J. Agric. Food Chem. **57**: 2065–2071. doi:10.1021/jf802936c. PMID:19216552.
- World Health Organization (WHO). 2013. Cardiovascular diseases (CVDs). Fact Sheet No. 317. Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> [updated March 2013].
- Xie, N., Cui, Y., Yin, Y.-N., Zhao, X., Yang, J.-W., Wang, Z.-G., Fu, N., Tang, Y., Wang, X.-H., Liu, X.-W., Wang, C.-L., and Lu, F.-G. 2011. Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. BMC Complement. Altern. Med. **11**:53. doi:10.1186/1472-6882-11-53. PMID:21722398.
- Zeng, X.Q., Pan, D.D., and Guo, Y.X. 2010. The probiotic properties of *Lactobacillus buchneri* P2. J. Appl. Microbiol. **108**: 2059–2066. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04608.x. PMID:19912431.