



DEPARTEMENT DE SCIENCES ALIMENTAIRES

N° ...../SNV/2021

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M<sup>elle</sup> Dekkiche Samia & M<sup>elle</sup> Hamza Nouria

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES**

**Spécialité: NUTRITION ET PATHOLOGIE**

THÈME

**Caractérisation de la production de la vitamine  
B12 chez les bactéries probiotiques.**

Déposé le 04/07/2021

DEVANT LE JURY

Présidente	Mme Yahla I.	Maître de conférences B. Univ. Mosta.
Directrice de mémoire	Mme. Ziar H.	Maître de conférences A. Univ. Mosta.
Examinatrice	Mme Boudjelthia N.	Maître assistante A. Univ. Mosta.

## Résumé

Dans la présente étude, onze isolats bénéfiques d'origine de fèces de bébés nourris exclusivement au sein et sept d'autres d'origine lait maternel sont explorés sur le plan de leur productivité en vitamine B12. Dans cet objectif, la sécurité et leur activité antioxydante ont été estimées *in vitro* par mesure de l'activité de piégeage des radicaux libre DPPH et du pouvoir de réduction ferrique FRAP. Leur activité antimicrobienne vis-à-vis d'une sélection de souches pathogènes a été étudiée par la méthode des puits. Les résultats trouvés ont traduit des activités de piégeage des radicaux libres DPPH de nos isolats probiotiques de l'ordre de 16 à 32.1%. Toutefois, il y a une disparité dans ce pouvoir antioxydant entre les isolats d'origine lait humain et ceux de fèces de bébés. Par la méthode de FRAP, les données n'ont pas été changées, les activités antioxydantes étaient inférieures à 1 chez les souches lactiques SL3, SL7 et SL9 et de l'ordre de 1.34% chez l'isolat SL4 qui marque sa supériorité. Les souches intestinales marquaient des activités antioxydantes allant de 1.22-1.48% ; exceptées SS10 et SS11 dont les valeurs étaient inférieures à 1%. Les surnageants obtenus à partir des 11 isolats fécaux ont présenté des degrés variables d'activités inhibitrices. L'isolat d'origine fécale le plus intéressant était le SS8 où les diamètres d'inhibition calculés étaient tous supérieurs ou égales à 10 mm, excepté contre les deux pathogènes *S. aureus* et *Klebsiella pneumoniae* où des zones d'inhibition de diamètres de 8 à 9 mm ont été notées. Les surnageants obtenus à partir des sept isolats lactiques d'origine lait maternel ont aussi présenté des degrés variables d'activités inhibitrices et qui sembleraient plus intéressantes comparées à celles calculées pour les isolats bénéfiques fécaux. Tous les isolats étaient capables de sécréter la cobalamine. Cette productivité a été trouvée similaire aux deux longueurs d'onde  $\lambda=240$  et 245 nm. Il serait intéressant d'incorporer ces souches dans la composition d'aliments probiotiques afin de les enrichir *in situ* en vitamine B12.

**Mots clefs** : Isolat bénéfique, lait humain, fèces de bébés, activité antioxydante, activité antimicrobienne, cobalamine.

### Abstract

In the present study, eleven beneficial isolates from faeces of exclusively breastfed infants and seven more from human milk origins were explored for their vitamin B12 productivity. For this purpose, their safety and antioxidant activity were estimated *in vitro* by measuring the DPPH free radical scavenging activity and the FRAP iron reducing capacity. Their antimicrobial activity against selected pathogenic strains was studied by the sink method. The results found reflected DPPH free radical scavenging activities of our probiotic isolates in the range of 16 to 32.1%. However, there is a disparity in this antioxidant capacity between isolates from human milk and those from infant faeces. By the FRAP method, the data were not changed, the antioxidant activities were lower than 1 in the lactic strains SL3, SL7 and SL9 and about 1.34% in the SL4 isolate which marks its superiority. The intestinal strains showed antioxidant activities ranging from 1.22-1.48%; excepted SS10 and SS11 whose values were lower than 1%. Supernatants obtained from the 11 faecal isolates showed varying degrees of inhibitory activities. The most interesting faecal isolate was SS8 where the calculated inhibition diameters were all greater than or equal to 10 mm, excepted those against the two pathogens *S. aureus* and *Klebsiella pneumoniae* where the inhibition zones were 8 to 9 mm. The supernatants obtained from the seven lactic isolates of breast milk origin also showed varying degrees of inhibitory activity and would appear to be more interesting compared to those calculated for the beneficial faecal isolates. All isolates were able to secrete cobalamin. This productivity was found to be similar at both  $\lambda=240$  and 245 nm wavelengths. It would be interesting to incorporate these strains in the composition of probiotic foods in order to enrich them *in situ* with B12 vitamin.

**Keywords:** beneficial isolate, human milk, infant faeces, antioxidant activity, antimicrobial activity, cobalamin.

## **Dédicace....**

*Ce travail est dédié à*

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

*Que vous trouvez en moi la source de votre fierté, qu'Allah le tout puissant vous préserve, vous accorde santé et bonheur*

*A mes chères sœurs, Nawel, Fadila et Fatima pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.*

*A mes chers frères, Mourad et Abdelhadi, pour leur appui et leur encouragement.*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible.*

*Merci d'être toujours là pour moi.*

***Samia***

## **Dédicace....**

*Ce travail est dédié à*

*Mes parents, et je tiens à leur présenter mes reconnaissances et mes remerciements. Ils n'ont jamais cessé de me soutenir pour que je puisse finir mes études et avoir une bonne formation.*

*A mes chères sœurs, khadra, Alia et Fatima pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.*

*A mes chers frères, Arbi et Nesradin pour leur appui et leur encouragement.*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible.*

*J'adresse aussi mes dédicaces à mes amies Sabah et Noura.*

# ***Nouria***

# *Remerciements*

Nous tenons particulièrement à remercier notre encadreur, **Mme, ZIAR H**, maitre de conférences A, à l'université de Mostaganem, département -des sciences alimentaires- pour avoir acceptée la charge d'être rapporteur de ce mémoire, nous la remercions pour sa disponibilité, ses pertinents conseils, sa patience et pour les efforts qu'elle a consentis durant la réalisation de ce mémoire. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury d'avoir nous honoré en acceptant d'examiner ce travail..

Nous voudrions remercier **Madame Djahira HAMED**, pour son aide, sa disponibilité, son soutien et sa sympathie.

Ainsi qu'à tous nos proches amis qui nous ont toujours soutenues et encouragées même dans les périodes les plus difficiles.

*« Merci »*

## **Liste des abréviations**

**SS** : souche isolées de selles de bébés

**SL** : souche isolée du lait maternel

**KCN** : cyanure de potassium

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**FRAP** : the ferric reducing/ antioxidant potential

**TCA** : acide trichloracétique

**MH** : Mueller-Hinton

**B12** : vitamine B12

## Liste des tableaux et des figures

### 1- Liste des tableaux

N°	Titre	Page	Chapitre où se trouve
1	Histoire des probiotique-découvertes et faits marquants (Zommiti et al., 2020)	6	Chapitre I : les probiotiques : une source ininterrompue de bienfaits.
2	Micro-organismes probiotiques utilisés dans le domaine de la pharmacie et de la nutrition humaine (European food safety authority, 2017).	8	Chapitre I : les probiotiques : une source ininterrompue de bienfaits.
3	Enrichissement des aliments fermentés en vitamines par les bactéries lactiques (LeBlanc et al., 2016).	19	Chapitre II : production de vitamines du groupe B par les bactéries lactiques probiotiques.

### 2-Liste des figures

N°	Titre	Page	Chapitre où se trouve
1	Principaux intermédiaires de la synthèse biologique de la cobalamine. Les flèches avec des lignes incomplètes indiquent l'existence de plus de trois étapes enzymatiques impliquées dans l'obtention de l'intermédiaire (LeBlanc et al., 2016).	30	Chapitre II : production de vitamines du groupe B par les bactéries lactiques probiotiques.
2	Activité de piégeage des radicaux libres (%) par la méthode au DPPH observées chez les isolats probiotiques d'origines lait humain (A) et fécale (B), comparées à la souche de référence <i>L. reuteri</i> Protectis DSM	36	Chapitre IV : résultats et discussion



	17938 et à l'acide ascorbique testés aux concentrations de 10 et 100µg/mL.		
3	Activité de réduction ferrique (%) selon la méthode de FRAP exprimée chez les isolats probiotiques d'origine lait humain (A) et fécale (B), comparées à la souche de référence <i>L. reuteri</i> Protectis DSM 17938.	38	Chapitre IV : résultats et discussion
4	Activité inhibitrice des isolats bénéfiques à l'égard des principales souches pathogène exprimées par les isolats probiotiques d'origine fécale (A) et lait humain (B), comparées à la souche de référence <i>L. reuteri</i> protectis DSM 17938.	40	Chapitre IV : résultats et discussion
5	Productivité bactérienne en cobalamine (vitamine B12) telle que estimée par la méthode au cyanide de potassium chez les isolats bénéfiques d'origine fécales.	42	Chapitre IV : résultats et discussion
6	Productivité bactérienne en cobalamine (vitamine B12) telle que estimée par la méthode au cyanide de potassium chez les isolats bénéfiques d'origine lait humain.	45	Chapitre IV : résultat et discussion

# Table des matières

Résumé	
Abstract	
Remerciements	
Dédicaces	
Les listes des tableaux et des figures	
La liste des abréviations	
Table des matières	
<b>Introduction</b> ... ..	<b>1</b>

## **CHAPITRE I : LES PROBIOTIQUES : UNE SOURCE ININTERROMPUE DE BIENFAITS.**

I.1. Généralités .....	3
I.2. Les probiotiques : un peu d'histoire .....	3
I.3. Sources des souches de probiotiques .....	7
I.4. Critères de sélection et exigences pour les souches probiotiques.....	9
I.5. Mécanismes d'action des probiotique .....	11
I.6. Les bienfaits santé des probiotique .....	12
I.7. Soins de santé du tractus urogénital.....	13
I.8. Application des probiotique dans les soins de la peau et les cosmétiques.....	13
I.9. Activité angiogénique des probiotiques .....	14
I.10. Le microbiote intestinale humain.....	15
I.11. Les probiotiques : présentent-ils des avantages pour les personnes généralement en bonne santé ?.....	16
I.12. Défis actuels dans l'application des bactéries lactiques comme probiotiques.....	17
I.13. Sécurité des probiotiques.....	17
I.14. Réglementation de la sécurité des probiotiques dans le monde .....	19

## **CHAPITRE II : PRODUCTION DE VITAMINES DU GROUPE B PAR LES BACTERIES LACTIQUE PROBIOTIQUES.**

I.1. Généralités .....	18
II.2. Le groupe de vitamines B.....	20
II.2.1. Riboflavine (vitamine B2).....	21
II.2.2. Folate (vitamine B9).....	25
II.2.3. Vitamine B12 .....	27
II.2.3.1. Biosynthèse de la cobalamine par les lactobacillus.....	29

## **CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES.**

III.1. Matériel.....	31
III.1.1. Milieux de culture.....	31
III.1.2. Bactéries bénéfiques .....	31
III.1.3. Souches pathogènes.....	32
III.2. Méthodes.....	32
III.2.1. Activité anti-oxydante.....	33
III.2.2. Activité antimicrobienne.....	34
III.2.3. Production de vitamine B12.....	34

## **CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION.**

IV.1. Pouvoir antioxydant de nos isolats bénéfiques.....	35
IV.2. Action antimicrobienne des isolats probiotiques .....	38
IV.3. Estimation de la productivité bactérienne en vitamine B12.....	41
<b>Conclusion.....</b>	<b>43</b>

**Les références bibliographiques**

**Annexe**

# **Introduction**

## Introduction

Le nombre croissant de recherches et d'études sur les micro-organismes bénéfiques et leur impact sur la santé a suscité un grand intérêt au cours des dernières décennies. Depuis l'antiquité, des produits fermentés de base de différents types ont été utilisés comme produits probiotiques potentiels. Néanmoins, le regain d'intérêt actuel des consommateurs pour les alternatives biologiques a ouvert de nouveaux horizons pour le domaine des probiotiques.

De plus en plus de preuves démontrent une interaction entre le microbiote intestinal, l'intestin et le système nerveux central (SNC), connue sous le nom d'axe cerveau-intestin-microbiote. Ce lien entre le microbiote intestinal et le SNC suggère que leur modification pourrait avoir des applications dans le traitement des troubles neuropsychiatriques. Plusieurs études précliniques ont évalué si la manipulation du microbiote intestinal par l'ingestion de probiotiques pouvait affecter le comportement des animaux. Elles ont montré que les probiotiques peuvent être utilisés pour moduler les comportements liés aux troubles psychiatriques, notamment les comportements de type dépressif. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent la capacité de certaines bactéries à moduler le comportement de type dépressif restent à élucider.

La dépression est un trouble hétérogène dont l'évolution est très variable et, selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), elle devrait devenir le trouble le plus invalidant dans les 20 prochaines années. En outre, la comorbidité des troubles dépressifs et de l'anxiété est fréquente et les personnes affectées par les deux troubles simultanément ont montré une qualité de vie réduite et des résultats de traitement moins bons que les personnes souffrant d'un seul trouble. Actuellement, la plupart des traitements pharmacologiques de la dépression se concentrent sur le déficit en neurotransmetteurs dans les synapses monoaminergiques. Cependant, ces médicaments ont une action retardée et peuvent présenter des effets secondaires indésirables tels que maux de tête, nausées, agitation ou sédation. Par conséquent, la recherche de nouveaux agents thérapeutiques a été de plus en plus stimulée.

La carence en vitamine B12 peut provoquer différentes manifestations pathologiques qui affectent le système hématopoïétique, neurologique et cardiovasculaire. Dans l'anémie de Biermer, le facteur intrinsèque absent ; ce qui réduit ou stoppe l'absorption de la vitamine dans l'intestin grêle. **Molina et al. (2009)** ont trouvé que la supplémentation d'un régime sans B12 avec *L. reuteri* CRL1098 a été efficace pour prévenir les pathologies causées par la

carence nutritionnelle en vitamine B12 à la fois chez les souris gestantes et les jeunes souriceaux sevrés.

Par conséquent, l'objectif de cette étude était d'évaluer les caractéristiques probiotiques et l'activité antioxydante in vitro de certains isolats appartenant au genre de *Lactobacillus* sp., isolés de lait humain ou de selles de bébés. De plus, la sécurité et l'éventuelle activité antidépressive de ces isolats ont été estimées in vitro par quantification de leur productivité en vitamines B12 et leur activité antimicrobienne vis-à-vis d'une sélection de bactéries pathogènes.

# **Chapitre I : les probiotiques : une source ininterrompue de bienfaits.**

## **CHAPITRE I : Les probiotiques : Une source ininterrompue de bienfaits.**

### **I.1. Généralités**

Depuis l'antiquité, les micro-organismes ont représenté, et représentent toujours, une partie indispensable de l'alimentation humaine avec des niveaux élevés de leur consommation via des produits naturellement fermentés par des microbes avec des quantités massives de microbes bénéfiques viables, tels que les fruits fermentés, leurs jus, les produits animaux fermentés, et d'autres produits alimentaires d'origines diverses. Au cours de l'histoire, l'homme, inconsciemment et sans même avoir la moindre idée de l'existence du monde microbien, a utilisé des microbes afin d'initier de nombreux processus alimentaires. De nos jours, il existe un assortiment massif de produits alimentaires et de liquides fermentés qui représentent environ un tiers de l'alimentation humaine mondiale (**Borresen *et al.*, 2012**). La composition du microbiote intestinal humain joue un rôle clé dans l'homéostasie, l'équilibre, le maintien de la flore intestinale et la fonctionnalité. Ces deux concepts sont fortement influencés par plusieurs facteurs, dont le régime alimentaire, l'âge, les questions environnementales, les déséquilibres, les affections et les voies thérapeutiques. Récemment, **Gomez et Salminen (2016)** ont caractérisé les microbes bénéfiques, également appelés "probiotiques", comme des modulateurs efficaces de l'équilibre microbien intestinal (homéostasie). Le terme probiotique est défini de manière claire et distincte comme " des micro-organismes vivants qui confèrent un avantage pour la santé de l'hôte lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates " (**Hill *et al.*, 2014**). Cela semble être la définition conventionnelle la plus courante.

### **I.2. Les probiotiques : Un peu d'histoire**

"Ce ne peut être qu'une question de temps, nous obtiendrons des renseignements exacts sur l'influence des régimes alimentaires, qui empêchent la putréfaction intestinale, prolongent la vie et maintiennent les forces du corps". Les bactéries lactiques (BL), en particulier les microbes bénéfiques, sont appelées probiotiques, termes inventés par le lauréat du prix Nobel Elie Metchnikoff. Les aliments indigestes et les matières fécales dans l'intestin sont responsables de la production de toxines et raccourcissent la vie de l'homme", telle était l'hypothèse centrale proposée par Metchnikoff dans son chef-d'œuvre "La prolongation de la



vie", dans lequel il a élucidé et trouvé la corrélation entre la consommation régulière de lait fermenté à l'acide lactique par les Bulgares et les Caucasiens et leur état de santé avec une moyenne de vie élevée. Tissier en 1906 et Metchnikoff en 1907 ont été les premiers investigateurs à établir des propositions scientifiques concernant le potentiel probiotique des bactéries bénéfiques. Ils ont suggéré que la consommation de ces microbes par les patients souffrant de diarrhée pouvait restaurer une microflore intestinale saine. Lilly et Stilwell en 1965 ont été les pionniers du terme probiotique, décrivant des substances excrétées par un microbe pour stimuler la croissance d'un autre (**Gupta et Garg, 2009**).

Selon **Guarner et Schaafsma (1998)**, la définition la plus récente, mais certainement pas la dernière, du mot probiotique, qui a été affinée à plusieurs reprises, est "des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, confèrent un effet sur la santé de l'hôte", ce qui correspond à la définition la plus adéquate des probiotiques (**tableau 1**).

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques sur les probiotiques et leurs bienfaits pour la santé ont connu un essor considérable. Indépendamment de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine en tant que bonnes bactéries, les probiotiques ont montré un fort potentiel dans la pratique clinique. Il existe des preuves fiables que les microbes probiotiques peuvent entraver diverses affections et infections ou être utiles à leur santé, notamment en relation directe avec de nombreux troubles gastro-intestinaux, dans les deux cas, chez les enfants et les adultes (**Guarner et al., 2012**).

Au cours des dernières décennies, un grand nombre de travaux et d'études scientifiques ont mis en lumière le rôle crucial des microorganismes probiotiques et leur potentiel pour guérir diverses affections et troubles, en se basant sur les résultats prometteurs de la recherche sur les microorganismes probiotiques.

Les résultats de différentes études *in vitro* et *in vivo*, suggèrent un lien puissant entre ces soi-disant probiotiques et les réponses immuno-modulatrices humaines. C'est pourquoi la littérature a tenté de rendre compte du rôle crucial joué par les probiotiques et de leurs effets bénéfiques sur différents troubles immunitaires, notamment la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin (MII) et la dermatite atopique (**Kang, 2015**).

Parmi les autres allégations de santé notables, citons la réduction des symptômes de l'intolérance au lactose (**James et al., 2013**) ainsi que la régulation du microbiote intestinal (**Ockhuizen et al., 2014**) et l'amélioration de la digestion (**Bokhorst et al., 2015**), les

**Tableau 1** : Histoire des probiotiques - découvertes et faits marquants (Zommiti et al., 2020).

Période	Découvertes et faits marquant
1857–1864	Pasteur découvre les BL comme organismes d'altération
1878	La BL est isolée du lait par Lister
1889	Tissier a décrit <i>Bifidobacterium</i>
1907	Metchnikoff décrit le <i>Bacillus</i> bulgare associé à la santé
1900	<i>Bacillus acidophilus</i> décrit par Moro
1930	commercialisation du lait fermenté à base de Isolat de <i>Lactobacillus casei</i> par Shirota
1953	L'utilisation du terme "probiotika", qui désigne des composés actifs favorisant la santé. Définition des probiotiques par Lilly et Stillwell :
1965	"Microbes stimulant la croissance d'autres microorganismes"
P1989	Définition des probiotiques par Fuller : "Suppléments microbiens bénéfiques".
2001	FAO/OMS : Définition des probiotiques
2003	Genomique : Premier séquençage du génome du probiotique <i>Lactobacillus plantarum</i> .
2005	Relman et l'utilisation du séquençage à haut débit de l'amplicon 16S pour cataloguer le microbiome intestinal
2016	Les lignes directrices de la FDA/CBER pour les biothérapies vivantes

FAO : Organisation pour l'alimentation et l'agriculture ; OMS : Organisation mondiale de la santé ; FDA : Food and Drug Administration ; CBER : Center for Biologics Evaluation and Research.

antihypertenseurs (**Duarte et al., 2015**), la régulation du système immunitaire de l'hôte (**Kapila et al., 2014**), les antiallergiques (**Eom et al., 2014**), le potentiel préventif du cancer du sein (**Chatzigiagkos et al., 2014**), l'eczéma chez les enfants (**bergin et al., 2014**), la réduction de la colite ulcéreuse active (**Mardini et Grigorian, 2014**), l'anti-obésité (**Aazmi et al., 2015**), une forte diminution du taux de lésions pulmonaires associées aux virus (**Alvarez et al., 2014**) et l'entérocolite nécrosante chez les nouveau-nés (**Parker, 2014**). De plus, la régulation de plusieurs troubles dépressifs et anxieux a été rapportée (**Mayer et al., 2015**).

### **I.3. Sources des souches de probiotiques**

Les principales sources peuvent émaner d'origines humaines comme le gros intestin, l'intestin grêle ou encore le lait maternel. Elles peuvent également être d'origine animale, de divers biotopes alimentaires comme le lait cru ou les produits alimentaires fermentés. Les souches probiotiques isolées de la microflore humaine sont bien caractérisées par des niveaux d'adhésion plus élevés à la barrière épithéliale intestinale humaine que les autres et plus susceptibles d'être sûres. Néanmoins, plusieurs aliments et compléments alimentaires probiotiques peuvent contenir différentes bactéries et microbes sans antécédents d'utilisation sûre chez l'homme ou chez d'autres animaux.

Les souches bactériennes utilisées dans les compléments et les aliments probiotiques devraient jouer un rôle central dans : La réduction du cholestérol et son métabolisme, la colonisation dans les voies intestinales, respiratoires et urogénitales, l'inhibition de la carcinogénèse, directement ou/et indirectement, via la stimulation du système immunitaire, le métabolisme du lactose, l'absorption du calcium et le potentiel de synthèse des vitamines, le potentiel réducteur des levures et des infections vaginales, l'atténuation du taux de constipation et des troubles diarrhéiques, l'atténuation des gastrites et des ulcères, l'aide à la réduction de l'acné, des éruptions cutanées et des problèmes de peau, et la production d'antimicrobiens naturels. **Le tableau 2** présente un synopsis des micro-organismes probiotiques que l'on peut trouver dans les produits pharmaceutiques et nutritionnels destinés aux humains.

**Tableau 2** : Micro-organismes probiotiques utilisés dans le domaine de la pharmacie et de la nutrition humaine (European food safety authority, 2017).

Micro-organismes	En tant que produits pharmaceutiques	Additifs alimentaires	Présomption qualifiée de sécurité des micro-organismes
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+		+
<i>Lactobacillus amylovorus</i>		+	+
<i>Lactobacillus casei</i>	+	+	+
<i>Lactobacillus gasseri</i>	+		+
<i>Lactobacillus helveticus</i>	+		+
<i>Lactobacillus Johnsonii</i>		+	+
<i>Lactobacillus pentoses</i>		+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>		+	+
<i>Lactobacillus reuteri</i>	+		+
<i>Lactobacillus rhamnus</i>	+	+	+
<i>Bifidobacterium adolescents</i>	+		
<i>Bifidobacterium animalis</i>	+		+
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	+		
<i>Bifidobacterium breve</i>		+	

<i>Bifidobacterium infantis</i>	+		
<i>Bifidobacterium longum</i>	+		+
<i>Enterococcus faecium</i>	+		
<i>Lactococcus lactis</i>		+	+
<i>Streptococcus thermophilus</i>	+		+
<i>Bacillus clausii</i>	+		+
<i>Escherichia coli</i> <i>Nissle 1917</i>	+		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>(boulardii)</i>	+		+

+ : utilisé comme.

#### I.4. Critères de sélection et exigences pour les souches probiotiques

La sécurité, la fonctionnalité et l'utilité technologique représentent les critères cruciaux pour la sélection des microbes probiotiques. Cette sélection drastique a été mise en place selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la Food and Drug Organization (FAO) et l'EFSA (l'Autorité européenne de sécurité des aliments). Hill et ses collègues 5 (**Hill et al., 2014**) ont révélé que le potentiel probiotique est directement lié à des souches particulières, et non au genre ou à l'espèce d'un microorganisme. Des expériences in vitro permettent de vérifier si les souches microbiennes remplissent les critères susmentionnés. Sur la base de ces critères de sélection validés par des expériences in vitro, il est possible de cribler les microbes sur leur potentiel en tant que souches probiotiques. D'autres tests et la validation de ces souches microbiennes peuvent être précédés d'essais sur des animaux et des humains. En ce qui concerne l'innocuité d'une souche bactérienne, son origine, son profil de résistance aux antibiotiques et l'absence totale de déterminants de virulence associés aux cultures pathogènes

constituent la base principale du profil d'innocuité. Quant aux aspects fonctionnels, la viabilité représente une condition préalable à la fonctionnalité des probiotiques - elle renforce plusieurs mécanismes, y compris l'adhérence aux cellules épithéliales, la réduction de la perméabilité de la muqueuse intestinale, les effets immuno-modulateurs, ce qui représente un défi industriel **(Kosin et Rakshit, 2006)**.

**Lee (2009)** a montré que les souches probiotiques doivent répondre aux exigences, directement liées à la technologie de leur fabrication, reflétant leur capacité à survivre et à maintenir leurs propriétés et leur potentiel biotechnologiques tout au long des processus de stockage et de distribution. Cependant, la valeur de ces facteurs est toujours en profond conflit car il existe différentes questions de signification, des incohérences *in vitro* et *in vivo*, et un manque de normalisation des procédures opérationnelles. Comme il y a une absence évidente de normes communes pour l'ensemble des applications des probiotiques, l'approche la plus pertinente pour établir les propriétés d'une souche microbienne est de cibler des populations, en particulier, des fonctions physiologiques spécifiques par le biais d'investigations aiguës. En ce qui concerne le produit final, les niveaux de dose de probiotiques doivent être basés sur ceux qui se sont avérés efficaces dans les essais cliniques chez l'homme, et les unités formatrices de colonies par gramme (UFC/g) de produit sont un facteur crucial. Outre le manque de données sur les valeurs minimales efficaces, il est généralement admis que les produits probiotiques doivent avoir une concentration minimale de  $10^6$  UFC par millilitre ou par gramme et qu'une quantité totale de  $10^8$  à  $10^9$  microbes probiotiques doit être consommée chaque jour pour que les avantages des probiotiques soient transférés au consommateur **(Bassoulis et al., 2013)**

### **I.5. Mécanisme d'action des probiotiques**

Au cours des deux dernières décennies, les recherches sur les microorganismes probiotiques n'ont cessé de progresser, notamment en ce qui concerne les critères de sélection et les caractéristiques des cultures probiotiques, leur utilisation potentielle et leur impact direct et/ou indirect sur l'amélioration de la santé humaine. À l'intérieur d'un organisme humain, les probiotiques sont responsables du développement de la microflore résidant dans le tractus gastro-intestinal (TGI) afin d'assurer un équilibre microbien approprié entre les pathogènes et les bonnes bactéries, également appelé homéostasie **(Oelschlaeger et al., 2010)** Ces microbes bénéfiques, grâce à cet équilibre, pourraient rétablir le microbiote naturel après une antibiothérapie **(Johnston et al., 2006)**. Un autre rôle étonnant joué par les probiotiques est de contrecarrer l'activité du microbiote intestinal pathogène. Ainsi, les probiotiques ont un

potentiel important dans l'inhibition de la croissance de pathogènes robustes comprenant *Clostridium perfringens* (dal Bello *et al.*, 2013), *Campylobacter jejuni* (Amelot *et al.*, 2017), *Salmonella Enteritidis* (Adams *et al.*, 2017), *Escherichia coli* (Chingwaru *et Vidmar*, 2017), diverses espèces de *Shigella* (Hussain *et al.*, 2017), *Staphylococcus* (Sikorski *et Smoragiewicz*, 2013), *Yersinia* (bergillos-meca *et al.*, 2015), *Campylobacter coli* (Ben hamida *et al.*, 2017) et *Listeria* sp. (Barreau *et al.*, 2018), prévenant ainsi les intoxications alimentaires.

En outre, des recherches moléculaires, bio-ingénierie et génétiques à grande échelle ont permis d'élucider le concept de base de l'effet bénéfique des bonnes bactéries appelées "probiotiques" avec l'implication directe de quatre mécanismes :

- L'antagonisme microbien par l'intermédiaire de composés antimicrobiens (Vandenbergh, 1993);
- La concurrence avec les bactéries pathogènes pour l'adhésion à l'épithélium et pour les nutriments (Guillot, 2003).
- Immuno-modulation de l'hôte (Arvilommi *et al.*, 2001)
- Inhibition de la production de toxines bactériennes (Amaral *et al.*, 1998).

## I.6. Les bienfaits santé des probiotiques

Il existe une large association entre le microbiome et l'état de santé de l'homme, sans toutefois que la causalité soit revendiquée. Cremon *et al.* (2018) ont signalé que la modification globale du microbiome, la dysbiose ou la diversité réduite des communautés microbiennes sont étroitement liées et/ou prédisposent les individus à des affections et des symptômes chroniques englobant les maladies inflammatoires de l'intestin, le syndrome du côlon irritable, le cancer, l'allergie, l'asthme, le diabète, l'obésité, les maladies cardiovasculaires, les troubles neurologiques et mentaux, et les déséquilibres gastro-intestinaux - principalement causés par la génétique de l'hôte et des facteurs environnementaux tels que le mode d'accouchement du nouveau-né, l'historique de l'allaitement, le régime alimentaire, les infections, l'utilisation d'antibiotiques et d'autres médicaments (Castellanocastillo *et al.*, 2018).

Ces microbes bénéfiques ont été signalés pour restaurer la microflore du tube digestif et fournir un large éventail d'avantages pour la santé. Les bactéries probiotiques ont été considérées comme des usines cellulaires microbiennes de diverses vitamines, notamment les vitamines du groupe B, dont la biotine, la cobalamine, l'acide pantothénique, la pyridoxine,

l'acide nicotinique, la thiamine, la riboflavine et le folate, et la vitamine K, afin de nourrir l'hôte (**Rowland et al., 2018**). Dans le même ordre d'idées, ces microbes ont été associés à une meilleure biodisponibilité et bioconversion des nutriments, à une diminution du cholestérol sanguin, à un soulagement des symptômes de malabsorption du lactose et à une réduction de l'incidence des maladies cardiovasculaires, de l'obésité, du diabète sucré de type II, ainsi qu'à la production de substances anticancéreuses et antimutagènes (**Lebeer et al. 2018**). Cependant, la production de composés bioactifs, immunologiques, anticancéreux et fonctionnels est rarement caractérisée comme spécifique à la souche (**Hill et al., 2014**).

### **I.7. Soins de santé du tractus urogénital**

Selon les Centers for Disease Control and Prevention (CDCP), plus d'un milliard de femmes dans le monde souffrent d'infections urogénitales non sexuellement transmissibles, telles que la vaginose bactérienne (VB), l'infection des voies urinaires (IVU) et diverses autres infections à levures (**waigankar et Patel, 2011**). Une étude pilote (**Hanson et al., 2016**) a montré que les espèces les plus fréquemment rencontrées en association directe avec la VB sont *Gardnerella vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, et *Mycoplasma hominis*

Les maladies sexuellement transmissibles (MST), récemment appelées infections sexuellement transmissibles (IST), sont également une cause importante de morbidité dans le monde. Les deux MST bactériennes les plus fréquemment documentées dans certains pays développés sont la gonorrhée et la chlamydia, causées respectivement par *Neisseria gonorrhoeae* et *Chlamydia trachomatis* (**Chan et al., 2016**).

Il est pertinent de savoir qu'il existe une association étroite entre la dysbiose de la flore microbienne vaginale et une incidence accrue d'infection des voies urinaires (IVU). Il existe environ 50 espèces différentes résidant dans le vagin, comme les espèces de *Lactobacillus* englobant *L. vaginalis*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. reuteri* et *L. rhamnosus* qui sont considérés comme les principaux commandants et régulateurs du microenvironnement vaginal. Toute forme de dysbiose en termes de composition microbienne vaginale influence grandement la santé du microenvironnement vaginal, conduisant potentiellement à un état compromis de vaginose bactérienne et d'infection des voies urinaires. Il est possible de remédier à ces états compromis en équilibrant le nombre de *Lactobacillus* sp. (**Chan et al., 2016**).



## I.8. Application des probiotiques dans les soins de la peau et les cosmétiques

Selon **Huang et Tang (2015)**, les cosmétiques sont définis comme des substances ou des produits destinés à être frottés, versés, aspergés ou pulvérisés sur le corps humain ou toute partie de celui-ci, ou à y être introduits ou appliqués de toute autre manière, pour le nettoyer, l'embellir, le rendre plus attrayant ou en modifier l'apparence. L'utilisation de probiotiques dans des applications cosmétiques a été proposée. Quelques essais scientifiques *in vitro* et sur des animaux en relation directe avec les applications cosmétiques potentielles des probiotiques ont été réalisés. **Byrd et al. (2018)** ont rapporté les genres suivants *Staphylococcus* spp. (*St. epidermis*), *Propionibacterium* spp. (*P. acnes*, *P. granulosum* et *P. avidum*) et *Corynebacterium* spp. (*C. simulans*, *C. tuberculostearium*, *C. tenuis*, *C. jeikeium* et *C. xerosis*), comme les principaux genres bactériens du microbiome de la peau humaine. *Staphylococcus aureus*, parmi une large collection de pathogènes cutanés robustes, est responsable de plusieurs infections cutanées, englobant les abcès sous-cutanés, les furoncles, l'impétigo, les ulcères cutanés, et plusieurs infections systémiques lorsqu'il atteint la circulation sanguine (**Pozzi et al., 2016**).

**Cinque et al., (2017)** ont constaté que le composant bactérien bioactif des formules cosmétiques, *Streptococcus salivarium* spp. *thermophilus* S244, est capable de produire des enzymes qui réduisent de manière significative la sécheresse de la peau, la perte de tonus et d'eau, ralentissant ainsi le processus de vieillissement cutané. De plus, les polyphénols et les antioxydants des fruits et des légumes, en tant que composition prébiotique, jouent un rôle clé dans les mécanismes de soin, de protection et de lutte contre le vieillissement de la peau, en fournissant des effets synergiques aux probiotiques (**Know et al., 2019**).

## I.9. Activité angiogénique des probiotiques

Selon **Folkman et Angiogenesis (2006)**, l'angiogénèse représente un phénomène crucial et essentiel pour le processus de cicatrisation des plaies grâce à des réponses cellulaires délimitées pour régénérer les tissus endommagés. Le système angiogénique consiste en une série délibérément orchestrée d'événements cellulaires par lesquels de nouveaux vaisseaux naissent à partir de vaisseaux préexistants en favorisant le recrutement de cellules inflammatoires et en produisant des cytokines, des enzymes de dégradation de la matrice et des chimiokines. L'angiogénèse dérégulée a un impact important sur les principales maladies

humaines, notamment le cancer, la rétinopathie diabétique et les maladies du côlon irritable (MCI), y compris la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse (CU) (**Chen *et al.*, 2013**).

On a annoncé que *Saccharomyces boulardii*, une levure probiotique non pathogène, avait des effets protecteurs sur la santé.

Les mécanismes moléculaires par lesquels les probiotiques interviennent dans ces bienfaits sont de toute façon si complexes et restent flous. Le mode d'action potentiel des probiotiques dans le processus d'angiogenèse peut inclure la modification des profils de cytokines inflammatoires, la régulation négative des cascades pro-inflammatoires ou l'induction de mécanismes de régulation également connus sous le nom de circuit de rétroaction.

### **I.10. Le microbiote intestinal humain : "un second cerveau"**

Le monde microbien est capable de coloniser chaque centimètre carré de la surface du corps humain directement exposé à l'environnement, la plupart des communautés microbiennes résidant dans le tractus gastro-intestinal (TGI). Le tube digestif humain est l'un des écosystèmes les plus complexes connus. Il abrite l'une des niches biologiques les plus diverses et les plus riches de la planète, colonisée par plus de 100 trillions ( $10^{14}$ ) de micro-organismes. Ce nombre considérable est imposant en comparaison avec l'ensemble des cellules humaines d'un seul individu, qui compte environ 10 trillions ( $10^{13}$ ) de cellules. L'intestin humain contient une communauté microbienne diverse et complexe, qui joue un rôle crucial dans la santé humaine. La microflore intestinale humaine contient une quantité estimée à 1,5 kg de microbes. Cette masse de bactéries est appelée microbiote et, à l'âge adulte, elle est stable en termes de genres mais varie en termes d'espèces selon les individus. Une forte corrélation a été observée entre la composition bactérienne et sa distribution avec les besoins en nutriments (**Matamoros *et al.*, 2013**). De nombreux essais et recherches ont étudié la composition du microbiote intestinal humain (**Lagier *et al.*, 2016**). Il a été démontré qu'il est composé d'une étonnante diversité microbienne avec plus d'un millier d'espèces microbiennes symbiotiques et/ou commensales parmi lesquelles on trouve des archées, des bactéries, des virus (y compris des bactériophages), même des eucaryotes unicellulaires, y compris des espèces fongiques et d'autres communautés microbiennes comprenant des espèces microbiennes non archaïques et non bactériennes.

L'évolution et les progrès constants des techniques moléculaires et de la métagénomique, en particulier le séquençage génomique, ont montré que le microbiote collectif du tractus

gastro-intestinal humain adulte est composé de 1 000 à 1 150 espèces bactériennes, soit 10 fois ou plus que le nombre total de cellules hôtes (**Velasquez, 2015**).

Il existe un lien étroit entre la microflore intestinale et son potentiel génomique dans la préservation du bien-être général de l'homme (**Cho et blaser, 2012**), et son rôle dans le maintien de fonctions corporelles très particulières, notamment le développement du système immunitaire (**Chung et al., 2012**), les affections neurodéveloppementales (**Hsian et al., 2013**) et le métabolisme des xénobiotiques (**Maurice et al., 2013**).

### **I.11. Les probiotiques : présentent-ils des avantages pour les personnes généralement en bonne santé ?**

Des études sur les effets des probiotiques ont été réalisées sur des sujets sains ou vulnérables ; également connus sous le nom de sujets "à risque", en ciblant divers paramètres cliniques. Prises conjointement, ces études expérimentales avancent qu'il pourrait y avoir un certain bénéfice chez les personnes vivant librement et généralement en bonne santé. Par exemple, des études expérimentales ont montré que les bactéries probiotiques peuvent réduire modestement l'incidence (**Hao et al., 2015**) et la durée (**King et al., 2014**) des infections courantes des voies respiratoires supérieures chez les enfants. Selon **Wang et al. (2018)**, il existe des preuves que certains probiotiques peuvent aider à gérer les lipides sanguins chez les personnes souffrant d'un trouble léger de l'alimentation : l'hypercholestérolémie. De même, **Oak et Jha (2018)** ont montré que les microbes bénéfiques sont capables d'améliorer la digestion du lactose chez les personnes intolérantes au lactose, avec des preuves solides montrant que le lactose consommé dans un yaourt avec des cultures vivantes est mieux toléré que la même quantité de lactose consommée sans cultures vivantes. Dans ce domaine, une excellente revue systématique a été rédigée afin d'évaluer le rôle des probiotiques dans la gestion des symptômes gastro-intestinaux inférieurs (**Hungin et al., 2018**).

### **I.12. Défis actuels dans l'application des bactéries lactiques comme probiotiques**

L'application des LB probiotiques a été mitigée par certains défis à relever. Malgré l'étonnante vague de bienfaits des microbes probiotiques, ces revendications ne peuvent être affirmées que si un nombre élevé de cellules viables atteint l'intestin grêle. Diverses bactéries probiotiques se sont révélées vulnérables et incapables de résister à une exposition à long terme à un pH faible après fermentation et/ou à l'oxygène pendant la réfrigération, la distribution et le stockage des produits, ainsi qu'aux conditions acides de l'estomac humain

(**kailasapathy et Chin, 2000**). Dans le même ordre d'idées, il est pertinent de savoir que la viabilité et la survie des bactéries probiotiques sont des critères spécifiques à chaque souche. Ainsi, les techniques de microencapsulation telles que l'évaporation de solvant ont été appliquées avec succès pour protéger les cellules bactériennes des dommages physico-chimiques causés par des facteurs environnementaux biotiques et abiotiques. Lors d'une étude préliminaire sur la microencapsulation, **Ziar et al. (2014)** ont signalé que l'on obtenait davantage de cellules viables de *B. animalis* que de cellules de *L. rhamnosus*.

Il comprend également le maintien des probiotiques, la diversité et l'origine des microbes bénéfiques, la survie des probiotiques et leur état actif, le traitement de la microflore endogène, les facteurs intrinsèques et la preuve des avantages pour la santé.

### **I.13. Sécurité des probiotiques**

Selon **Anadón et al. (2014)**, l'évaluation de la sécurité des probiotiques représente une tâche délicate. En général, les micro-organismes probiotiques se distinguent par leur aspect sécuritaire, avec le statut GRAS (Generally Regarded as Safe) de l'Organisation mondiale de la santé (OMS). L'innocuité pour la santé humaine correspond au déterminant essentiel de la sélection des probiotiques. Selon **Snydman (2008)**, les souches probiotiques doivent être caractérisées par l'absence de leur profil virulent et leur faible résistance aux antibiotiques. Ces microbes bénéfiques ont un bon bilan de sécurité au cours de l'histoire, principalement lié à l'utilisation de souches de *Lactobacilles* et de *Bifidobactéries* (**Chanahan, 2012**). L'expérience et les essais sur le terrain avec d'autres espèces microbiennes utilisées comme probiotiques sont plus limités. D'un point de vue standard de la susceptibilité de l'hôte, le risque zéro n'existe pas. Les critères de sélection de nouveaux micro-organismes probiotiques potentiels visent de nouvelles souches bactériennes et même de nouveaux genres ayant un potentiel bénéfique plus élevé et/ou des propriétés plus particulières, ce qui n'est pas une tâche facile. L'introduction de nouveaux microbes nécessite des études approfondies et une évaluation de leur sécurité et du rapport risque-bénéfice. Les nouvelles bactéries probiotiques doivent appartenir à des genres et à des souches que l'on trouve couramment dans le microbiote intestinal humain sain, et il faut faire attention aux bactéries appartenant au genre *Bacillus* ou *Enterococcus*, dans lesquels des pathogènes ou des agents pathogènes opportunistes ont également été décrits (**Hanchi et al., 2018**).

La majorité des probiotiques sont sûrs. Néanmoins, des effets indésirables ont été sporadiquement rapportés, et il convient de faire attention aux effets secondaires potentiels.

En fait, plusieurs cas d'effets secondaires ont été signalés, comme de rares incidents de septicémie, d'endocardite et d'abcès du foie pendant l'utilisation de *Lactobacillus*. De plus, des cas de fongémie ont été rapportés avec l'utilisation de *Saccharomyces boulardii*, principalement chez des patients présentant des comorbidités sévères (Cremon *et al.*, 2018). La constipation, les flatulences, les nausées, le hoquet, les infections et les éruptions cutanées représentent les inconvénients les plus courants de l'utilisation des probiotiques. Besselink et ses collaborateurs (Cenit *et al.*, 2015) ont rapporté que la consommation de probiotiques par les sujets atteints de pancréatite aiguë n'a aucun effet sur les complications infectieuses et augmente au contraire le taux de mortalité. Plusieurs bactériémies à *Lactobacilli* ont également été rapportées (Lange *et al.*, 2016). L'administration de probiotiques pendant la grossesse et la petite enfance est considérée comme sûre et sans effets secondaires. D'un point de vue standard de l'infection systémique. La compréhension du public de l'idée de risque et de risque/bénéfice semble faible et médiocre. L'incertitude concernant la capacité de transfert de la résistance aux antibiotiques avec les probiotiques est un problème actuel auquel il faut penser, bien que le risque semble être faible avec les produits probiotiques actuellement disponibles sur les marchés. Par rapport aux autres formes d'agents thérapeutiques, les probiotiques et leur biosécurité doivent être évalués souche par souche.

En résumé, le monde des probiotiques ne cesse de croître, non seulement par le nombre croissant de personnes qui utilisent des probiotiques mais aussi par la variété des produits probiotiques et des nouvelles souches probiotiques. Les enquêtes et les études scientifiques futures doivent fournir une description plus détaillée des microbes probiotiques testés, comprenant le genre, l'espèce et la souche, ainsi que la dose quotidienne et la durée du traitement (Collins *et al.*, 2017).

#### **I.14. Réglementation de la sécurité des probiotiques dans le monde**

L'essor de l'utilisation des probiotiques dans le monde s'est accompagné de l'absence d'une norme universelle pour l'évaluation de la sécurité et la réglementation, ce qui reflète une grande variation d'un pays à l'autre ou d'une région à l'autre (Kaprasob *et al.*, 2018). Dans le monde entier, et à l'inverse des médicaments commerciaux, les probiotiques sont principalement classés comme des aliments et/ou des compléments alimentaires aux États-Unis d'Amérique et en Europe, comme des produits de santé naturels au Canada, et comme des aliments à usage sanitaire spécifique au Japon. Cette catégorisation répond à des réglementations nettement moins drastiques (Rowland *et al.*, 2018). Par exemple, aux États-Unis d'Amérique (U.S.A.), le statut GRAS (Generally Recognized as Safe) représente un

critère important pour la sécurité des bactéries. Il s'agit d'une classification fournie par la Food and Drug Administration (FDA) et ces produits ne sont pas soumis à une surveillance drastique.

L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), au sein de l'Union européenne, a suggéré une introduction sur le statut QPS (Qualified Presumption of Safety) qui pourrait être applicable à certains groupes de microbes bénéfiques pour la consommation humaine directe (**Lebeer et al., 2018**). Le statut QPS est basé sur la taxonomie, la caractérisation, la pathogénicité et les données statistiques finales pour la conformité afin de qualifier un probiotique. En outre, l'agence EFSA est la première responsable de l'évaluation de l'allégation de santé des probiotiques sur les aliments présentée par divers fabricants. Par exemple, le ministère italien de la santé contrôle l'utilisation des bactéries probiotiques dans les produits alimentaires et a fixé le nombre minimum autorisé de cellules viables dans les aliments par portion à  $1 \times 10^9$  UFC par jour.

En Chine, l'Administration nationale chinoise des aliments et des médicaments (SFDA) réglemente et supervise les aliments fonctionnels et les nutraceutiques (**Azad et al., 2018**). Les probiotiques, parmi les produits alimentaires fonctionnels, occupent une part de marché importante en Chine, fortement influencée par la culture et les habitudes alimentaires traditionnelles ainsi que par la croissance économique.

Au Japon, les probiotiques sont réglementés par l'agence Food for Specific Health Use (FOSHU), qui autorise l'étiquetage avec des allégations de santé sur les aliments ou les ingrédients qui répondent aux preuves scientifiques requises pour la sécurité et l'efficacité (**Lopez Malo et al., 2014**). Les produits FOSHU sont approuvés par le ministre japonais de la santé, du travail et du bien-être.

# **Chapitre II : Production de vitamines du groupe B par les bactéries lactiques probiotiques.**

## **CHAPITRE II : Production de vitamines du groupe B par les bactéries lactiques probiotiques.**

### **II.1. Généralités**

En plus de leurs propriétés bénéfiques intrinsèques, certaines souches de bactéries lactiques (BL) ont la capacité de produire/libérer et/ou augmenter des composés bénéfiques spécifiques dans les aliments. Ces ingrédients fonctionnels sont parfois appelés nutraceutiques, un terme qui a été inventé en 1989 pour décrire "un aliment (ou une partie d'un aliment) qui procure des avantages médicaux ou de santé, y compris la prévention et/ou le traitement d'une maladie".

Ces ingrédients peuvent être des macronutriments (comme les acides gras insaturés présents dans certaines huiles), des micronutriments (comme les vitamines) ou des composés non nutritifs (comme les enzymes hydrolytiques et les flavonoïdes) et peuvent être naturellement présents dans les aliments (comme les acides gras oméga-3 dans le poisson ou la vitamine C dans les agrumes, etc.) Ou ajoutés (par exemple, les laits enrichis en calcium et en vitamine D, les céréales enrichies en acide folique, et autres) (**Hugenholtz et Smid 2002**).

Puisque les BL sont impliquées dans la préparation d'une large gamme d'aliments fermentés et en raison de leur statut GRAS (Generally Recognized as Safe), la sélection de souches délivrant des nutraceutiques est maintenant l'objectif principal de plusieurs groupes de recherche. Parmi ces études, la production de vitamines par LB a retenu l'attention de la communauté scientifique.

Il a été démontré que certains aliments fermentés avec des BL contiennent des niveaux élevés de vitamines du groupe B en raison de la biosynthèse microbienne. Pour cette raison, les LB (considérés comme des micro-organismes de qualité alimentaire) sont les candidats idéaux pour délivrer des composés spécifiques tels que les vitamines dans les aliments. L'enrichissement en vitamines produit par les LB dans les aliments fermentés est présenté dans le **tableau 3**.

Récemment, il a également été signalé que les BL et d'autres micro-organismes bénéfiques ont le potentiel de produire des vitamines *in situ* dans le tractus gastro-intestinal (GI) (**LeBlanc et al., 2013**).



**Tableau 3 :** Enrichissement des aliments fermentés en vitamines par les bactéries lactiques (LeBlanc *et al.*, 2016).

Souche	Vitamine	Augmentation %	Produit	Référence
<i>L. acidophilus</i> ATCC 314	Riboflavine	657	Lait de soja + vitamines	<b>Ewe et al., 2010</b>
<i>L. acidophilus</i> FTDC 8833	Riboflavine	243	Lait de soja + vitamines	<b>Ewe et al., 2010</b>
<i>L. acidophilus</i> FTDC 8633	Riboflavine	113	Lait de soja + vitamines	<b>Ewe et al., 2010</b>
<i>Lactobacillus</i> ssp + <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Riboflavine	345	Idli	<b>Ghosh et Chattopadhyay (2012)</b>
<i>L. plantarum</i> UNIFG1 (résistant à la roseoflavine ?)	Riboflavine	200	Pâtes	<b>Capozzi et al. (2011)</b>
<i>L. plantarum</i> UNIFG1 (dérivé de la roséoflavine)	Riboflavine	300	Pain	<b>Capozzi et al. (2011)</b>
<i>L. fermentum</i> PBCC11.5 (dérivé de la roséoflavine)	Riboflavine	200	Lait de soja	<b>Russo et al. (2014)</b>
<i>L. bulgaricus</i> CRL 863 + <i>S. thermophilus</i> CRL 415 et 803	Folate	190	Yogourt	<b>Laiño et al. (2013)</b>
<i>L. bulgaricus</i> CRL 863 + <i>S. thermophilus</i> CRL 415 et 803 + <i>L. amylovore</i> CRL 887.	Folate	290	Yogourt	<b>Laiño et al. (2014)</b>
<i>L. Lactis</i>	Folate	600	Jus de concombre	<b>Gangadharan et Nampoothiri (2011)</b>
<i>L. Lactis</i>	Folate	144	Jus de pastèque	<b>Gangadharan et Nampoothiri (2011)</b>
<i>L. reuteri</i> CRL 1098	B12	100	Lait de soja	<b>Molina et al. (2013)</b>

## II.2. Le groupe de vitamines B

Les vitamines sont des micronutriments qui sont essentiels au métabolisme de tous les organismes vivants. On les trouve comme précurseurs des coenzymes intracellulaires qui sont nécessaires à la régulation des réactions biochimiques vitales dans la cellule. Compte tenu de l'incapacité des cellules de mammifères à synthétiser ces biomolécules vitales, un apport exogène de la plupart des vitamines semble inévitable pour prévenir les carences nutritionnelles. Bien que la plupart des vitamines soient présentes dans une variété d'aliments, des carences en vitamines existent encore dans de nombreux pays, y compris les nations industrialisées.

Treize vitamines sont actuellement reconnues comme essentielles à la santé humaine et sont classées en fonction de leur solubilité dans les graisses (vitamines A, D, E et K) ou dans l'eau (vitamine C et vitamines du groupe B). Les vitamines du groupe B (ou complexe B) comprennent la thiamine, la riboflavine, la niacine, la pyridoxine, l'acide pantothénique, la biotine, le folate et la cobalamine. Chaque vitamine du groupe B est chimiquement différente et agit en synergie pour maintenir l'homéostasie de l'organisme en jouant des rôles majeurs dans les processus métaboliques tels que la production d'énergie et la synthèse des globules rouges. Les vitamines du groupe B, normalement présentes dans de nombreux aliments, peuvent facilement être éliminées ou détruites pendant la cuisson et la transformation des aliments, de sorte que leurs carences sont présentes dans de nombreuses sociétés. C'est pourquoi de nombreux pays ont adopté des lois exigeant l'enrichissement en vitamines du groupe B de certains aliments avec des vitamines et des minéraux spécifiques. Par exemple, en Argentine, l'industrie alimentaire est tenue d'enrichir toute la farine de blé destinée à la consommation humaine en fer, acide folique, thiamine, riboflavine et niacine pour prévenir l'anémie et les anomalies du tube neural pendant le développement de l'embryon. Cependant, des rapports officiels ont montré qu'en raison d'un manque de contrôles réglementaires, la concentration de fortification n'est pas toujours respectée et, par conséquent, les niveaux de vitamines sériques dans la population générale n'ont été que légèrement améliorés et des carences subcliniques persistent (ENNyS, 2007).

### II.2.1. Riboflavine (vitamine B2)

La riboflavine (vitamine B2) joue un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire, étant le précurseur des co-enzymes flavine mononucléotide (FMN) et flavine adénine dinucléotide (FAD) qui agissent tous deux comme des transporteurs d'hydrogène dans les

réactions biologiques d'oxydoréduction impliquant des enzymes telles que la NADH déshydrogénase. Une fois la riboflavine absorbée par le corps humain, la synthèse de ces co-enzymes de flavine est contrôlée par les hormones thyroïdiennes qui régulent les activités des enzymes de biosynthèse des flavines (**Rucker et al., 2001**).

Les besoins recommandés en riboflavine pour l'homme varient en fonction du sexe, de l'âge et de l'état physiologique (comme c'est le cas pendant la grossesse et l'allaitement). Les adultes normaux doivent consommer quotidiennement entre 0,9 et 1,6 mg de cette vitamine car le corps humain ne possède pas de dépôts de riboflavine et un excès d'apport vitaminique est éliminé dans les urines. Bien qu'elle soit présente dans une grande variété d'aliments, la carence en riboflavine (ariboflavinose) se produit encore dans les pays en développement et industrialisés (**O'Brien et al., 2001 ; Blanck et al., 2002**). Même si les cas graves d'ariboflavinose ne sont pas courants dans la plupart des sociétés, les manifestations subcliniques sont fréquentes et ne peuvent être détectées qu'en mesurant les concentrations de vitamines dans le sang.

Les produits laitiers ne sont pas considérés comme une bonne source de cette vitamine essentielle car le lait contient environ 1,2 mg de riboflavine par litre, ce qui signifie qu'un adulte moyen devrait consommer environ un litre par jour pour couvrir les besoins quotidiens. Ce niveau de consommation de lait n'est pas normal chez les habitants des pays industrialisés comme les États-Unis, où la consommation quotidienne de lait frais par habitant est d'environ 200 ml (**Putman et Allshouse, 2003**). Ainsi, l'augmentation des niveaux de riboflavine dans le lait est une proposition intéressante pour prévenir les carences dans les populations où la consommation de produits laitiers est faible.

Les concentrations de riboflavine peuvent parfois varier dans certains produits laitiers en raison des technologies de transformation et de l'action des micro-organismes utilisés pendant la fermentation. Ce dernier cas peut être bénéfique car il a été démontré que les produits laitiers fermentés tels que le babeurre et le yaourt ont des concentrations en riboflavine significativement plus élevées (1,7 et 2,0 mg/l, respectivement) par rapport au lait non fermenté (1,2 mg/l). Cette augmentation de la vitamine B2 serait due à l'action des cultures starter productrices de riboflavine pendant le processus de fermentation (**LeBlanc et al., 2011**).

La biosynthèse de la riboflavine a été décrite à la fois chez les bactéries Gram (+) et Gram (-), avec plus de détails chez *Bacillus subtilis* (**Perkins et Pero, 2002**) et *Escherichia coli* (**Bacher et al., 1996**).

Récemment, les capacités de production de riboflavine de 179 souches de BL, isolées à partir d'une variété de produits laitiers fermentés, ont été évaluées (**Juarez del Valle et al., 2014**). Seules 42 souches ont été capables de se développer dans un milieu commercial sans riboflavine, après quoi la concentration de cette vitamine a été déterminée par HPLC. Cinq de ces souches (*Lactobacillus fermentum* (deux souches), *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, et *L. paracasei* subsp. *paracasei*) ont été présélectionnées pour leur capacité à produire des concentrations élevées de riboflavine dans ce milieu commercial sans B2. Ils ont ensuite été inoculés dans du lait de soja afin d'évaluer leur capacité à se développer dans cette matrice alimentaire pour augmenter ses faibles concentrations en riboflavine ( $309 \pm 19$  ng B2/ml). Seul *L. plantarum* CRL725 a été capable d'augmenter significativement les niveaux de riboflavine dans le lait de soja, faisant plus que doubler ( $700 \pm 20$  ng B2/ml) la concentration initiale.

Dans une autre étude **Ewe et al. (2010)**, dix souches de *Lactobacillus* ont été évaluées pour leur viabilité et leurs caractéristiques de croissance dans du lait de soja supplémenté en vitamine B. Les auteurs ont montré que l'ajout de vitamines B favorisait la croissance de tous les lactobacilles. Ces auteurs ont montré que l'ajout de vitamines B favorisait la croissance de tous les lactobacilles et stimulait également la synthèse de la riboflavine et de l'acide folique par les lactobacilles dans le lait de soja.

L'*idli* est un petit-déjeuner fermenté très populaire en Inde, composé principalement de riz et de graines noires. Il a été démontré que les concentrations en riboflavine, thiamine et folate augmentaient pendant la fermentation de la pâte à *idli* en raison de la présence de levures, de *Lactobacillus* ssp. et de *Leuconostoc mesenteroides* (**Ghosh et Chattopadhyay 2012**). En termes de riboflavine, les concentrations ont atteint  $7,6 \pm 0,8$  ng B2/ml par rapport à la concentration initiale ( $2,2 \pm 1,1$  mg B2/ml). Des études complémentaires sont nécessaires pour identifier les souches productrices de riboflavine dans ce produit.

D'autre part, il a été démontré que les mutants isolés sur la base de leur résistance à la roseoflavine, un analogue toxique de la riboflavine, présentent également un phénotype de surproduction de riboflavine (**Kukanova et al., 1982**).

Les BL ont été obtenus à partir d'échantillons de farine de blé dur et ont fait l'objet d'un dépistage des variants résistants à la roséoflavine afin d'isoler les souches naturelles surproductrices de riboflavine (**Capozzi et al., 2011**). Deux souches de *L. plantarum* surproduisant de la riboflavine ont été utilisées pour la préparation de pain (par fermentation au levain) et de pâtes (par une étape de préfermentation) afin d'augmenter leur teneur en vitamine B2. L'approche appliquée a permis d'augmenter considérablement la teneur en

vitamine B2 (environ 2 et 3 %) 3 fois dans les pâtes et le pain, respectivement), représentant ainsi une application biotechnologique de qualité alimentaire pratique et efficace pour la production de pain et de pâtes enrichis en vitamine B2. Cette méthodologie peut être étendue à une large gamme de produits alimentaires, d'aliments pour animaux et de boissons à base de céréales.

Outre l'introduction d'une souche productrice de riboflavine efficace, la conception d'un milieu de fermentation approprié et des conditions de croissance optimales sont d'une importance cruciale pour améliorer l'efficacité et la productivité. Pendant la phase initiale du processus de fermentation, une vitesse d'agitation plus faible (aération) était bénéfique pour la croissance cellulaire et la biosynthèse de la riboflavine, tandis que pendant la dernière phase, une vitesse d'agitation plus élevée (900 rpm) était la plus bénéfique. Ainsi, une stratégie de contrôle de la vitesse d'agitation en deux étapes a été proposée sur la base d'une analyse cinétique, dans laquelle la vitesse d'agitation a été contrôlée à 600 rpm pendant les 26 premières heures, puis est passée à 900 rpm pour maintenir une croissance cellulaire et une production de riboflavine élevées pendant tout le processus de fermentation. La concentration maximale de riboflavine a atteint 9400 ng/ml en 48 h en appliquant cette stratégie, ce qui était 20,5 et 21,4% plus élevé que les meilleurs résultats contrôlés par des vitesses d'agitation constantes (**Man *et al.*, 2014**).

En outre, le tractus gastro-intestinal humain est colonisé par une vaste gamme de micro-organismes connus sous le nom de microbiote intestinal qui, outre son impact sur différentes fonctions humaines, joue un rôle essentiel dans la digestion des aliments et la récupération d'énergie, et peut également agir comme un important fournisseur de vitamines. Contrairement aux vitamines alimentaires, qui sont absorbées dans l'organisme, les vitamines B ne sont pas absorbées par l'organisme.

Dans le tractus proximal de l'intestin grêle, la principale absorption des vitamines produites par les bactéries se fait dans le côlon (**Said et Mohammed, 2006**). Jusqu'à présent, des informations fragmentaires sont disponibles sur la synthèse *de novo* de la riboflavine par les bactéries entériques. Dans le cas des bifidobactéries, les enzymes nécessaires à la biosynthèse de cette vitamine semblent être partiellement ou complètement absentes de la majorité des génomes de bifidobactéries actuellement disponibles (**Ventura *et al.*, 2007**).

### **II.2.2. Folate (vitamine B9)**

La vie humaine ne peut exister sans folate, car cette vitamine du groupe B est impliquée dans des fonctions essentielles du métabolisme cellulaire telles que la réplication, la

réparation et la méthylation de l'ADN, ainsi que la synthèse des nucléotides, d'autres vitamines et de certains acides aminés. Les folates possèdent des propriétés antioxydants qui protègent le génome en inhibant l'attaque de l'ADN par les radicaux libres, en plus de leur rôle dans les mécanismes de réparation et de réplication de l'ADN (**Duthie et al., 2002**). La carence en folates a été impliquée dans une grande variété de troubles tels que la maladie d'Alzheimer (**Luchsinger et al., 2007**), les maladies coronariennes, l'ostéoporose (**Baines et al., 2007**), un risque accru de cancer du sein (**Tjonneland et al., 2006**) et de cancer colorectal (**Van Guelpen et al., 2006**), de mauvaises performances cognitives, une perte d'audition (**Durga et al., 2007**) et des anomalies du tube neural.

L'apport journalier recommandé (AJR) en folates chez un adulte est de 200 à 400 µg (**FAO/OMS 2002**). Pour les femmes enceintes, 400-600 µg sont recommandés. Bien que le folate soit présent dans une alimentation humaine normale, les carences en folate restent fréquentes, même dans les pays bien développés.

Il a été affirmé que les niveaux d'apport en folates sont inadéquats dans divers groupes de population, notamment chez les femmes en âge de procréer (**Morris et Tangney, 2007**). De telles études ont obligé les instances dirigeantes de nombreux pays à préconiser la supplémentation obligatoire en acide folique des aliments de grande consommation. Au Canada et aux États-Unis, par exemple, l'enrichissement des farines est obligatoire depuis 1998 afin de réduire l'incidence des malformations du tube neural chez les nouveau-nés. De nombreux autres pays ont ensuite développé des programmes similaires. Comme indiqué précédemment, en Argentine, l'enrichissement des farines en vitamines spécifiques, dont l'acide folique, est obligatoire depuis 2002 (**Sherwood et al., 2006**).

D'autres considérations relatives à l'innocuité d'une consommation excessive d'acide folique soulignées par la FDA (Food and Drug Administration 1996) comprennent les risques potentiels inconnus pour les femmes enceintes et les personnes prenant des médicaments antiépileptiques et anti-folates. La FDA a également noté les incertitudes concernant les effets d'une exposition chronique élevée chez les enfants, dont l'hypothèse selon laquelle l'exposition du fœtus à un excès d'acide folique pourrait favoriser la sélection du polymorphisme méthyl- entétrahydrofolate, associé à une gamme de maladies débilitantes (**Lucock et Yates, 2005**). Les folates naturels, tels que ceux produits par les plantes et les micro-organismes, ne provoquent pas de " masquage " de l'anémie pernicieuse qui se produit à des concentrations élevées d'acide folique et devraient donc être considéré comme une alternative viable aux programmes d'enrichissement en acide folique (**Scott, 1999**).

Le lait n'est pas une source riche en folates alimentaires par rapport à d'autres aliments. Parmi les produits laitiers, les laits fermentés sont considérés comme une bonne matrice potentielle pour la fortification en folates, car les protéines de liaison aux folates présentes dans le lait améliorent la stabilité des folates.

La quantité d'acide folique présente dans le lait de vache varie de 20 à 60 µg/l, tandis que sa concentration dans les yaourts (normalement entre 50 et 70 µg/l) peut être augmentée en fonction des cultures starter utilisées et des conditions de stockage.

Dans un article récent, la production extracellulaire de folates et d'autres vitamines a été évaluée dans des cultures de LB isolées de nukazuke, un cornichon traditionnel japonais (**Masuda et al., 2012**). Parmi les 180 isolats de LAB testés, deux souches de *L. Sakei* (CN-3 et CN-28) et une souche de *L. Plantarum* (CN-49) ont produit des niveaux élevés de folates extracellulaires (supérieurs à 100 µg/l) dans un milieu de culture sans folates. Cependant, les souches productrices de folates n'ont pas montré de tolérance aux concentrations élevées de sels et d'alcool, ce qui limite grandement leur utilisation dans l'élaboration du nukazuke, bien qu'elles puissent être utilisées dans d'autres aliments fermentés.

De plus, l'administration orale de souches probiotiques productrices de folate peut conférer une protection plus efficace contre l'inflammation et le cancer, à la fois en exerçant les effets bénéfiques des probiotiques et en délivrant du folate aux cellules colorectales (**Pompei et al., 2007**). Chez l'homme, les folates produits par le microbiote de l'intestin grêle sont assimilés par l'hôte (**Camilo et al., 1996**). Bien que l'on pense qu'ils ne fournissent qu'un pourcentage mineur de l'ensemble des folates absorbés chez l'homme (**Bates, 1993**), la contribution du microbiote aux besoins en folates de l'épithélium intestinal à fort renouvellement cellulaire est encore inconnue. Il a récemment été démontré que le folate synthétisé par voie bactérienne peut également être absorbé à travers le gros intestin et incorporé dans le foie et les reins des porcelets (**Asrar et O'Connor, 2005**). Ces auteurs ont prédit qu'environ 18 % des besoins en folates alimentaires du porcelet pourraient être couverts par l'absorption de folates à travers le gros intestin. De même, l'augmentation des populations intestinales de *Bifidobacterium*, induite par la consommation de lait maternel, a été corrélée à un meilleur statut en folates chez les rats (**Krause et al., 1996**).

### II.2.3. Vitamine B12

Le terme vitamine B12 (B12) est généralement utilisé pour désigner un type de corrinnoïde de cobalt, notamment du groupe de la cobalamine (Cbl). En termes stricts, la

vitamine B12 est la forme de la vitamine qui est obtenue lors de la production industrielle et qui n'existe pas à l'état naturel (**Rucker et al., 2001**). Le cyanure stabilise la molécule au cours de la procédure d'extraction à partir de cultures microbiennes, formant ainsi la cyanocobalamine. Dans sa forme naturelle, la vitamine est principalement présente sous forme de désoxyadénosilcobalamine (coenzyme B12), de méthyl-cobalamine, de pseudocobalamine, entre autres. Structurellement, la molécule de cobalamine peut être divisée en trois parties : le cycle corrinique central avec les quatre ligands d'un ion cobalt ; un ligand supérieur (ou bêta) qui est attaché au groupe adénosyl ou méthyle ; et le ligand inférieur (ou alfa), normalement le diméthylb-enzimidale (DMB) ; mais dans plusieurs bactéries anaérobies, l'adénine et d'autres ligands peuvent également être présents, formant la pseudocobalamine (ou pseudo-B12) et d'autres cofacteurs actifs (**Martens et al., 2002**).

Les animaux, les plantes et les champignons sont incapables de produire de la cobalamine ; c'est la seule vitamine qui est exclusivement produite par les micro-organismes, en particulier par les anaérobies (**Smith et al., 2007**). En outre, les données biochimiques et génomiques indiquent que seules quelques bactéries et archées possèdent la capacité de produire cette vitamin. Les ruminants adultes et les végétariens stricts peuvent obtenir la vitamine par le biais de bactéries spécialisées présentes dans le rumen. Les humains ne disposent pas d'un tel microbiote dans leur intestin grêle et doivent absorber la coenzyme à partir de sources naturelles, telles que les viandes animales (en particulier le foie et les reins), le poisson, les œufs et les produits pharmaceutiques (**Herbert, 1996**).

La carence en vitamine B12 peut provoquer différentes manifestations pathologiques qui affectent, entre autres, le système hématopoïétique, neurologique et cardiovasculaire. L'une des formes extrêmes de carence en B12, connue sous le nom d'anémie pernicieuse, n'est normalement pas associée à l'alimentation mais plutôt à des problèmes du système gastrique causés par un manque de production d'une glycoprotéine gastrique appelée facteur intrinsèque, qui facilite l'absorption de la vitamine dans l'intestin grêle (**Beck, 2001**).

L'un des premiers organismes modèles utilisés pour l'étude de la biosynthèse de la B12 a été *Propionibacterium freudenreichii* qui est utilisé dans la production industrielle de cette vitamine. Cependant, les premières expériences avec cette bactérie n'ont pas été fructueuses en raison de l'instabilité des intermédiaires de biosynthèse (**Battersby, 1994**). Afin de contourner ce problème, une étape importante a été l'utilisation de la bactérie aérobie productrice de B12 *Pseudomonas denitrificans* qui a permis l'isolement de nombreux intermédiaires et la caractérisation de la majorité des gènes impliqués dans la biosynthèse de cette vitamine (**Thibaut**

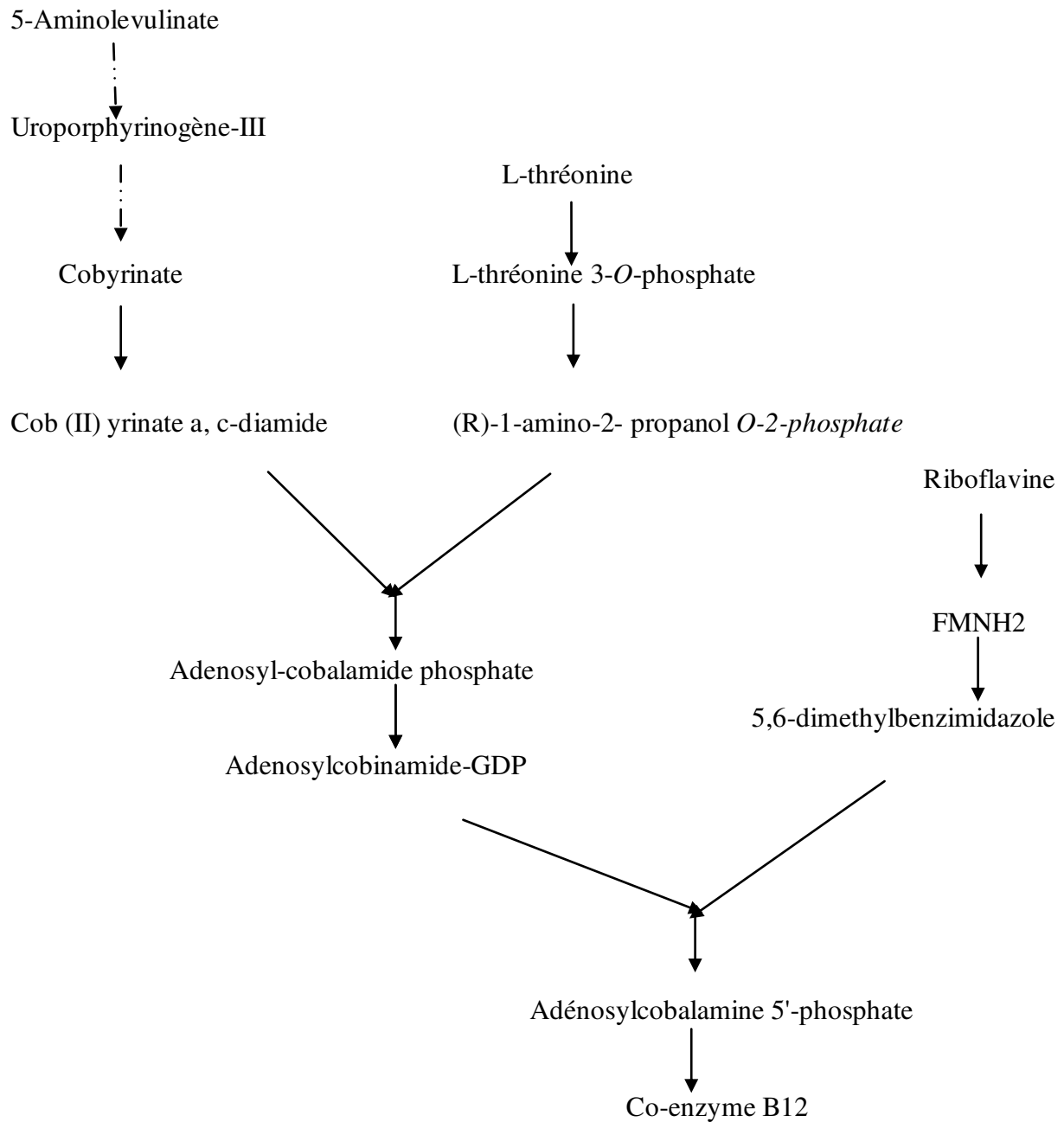


*et al.*, 1998). Ces études ont conclu que la biosynthèse de la cobalamine pouvait être réalisée soit (i) dans des conditions aérobies ou dépendantes de l'oxygène, soit (ii) dans des conditions anaérobies ou indépendantes de l'oxygène. La voie anaérobie (**Figure 1**), observée dans des souches de *P. freudenreichii*, *Salmonella enterica* et *Bacillus megaterium*, a été décrite (**Escalante-Semerena, 2007**). Les problèmes de caractérisation initiaux étaient principalement dus au fait que l'ion cobalt central était inséré dans l'anneau corrinoïde dans une étape précoce qui génèrait des intermédiaires instables qui étaient difficile à isoler. En revanche, dans la voie dépendante de l'oxygène, le cobalt est inséré à un stade ultérieur, créant des intermédiaires plus stables.

### II.2.3.1. Biosynthèse de la cobalamine par les *Lactobacillus*

Il est bien connu que certaines souches de *L reuteri* sont capables de métaboliser le glycérol en Co-fermentation avec le glucose. La première enzyme de cette voie métabolisme est le glycérol déshydratase qui nécessite AdoCbl comme cofacteur (**Daniel et al., 1998**). Dans cette réaction, le glycérol est converti en 3-HPA, qui est ensuite réduit par NADH en 1,3-propanediol (1,3-PDL) par l'intermédiaire de la 1,3- PDL : NAD oxydoréductase. Il a été démontré que *L reuteri* CRL1098 était capable de métaboliser le glycérol dans un milieu sans B12, ceci étant la première preuve indirecte de la présence de cobalamine intracellulaire chez *L reuteri* (**Taranto et al., 2003**). L'analyse chromatographique d'extraits intracellulaires de *L reuteri* CRL1098 a révélé que cette souche était capable de produire un composé avec un spectre d'absorption étroitement identique à la cobalamine standard mais avec un temps d'élution différent. La présence de cobalamine ou d'un de ses intermédiaires dans l'extrait intracellulaire de cette souche a été confirmée par différents tests biologiques (**Taranto et al., 2003**).

Des preuves génétiques de la biosynthèse de la cobalamine par *L reuteri* CRL1098 ont ensuite été obtenues par l'utilisation de différentes techniques de biologie moléculaire. L'organisation génétique (gènes *cob* et *CBI*) sont très similaires à ceux de *S. enterica* et *Listeria innocua* (**Santos et al., 2007**). Il est important de noter que la dénomination des gènes pour la biosynthèse du Cbl a été confondue puisque certains chercheurs ont utilisé des préfixes différents, *CBI* et *cob*, pour décrire les gènes chez *Ps. denitrificans* et *S. enterica*, respectivement. Comme certains des gènes sont présents dans les deux voies de biosynthèse, ils peuvent avoir des dénominations différentes selon la voie décrite.



**Figure 1 :** Principaux intermédiaires de la synthèse biologique de la cobalamine. Les flèches avec des lignes incomplètes indiquent l'existence de plus de trois étapes enzymatiques impliquées dans l'obtention de l'intermédiaire (LeBlanc *et al.*, 2016).

Le cluster génétique de biosynthèse de *L reuteri* CRL1098 contient au moins 30 gènes qui sont impliqués dans la synthèse *de novo* de la vitamine. Une caractéristique distinctive de l'amas d'*épis* de *L reuteri* est la présence de gènes d'*ourlet* au milieu de l'amas. Chez les organismes respiratoires *Listeria* et *Salmonella*, qui présentent des groupes d'*épis* similaires, les gènes *hem* sont décrits dans d'autres régions de leur génome. La présence des gènes *hem* dans le groupe d'*épis* est une caractéristique qui n'a été observée que dans certains génomes de *Clostridium* (Rodionov *et al.*, 2003).

De plus, l'analyse transcriptionnelle effectuée dans *L reuteri* CRL1098 a montré que les niveaux élevés d'expression du groupe *cob ont* été observés dans la phase de croissance exponentielle tardive en l'absence de cobalamine, bien que l'existence de cobalamine exogène n'ait que partiellement réprimé l'expression de l'opéron. La transcription d'un vaste ensemble de gènes impliqués dans la synthèse de la cobalamine dans le levain préparé avec la souche *L reuteri* ATCC 55730 a également été décrite (Hüfner *et al.*, 2008).

En ce qui concerne l'application biotechnologique de la B12, la capacité d'une boisson au lait de soja contenant *L reuteri* CRL1098 à prévenir les pathologies causées par un régime déficient en B12 a été évaluée à l'aide d'un modèle expérimental murin. Les femelles gestantes ont été divisées en quatre groupes. Outre le groupe déficient en B12 et le groupe témoin, les animaux des deux autres groupes ont reçu du lait de soja non fermenté et du lait de soja fermenté avec *L reuteri* CRL 1098 de la fin de la gestation au sevrage. À la fin des essais, les femelles et leur progéniture correspondante ont été sacrifiées pour déterminer les paramètres hématologiques, immunologiques et histologiques. Les résultats ont montré que l'administration de lait de soja fermenté empêchait le développement de tous les symptômes observés à la suite d'une carence nutritionnelle en B12, tant chez les souris femelles que chez leur progéniture respective. La conception d'un aliment fonctionnel à base de soja bio-fortifié en vitamine à l'aide d'une souche de *Lactobacillus* capable de produire des composés ayant une activité B12 constitue une thérapie alternative intéressante pour prévenir la carence en vitamine (Molina *et al.*, 2013).

Martin *et al.* (2005) ont caractérisé une souche de *L coryniformis* productrice de reutérine isolée du lait de chèvre. En utilisant une méthode microbiologique, ces auteurs ont montré que la souche était capable de produire un composé de type cobalamine.

Dans une étude récente, les propriétés fonctionnelles de *L fermentum* CFR 2195, isolée de matières fécales de nourrissons en bonne santé, ont été évaluées (Basavanna et Prapulla, 2013). Cette souche était capable d'adhérer aux lignées cellulaires HT-29 et Caco-2, montrant une activité protéolytique élevée et, plus intéressant encore, la production de vitamine B12

(29,45 ng/g de biomasse sèche) en fermentation submergée. En outre, la production de vitamines a été évaluée chez des BL isolées de nukazuke, un pickle traditionnel japonais (**Masudo et al., 2012**). Parmi les 180 isolats de LB, une souche de *L. coryniformis* et une de *L. plantarum* ont été capables de produire environ 2 µg/l de vitamine B12. Bien que ces niveaux ne soient pas considérés comme élevés, cette étude démontre que la propriété de production de vitamine B12 devrait être évaluée dans différentes niches écologiques afin de trouver des souches hautement productrices de B12 qui pourraient être utilisées pour développer de nouveaux produits probiotiques visant à prévenir les carences en vitamine B12.

# **Chapitre III : Matériels et méthodes**

## **CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES.**

La partie expérimentale a été réalisée au sein du Laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS, site III, ex. INES) et au laboratoire de Microbiologie 2 (Micro-2 au site III, ex. ITA), faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

### **III.1. Matériel**

#### **III.1.1. Milieux de culture**

**Bouillon MRS-cys** : le bouillon MRS de MAN, ROGOSA, CHARPE (de Man et al., 1960), ajouté de 0.05% cystéine-HCl, a été utilisé pour la réactivation des bactéries.

**MRS gélosé** : il s'agit du milieu MRS précédemment cité, addition de 20 g/L d'agar-agar, réparti dans des flacons et autoclavés 15 minutes à 121°C. Il a été utilisé pour le dénombrement des bactéries.

**MH** : gélose Mueller-Hinton est un milieu de croissance microbiologique qui est couramment utilisé pour les tests de sensibilité aux antibiotiques. Il a été utilisé pour le test de l'activité antimicrobienne de nos isolats (Mueller et Hinton, 1941).

#### **III.1.2. Bactéries bénéfiques**

BioGaia *Lactobacillus reuteri* Protectis DSM 17938 isolée à partir d'un complément alimentaire, a été prise comme souche de référence.

Sept isolats isolés du lait humain et appartenant à l'espèce, *L. plantarum* ont été étudiés : Il s'agit de SL1 à SL4 et de SL7 à SL9. Onze autres isolats de selles de bébés sains et appartenant à l'espèce *L. fermentum*, ont fait aussi l'objet de cette étude. Il s'agit de SS1 à SS11.

#### **III.1.3. Souches pathogènes**

Les souches pathogènes suivantes ont servi à estimer le pouvoir antimicrobien des isolats bénéfiques :

- ***Candida albicans***: est levure pathogène responsables des vulvo-vaginites.
- ***E coli*** : est une bactérie qu'on retrouve naturellement au sein de la flore intestinale, elle en constitue même 80%. Toutefois, il existe plusieurs souches différentes d'*E coli*, si certaines sont sans danger et nécessaires au bon fonctionnement du microbiote intestinal.
- ***Bacillus cereus*** : sont des bactéries pathogènes, bacilles à gram positif. Leur culture se fait sur milieux de type gélose au sang.
- ***Staphylocoque aureus*** : est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxication alimentaire et d'infections localisées.
- ***Klebsiella pneumonia*** : est à la fois une bactérie commensale de l'organisme, et un agent pathogène responsable d'infections variées. Elle est présente naturellement dans le tube digestif et les voies aériennes supérieures de l'homme et des animaux.
- ***Salmonella sp*** : est une bactérie pathogène responsable de la salmonellose. Ce sont des bacilles à gram négatif, mobiles dans toutes les directions grâce à des flagelles.
- ***Shigella sp*** : sont des entérobactéries immobiles extrêmement proches de *Escherichia coli* mais qui ne fermentent pas le lactose. Elles n'ont pas d'uréase et ne produisent pas de gaz. Ce sont des parasites de l'homme, entraînent une colite infectieuse endémo-épidémique : la dysenterie bacillaire.
- ***Pseudomonas sp*** : ce sont des bacilles à gram négatif, mobiles, aérobies ou anaérobies facultatifs, chimio-organotrophes, largement répandus dans le sol et les eaux. Leur métabolisme est respiratoire. Certaines espèces sont pathogènes pour les animaux et l'homme.

## III.2. Méthodes

### III.2.1. Activité anti-oxydante

- *Activité de piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)*

Le test de piégeage des radicaux DPPH a été réalisé selon **Lin et Yen (1999)** avec de légères modifications. En bref, les souches sélectionnées ajustées à une OD600 d'environ 1 avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH 7.4) ont été ajoutées à 0.05 mM DPPH solution (1:2 v/v) et bien mélangé. Ensuite, les mélanges ont été laissés à température ambiante pendant 1h 30 min dans l'obscurité. La réaction témoin a été préparée en ajoutant de

l'éthanol à la solution de DPPH. L'absorbance de chaque mélange a été quantifiée à 515 nm. Chaque dosage d'échantillon a été effectué en triplicata. Les résultats ont été comparés à ceux de l'acide ascorbique (10 et 100 µg/mL), et l'activité anti-oxydante a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Effet de piégeage (\%)} = (\text{Ac-As})/\text{Ac} \times 100$$

où As est l'absorbance de l'échantillon testé, et Ac est l'absorbance du contrôle à 515 nm.

#### - **FRAP**

Cette méthode est en tout point complémentaire aux autres tests comme l'ORAC, le TEAC ou le test DPPH. Cette technique (**Oyaizu et al., 1986**) a été utilisée pour déterminer la capacité des isolats bénéfiques à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En effet, le  $\text{Fe}^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle. Une augmentation de l'absorbance à 700 nm correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des bactéries testées.

Mélanger 0,5mL PBS, 0.5 mL de ferricyanure à 1% et 0.5 mL de bactéries (1 unité McFarland). Le tout est à chauffer à 50°C pendant 20 min. Ajouter 0,5 ml TCA à 10%, puis centrifuger à 3000×g pendant 5min. Prendre 0.5 mL du surnageant, y rajouter 0.2 mL de  $\text{FeCl}_3$  à 0.1%. Lire les DO à 700 nm.

$$\text{Pouvoir de réduction (\%)} = (\text{Ac-As})/\text{Ac} \times 100$$

où As est l'absorbance de l'échantillon testé, et Ac est l'absorbance du contrôle à 700 nm.

### **III.2.2. Activité antimicrobienne**

Réactivation de souches pathogènes, les souches pathogènes ont été réactivées en transférant 10 µL de la culture conservée 10 mL de bouillon nutritif. L'incubation a été faite à 37°C pendant 24h. Après incubation, la densité optique a été ajustée à  $10^8$  UFC/mL. Les souches pathogènes testées sont : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Candida albicans* ATCC 10231, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 par méthode de diffusion en puits AWDT (**Barefoot et Kaenhammer, 1983**).



La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie, repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (gélose molle). L'effet des bactéries bénéfiques sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche pathogène sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion il y'a une compétition entre la croissance du micro-organismes et la diffusion du produit testé. Cette méthode consiste à couler 21 mL de milieu Muller Hinton avec 100 µl d'une culture jeune de 18 h d'incubation et dont la charge cellulaire est de l'ordre de  $10^8$  UFC/mL sur une boîte de pétri. Après solidification, des puits sont creusés. Généralement on réalise quatre puits de 6 mm de diamètre par boîte. Un volume de 50 µl de l'isolat bénéfique est mis dans les puits. Les boîtes de pétri sont incubées à 37°C/24h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (prédifusion)

La lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition qui apparaissent ; le test est considéré comme positif si le diamètre est supérieur à 2 mm.

### III.2.3. Production de vitamine B12

Des isolats bénéfiques ont été cultivés en monocultures dans un milieu spécifique décrit par nous-mêmes. Sa composition est donnée en **annexe**.

Les cultures bactériennes sont incubées à 25°C pendant 48h dans une ambiance anaérobique et en absence de lumière. Après incubation, 1 mg de KCN par 10 mL de culture (recouverte de papiers aluminium) est additionné afin de stabiliser et protéger la vitamine.

A froid, les surnageants bactériens sont récupérés après centrifugation à 5000 trs / 10 min et 1mL de HCL 0.1 N et rajouter. Laisser 10 min et lire au spectrophotomètre à la longueur d'onde  $\lambda$  égale à 240 et 245 nm (en triplicata). Le zéro de l'appareil est fixé par l'eau distillée prise comme blanc.

Les concentrations de vitamines B12 produites sont calculées à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée à la cobalamine (0-400µg/ mL) et est donnée en **annexe**.

# **Chapitre IV : Résultats et discussion**

## CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION.

### IV.1. Pouvoir antioxydant de nos isolats bénéfiques

Dans cette étude, les effets antioxydants des différents isolats appartenant au genre de *Lactobacillus* sp d'origine lait humain ou fécale ont été observés par deux différentes méthodes, notamment le piégeage des radicaux DPPH et FRAP. Les extraits intracellulaires de certaines bactéries lactiques ont une capacité de chélation des ions métalliques, la capacité de piégeage des espèces réactives de l'oxygène et l'activité de réduction des espèces oxygénés (Lin et Yen, 1999).

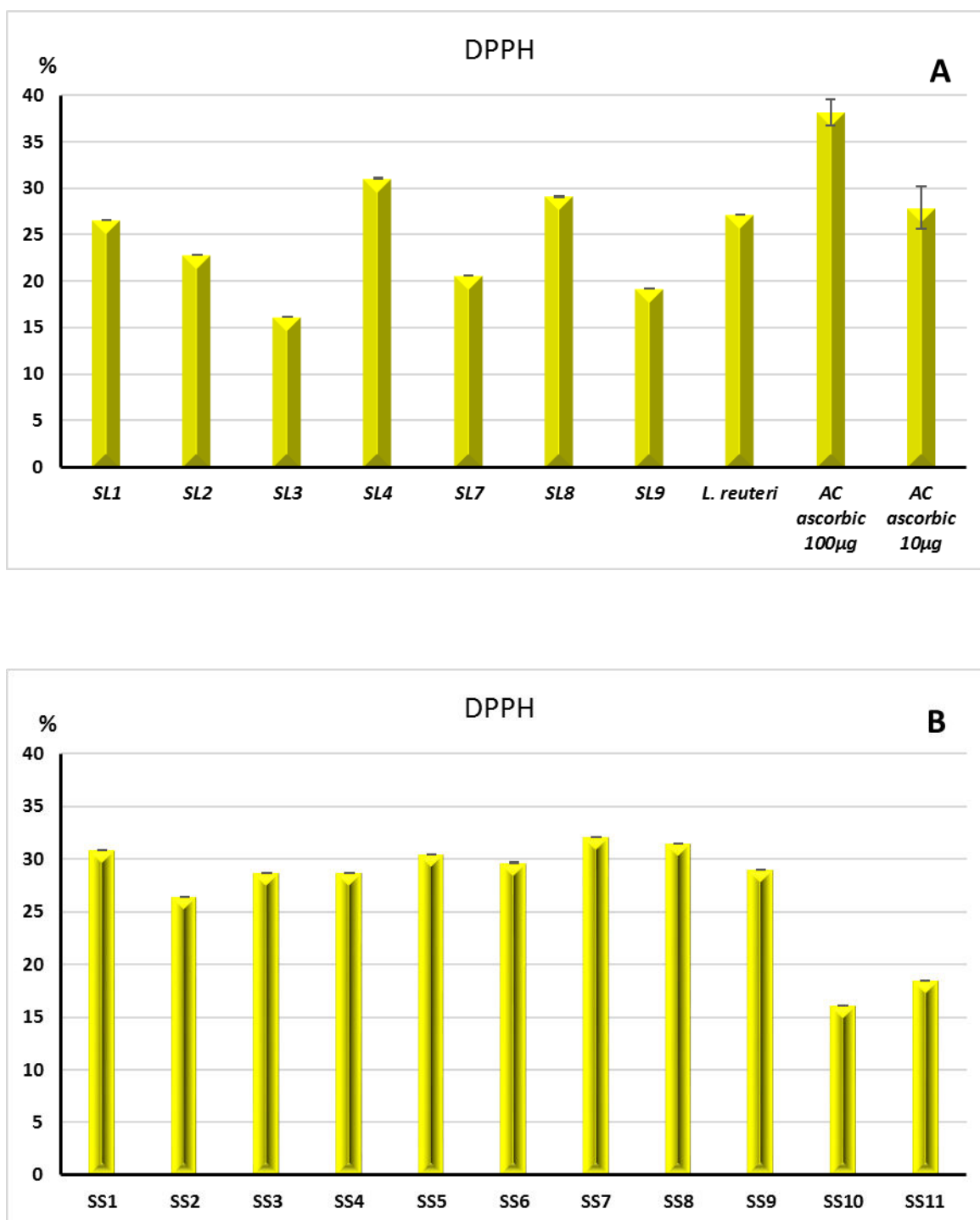
En effet, les cellules intactes de bactéries lactiques ont été trouvées possédant une activité antioxydante *in vitro* (Ou *et al.*, 2009 ; Meira *et al.*, 2012). Cette activité serait intéressante si exprimée, par exemple, à travers les constituants intracellulaires libérés dans le tractus gastro-intestinal par les BL ingérées.

Les activités de piégeage des radicaux libres DPPH de nos isolats probiotiques variaient de 16 à 32.1% (figure 2). Toutefois, il y' a une disparité dans ce pouvoir antioxydant chez les isolats d'origine lait humain et de fèces de bébés.

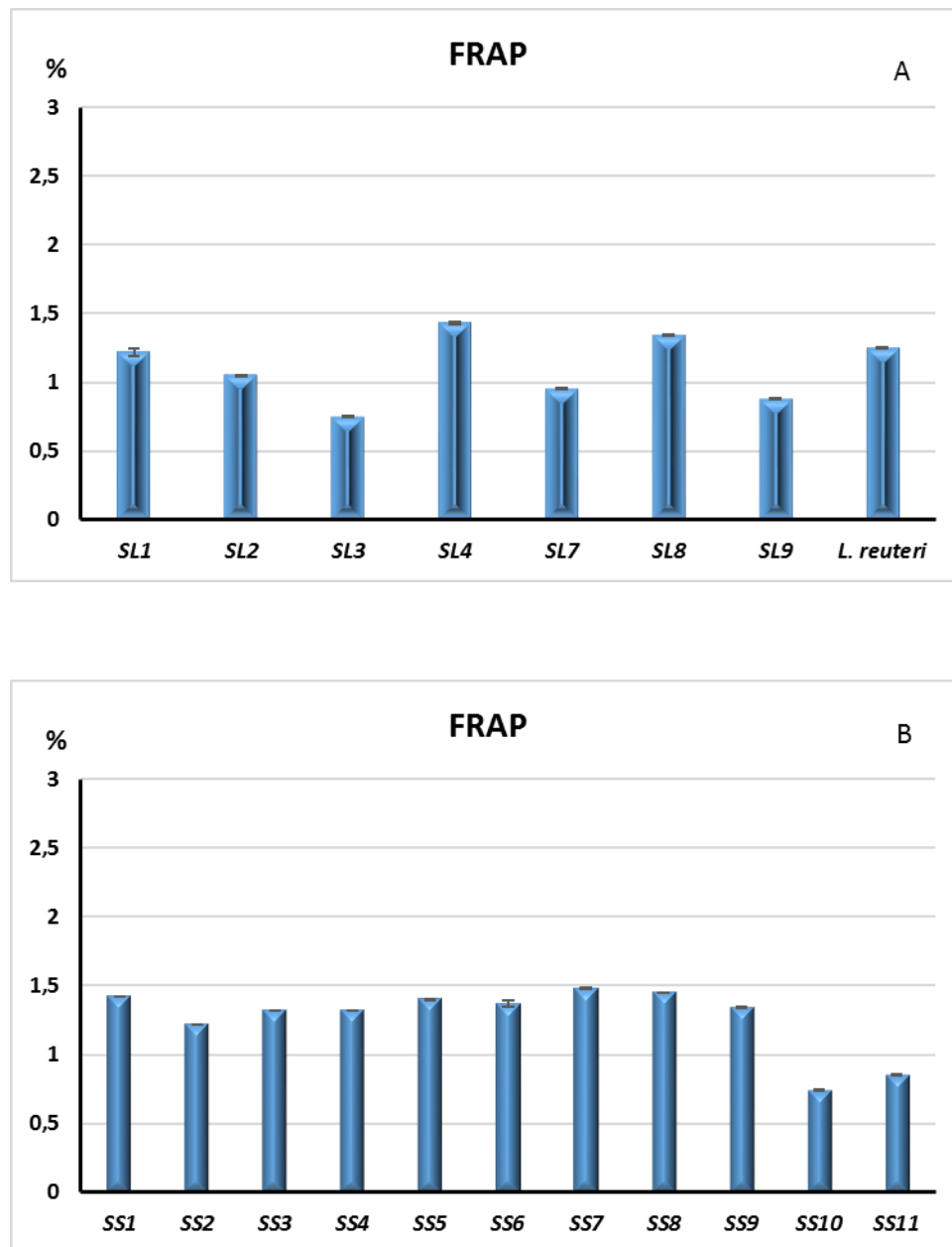
Nos résultats ont révélé la supériorité de la majorité des souches intestinales où les activités dépassaient les 26%, exceptées les deux isolats SS10 et SS11 qui ont enregistrées 16.04 et 18.5% ; respectivement. L'isolat SS7 a dépassé toutes les valeurs enregistrées par une activité qui avoisine les 32.1%. Cette dernière valeur n'est pas significativement inférieure comparée au témoin d'acide ascorbique à 100 µg/mL (38.2%) et est 1.15 fois plus élevée comparée au témoin d'acide ascorbique à 10 µg/mL (27.9 %)

En ce qui concerne les isolats à partir du lait maternel, les activités de piégeage des radicaux libres DPPH fluctuaient de 19.17 à 31.08%; des limites inférieures et supérieures notées respectivement chez les isolats SL9 et SL4. La souche de référence BioGaia *Lactobacillus reuteri* Protectis DSM 17938; isolée elle-même du lait humain, a exprimé une valeur de 27.17%.

Si nous comparons nos résultats avec de la littérature, il ressort que d'autres bactéries probiotiques comme celles testées dans l'étude de Kim *et al.* (2020) expriment des activités identiques. Les auteurs ont trouvé que *B. animalis* subsp. *lactis* MG741 a présenté l'activité de



**Figure 2** : Activité de piégeage des radicaux libres (%) par la méthode au DPPH observées chez les isolats probiotiques d'origines lait humain (A) et fécale (B), comparées à la souche de référence *L. reuteri* Protectis DSM 17938 et à l'acide ascorbique testés aux concentrations de 10 et 100µg/mL.



**Figure 3 :** Activité de réduction ferrique (%) selon la méthode de FRAP exprimée chez les isolats probiotiques d'origines lait humain (A) et fécale (B), comparées à la souche de référence *L. reuteri* Protectis DSM 17938.

piégeage des radicaux DPPH la plus élevée (38.2%) suivie de *B. breve* MG729 (35.4%), *L. reuteri* MG505 (33.5%) et *L. rhamnosus* MG316 (22.2%).

Par la méthode de FRAP (**figure 3**), les données n'ont pas été changées, les activités antioxydantes étaient inférieures à 1 chez les souches lactiques SL3, SL7 et SL9 et de l'ordre de 1.34% chez l'isolat SL4 qui marque encore une fois sa supériorité.

Les souches intestinales marquaient des activités antioxydantes allant de 1.22-1.48%, exceptées SS10 et SS11 dont les valeurs étaient inférieures à 1%.

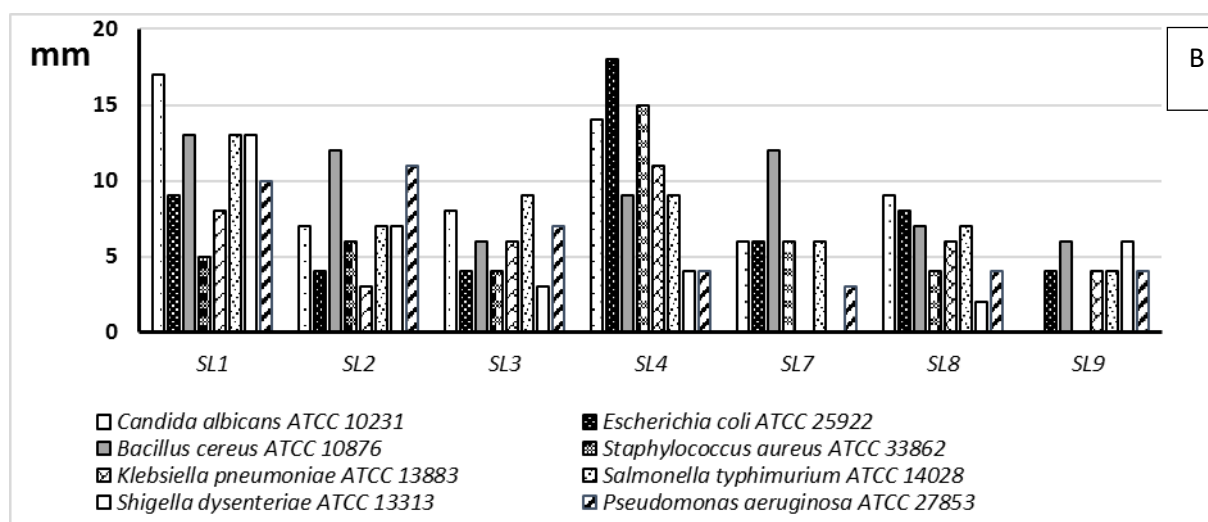
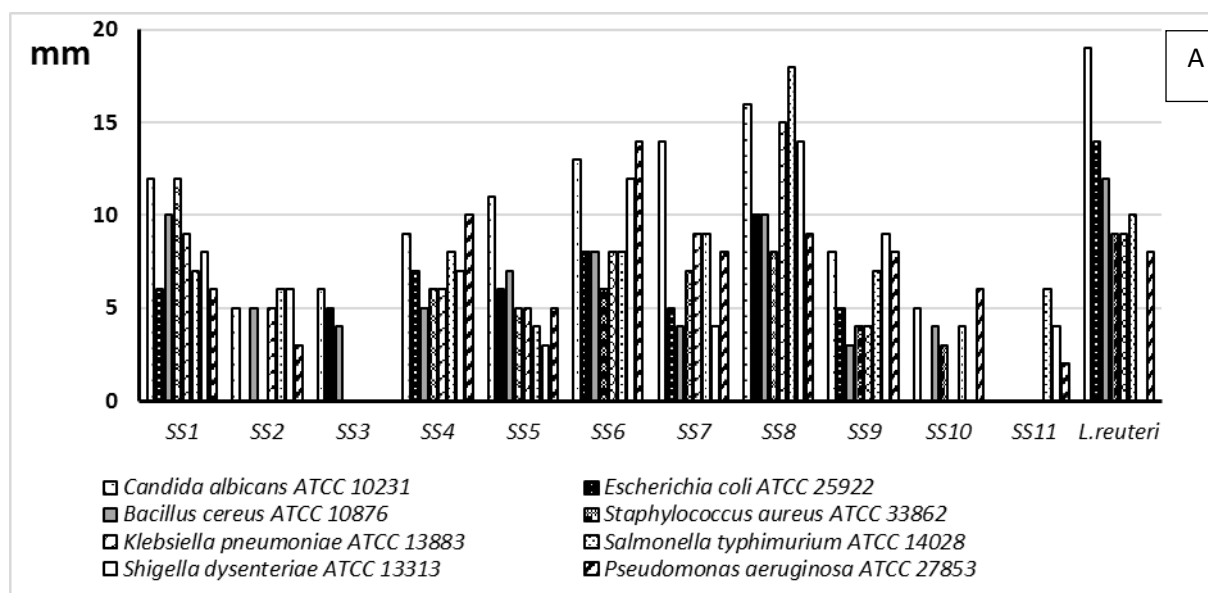
Les isolats ont montré des activités antioxydantes élevées, ce qui indique que ces souches probiotiques possèdent la capacité de réduire les ROS. Nos résultats vont de pair avec la plupart des travaux similaires, en l'occurrence ceux de **Lin et Yen (1999)**, **Afify et al. (2012)** et **Wang et al. (2017)**.

## IV.2. Action antimicrobienne des isolats probiotiques

Dans cette étude, 11 isolats d'origine fécale et sept d'autres d'origine lait humain ont fait l'objet de l'étude antimicrobienne. Les surnageants obtenus à partir des 11 isolats fécaux (figure 7) ont présenté des degrés variables d'activités inhibitrices contre une panoplie de bactéries à Gram négatif et positif, ainsi sur la levure *Candida albicans* 10231.

L'isolat d'origine fécale le plus intéressant était le SS8 où les diamètres d'inhibition calculés étaient tous supérieurs ou égales à 10 mm, excepté contre les deux pathogènes *S. aureus* et *Klebsiella pneumoniae* (8 et 9 mm de diamètre respectivement). Les isolats SS1 et de SS4 au SS9 étaient les plus performants et capables d'inhiber *Candida albicans* et toutes les bactéries pathogènes testées. En revanche, les isolats SS3 et SS11 ne pouvaient inhiber que 3/8 des pathogènes. Ceci pourrait être relié en partie à leurs activités antioxydantes modérées. La souche pathogène la plus virulente semble être le staphylocoque doré où trois de nos isolats n'arrivaient pas à l'inhiber, 7/11 enregistraient des zones d'inhibition de 3 à 8 mm de diamètre. L'exception a été enregistré avec l'isolat SS1 (12 mm) et la souche de référence *L. reuteri* Protectis (9 mm).

Les surnageants obtenus à partir des sept isolats lactiques d'origine lait maternel (**figure 4**) ont aussi présenté des degrés variables d'activités inhibitrices et qui sembleraient plus intéressantes comparées à celles calculées pour les isolats bénéfiques fécaux. En effet, les isolats SL1 et SL4 avaient les spectres d'action les plus larges et où les diamètres d'inhibition



**Figure 4** : Activité inhibitrice des isolats bénéfiques à l'égard des principales souches pathogènes exprimées par les isolats probiotiques d'origines fécale (A) et lait humain (B), comparées à la souche de référence *L. reuteri* Protectis DSM 17938.

fluctuaient de 5 à 17 mm et de 4-18 mm, respectivement. SL7 et SL9 étaient les seuls isolats qui avaient des spectres d'action moins large, en inhibant seulement 6/8 des pathogènes testés.

Dans l'étude de **Makras et al. (2006)** ont confirmé l'activité antagoniste des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes comme *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *E. coli*. Leurs propriétés antibactériennes dépendent de plusieurs critères : le pH, le milieu de culture et la production de substances à effet toxique comme les bactériocines, les acides organiques, les acides gras et le peroxyde d'hydrogène (**Huttunen et al., 1995**).

L'activité antimicrobienne d'une bactérie probiotique est souche-dépendante. Ainsi, dans l'étude de **Hussein et al. (2013)**, différents isolats appartenant aux genre de lactobacilli et *Bifidobacterium* sp se comportaient différemment. Les isolats LZb8, S4b1 et RC4a3 ont présenté une activité antibactérienne supérieure avec des zones d'inhibition comprises entre 8.3 et 8.4 mm. L'activité la plus faible a été enregistrée pour les isolats SCa4 et RC4b2 (zone d'inhibition de 2.3-2.5 mm), tandis que les isolats Kb2, LZa7, RC2b4, RC2b3, SCb2 et Y2a5 (zone d'inhibition de 3.5-4.8 mm) étaient modérément actifs contre *S. aureus*.

### **IV. 3. Estimation de la productivité bactérienne en vitamine B12**

Les résultats relatifs à l'analyse spectrophotométrique de la vitamine B12 produite par nos souches bactériennes isolées révèlent une similitude dans cette productivité estimée aux deux longueurs d'onde  $\lambda=240$  et 245 nm.

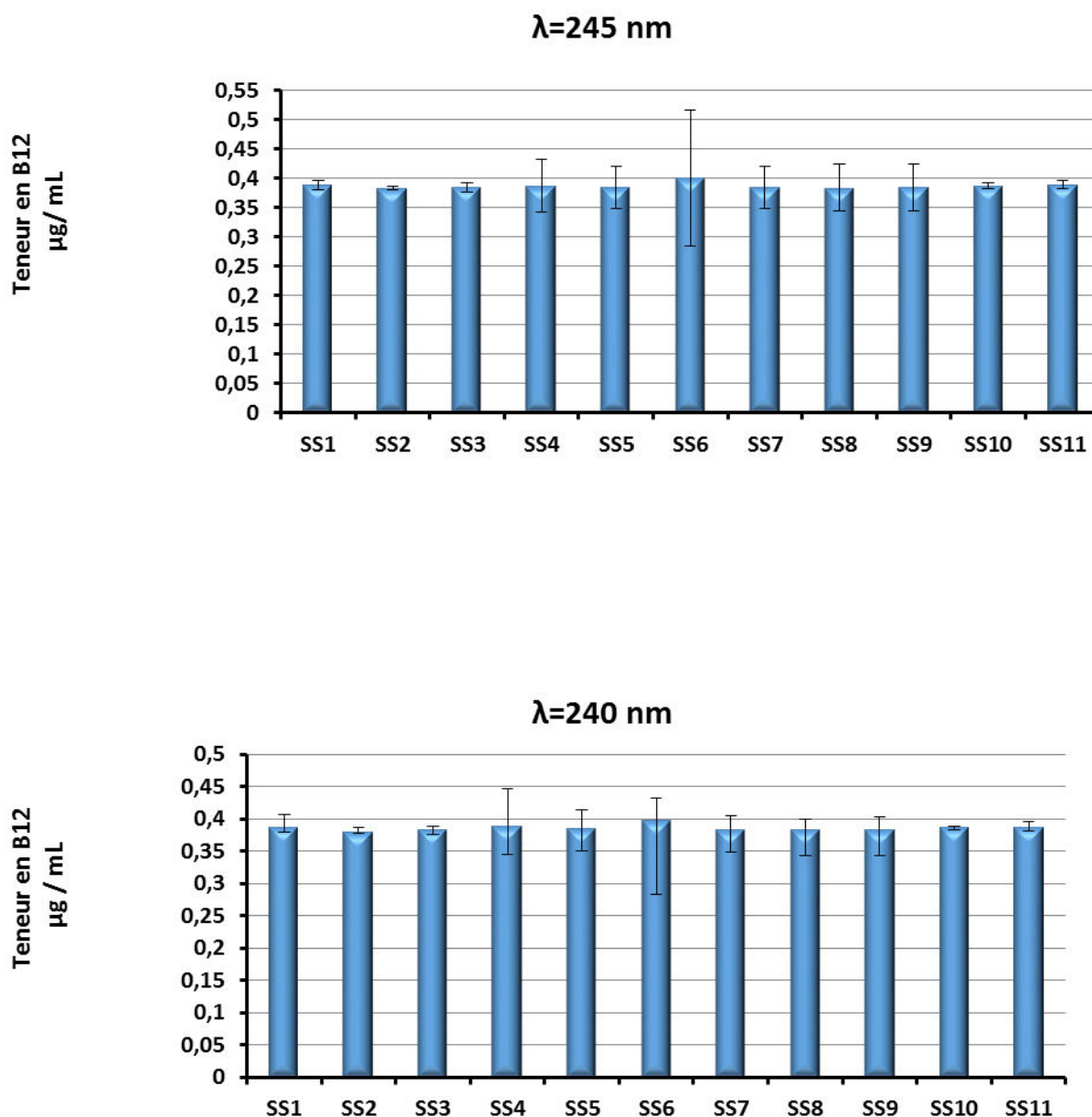
Pour les isolats SS à partir de la matière fécale de bébés sains, les teneurs en cobalamines secrétées étaient de 0.38 à 0.4  $\mu\text{g/mL}$ , avec la supériorité de l'isolat SS6 (**figure 5**).

Nos résultats sont presque identiques à ceux trouvé par (2018) en testant les mêmes isolats.

Ces quantités en cobalamine bactérienne représentent le  $\frac{1}{4}$  de la quantité moyenne nécessaire pour un adolescent en croissance à absorber dans la journée (1,5  $\mu\text{g}$ ) même si d'autres aliments et produits consommés tout au long de la journée pourraient aussi couvrir les besoins en vitamine B12.

Dans l'étude de **Li et al. (2017)**, deux isolats, *Lactobacillus plantarum* LZ95 et CY2, ont montré une production élevée de B12 extracellulaire,  $98 \pm 15 \mu\text{g/L}$  et  $60 \pm 9 \mu\text{g/L}$  respectivement. La B12 extracellulaire de LZ95 a été identifiée comme étant de l'adénosylcobalamine et de la méthylcobalamine, tandis que celle de CY2 était de l'adénosylcobalamine. Il faudrait signaler que la plupart des études sur la vitamine B12 dans





**Figure 5 :** Productivité bactérienne en cobalamine (vitamine B12) telle que estimée par la méthode au cyanide de potassium chez les isolats bénéfiques d'origine fécales.

le genre *Lactobacillus* sp. ont porté sur le besoin auxotrophique. Par conséquent, la découverte d'une souche de BL capable de produire de la cobalamine extracellulaire serait d'une importance remarquable pour l'industrie alimentaire et dans les domaines médicaux et vétérinaires.

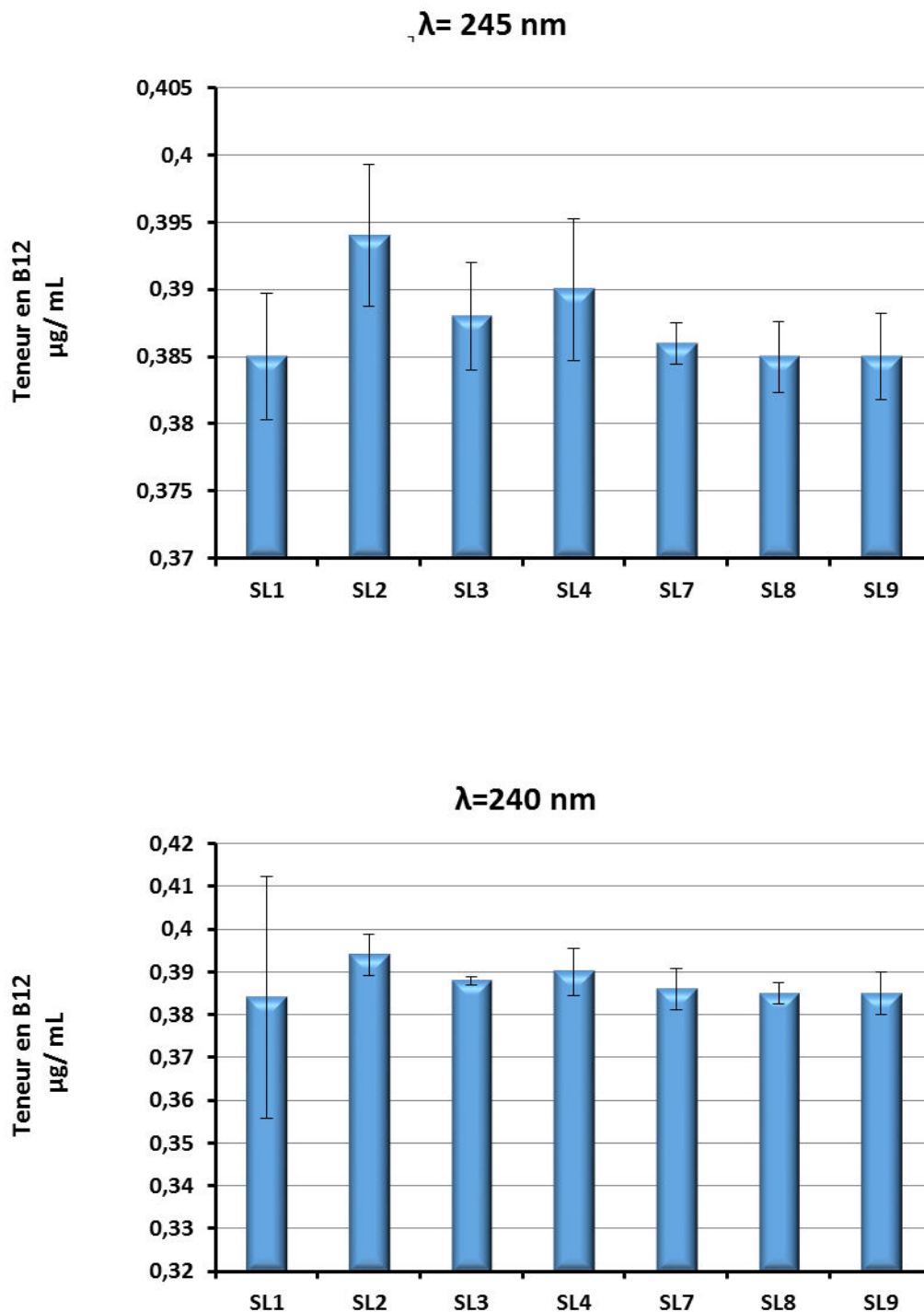
Pour les isolats SL à partir de lait humain, les teneurs excrétées et estimées en cobalamines étaient de 0.38 à 0.394 µg/mL, avec la supériorité de l'isolat SL2 (**figure 6**).

Les cobalamines, à la fois sous forme de désoxyadénosylcobalamine et de méthylcobalamine, sont impliquées en tant que cofacteurs dans une variété de réactions enzymatiques et sont synthétisées par certaines bactéries et archées (**Roth et al., 1996 ; Martens et al., 2002**).

Contrairement aux ruminants qui peuvent synthétiser la cobalamine, les humains ne disposent pas d'une telle microflore dans leurs intestins grêles et doivent l'absorber à partir des aliments (**Roth et al., 1996**). **Albert et al. (1980)** ont signalé que certains sujets du sud de l'Inde, apparemment en bonne santé, hébergeaient dans leur intestin grêle des micro-organismes des genres *Pseudomonas* et *Klebsiella* sp. capables de synthétiser la cobalamine. Dans ce contexte, les informations concernant la capacité des bactéries lactiques (BL) à produire des vitamines sont très rares. En plus, la plupart des espèces sont auxotrophes pour ces composés (**Deguchi et Morishita, 1992**).

La synthèse de ce type de composé par une souche de BL est une découverte surprenante compte tenu des caractéristiques auxotrophes de nombreuses BL pour plusieurs vitamines et acides aminés et de l'ampleur et de la complexité des voies de biosynthèse de la cobalamine. D'un point de vue biotechnologique, ce micro-organisme pourrait être un bon candidat pour augmenter la teneur en cobalamine dans les aliments fermentés. Une limitation importante de cette projection est le fait que la cobalamine n'est pas excrétée et reste dans le cytoplasme. Une alternative pour contourner ce problème serait l'isolement de mutants autolytiques (par exemple, pendant le transit dans l'estomac) qui libéreraient la cobalamine dans le tractus gastro-intestinal.

Cependant, ces valeurs pourraient être considérées comme adéquates si l'on tient compte des besoins quotidiens en vitamine B12 (2-3 µg pour un adulte) car elles pourraient être suffisantes pour le développement d'aliments bio-enrichis en B12 (**Santos et al., 2007**).



**Figure 6 :** Productivité bactérienne en cobalamine (vitamine B12) telle que estimée par la méthode au cyanide de potassium chez les isolats bénéfiques d'origine lait humain.

# **Conclusion**

## Conclusion

La vitamine B12 ou cobalamine est indispensable pour l'organisme vu sa participation dans plusieurs réactions métaboliques essentielles. Cependant, l'homme ne peut pas la synthétiser ce qui exige un apport exogène pour éviter les conséquences indésirables de sa carence. Diverses études ont montré que les bactéries lactiques peuvent augmenter les niveaux de cobalamine dans les aliments. Dans ce contexte, ce travail a été réalisé sur des bactéries lactiques isolées du lait humain et de fèces de bébés en bonne santé et nourris exclusivement au sein. Onze souches fécales appartenant à l'espèce *Lactobacillus fermentum*, sept d'autres d'origine lait à *Lactobacillus plantarum*, ont été examinées pour leurs capacités antioxydante, antimicrobienne et à synthétiser la cobalamine.

Les activités de piégeage des radicaux libres DPPH de nos isolats probiotiques variaient de 16 à 32.1%. Toutefois, il y a une disparité dans ce pouvoir antioxydant entre les isolats d'origine lait humain et ceux de fèces de bébés. Par la méthode de FRAP, les données n'ont pas été changées, les activités antioxydantes étaient inférieures à 1 chez les souches lactiques SL3, SL7 et SL9 et de l'ordre de 1.34% chez l'isolat SL4 qui marque sa supériorité. Les souches intestinales marquaient des activités antioxydantes allant de 1.22-1.48%, exceptées SS10 et SS11 dont les valeurs étaient inférieures à 1%.

Les surnageants obtenus à partir des 11 isolats fécaux ont présenté des degrés variables d'activités inhibitrices. L'isolat d'origine fécale le plus intéressant était le SS8 où les diamètres d'inhibition calculés étaient tous supérieurs ou égales à 10 mm, excepté contre les deux pathogènes *S. aureus* et *Klebsiella pneumoniae* où des zones d'inhibition de diamètres de 8 à 9 mm ont été notées. Les surnageants obtenus à partir des sept isolats lactiques d'origine lait maternel ont aussi présenté des degrés variables d'activités inhibitrices et qui sembleraient plus intéressantes comparées à celles calculées pour les isolats bénéfiques fécaux.

Les isolats bénéfiques étaient aussi tous capables de sécréter la cobalamine. L'analyse spectrophotométrique de la vitamine B12 produite par nos souches isolées révèle une similitude dans cette productivité estimée aux deux longueurs d'onde  $\lambda=240$  et 245 nm. Ces quantités en cobalamine bactérienne produite représentent le  $\frac{1}{4}$  de la quantité moyenne journalière et nécessaire pour un adolescent en croissance, même si d'autres aliments et produits consommés tout au long de la journée pourraient aussi couvrir les besoins en vitamine B12. D'un point de vue biotechnologique, ces micro-organismes pourraient être de bons candidats pour augmenter *in situ* la teneur en cobalamine dans les aliments probiotiques fermentés.

# **Les références bibliographiques**

## Les Références bibliographiques

**Aazmi, S. ; The, L.K. ; Ramasamy, K. ; Rahman, T. ; Salleh, M.Z.** Comparison of the anti-obesity and hypocholesterolaemic effects of single *Lactobacillus casei* strain Shirota and probiotic cocktail. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2015, 50, 1589–1597. [CrossRef]

**Anadón, A. ; Castellano, V. ; Martínez-Larrañaga, M.R.** Regulation and guidelines of probiotics and prebiotics. In *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health* ; Ötles, S., Ed. ; CRC Press, LLC Taylor & Francis Group : Boca Raton, FL, USA, 2014 ; pp. 91–113. ISBN 978-1-4665-8623-9.

**Asrar, F.M. and O'Connor, D.L. (2005)** Bacterially synthesized folate and supplemental folic acid are absorbed across the large intestine of piglets. *J Nutr Biochem* 16, 587–593.

**Azad, M.A.K. ; Sarker, M. ; Wan, D.** Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles. *BioMed Res. Int.* 2018, 2018, 8063647. [CrossRef]

**Bacher, A., Eberhardt, S., and Richter, G. (1996)** Biosynthesis of riboflavin. In : *Escherichia coli and Salmonella : Cellular and Molecular Biology* ((eds) F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L.L. Ingraham, et al.) ASM Press, Washington, D.C., pp. 657–664.

**Baines, M., Kredan, M.B., Usher, J., et al. (2007)** The association of homocysteine and its determinants MTHFR genotype, folate, vitamin B12 and vitamin B6 with bone mineral density in postmenopausal British women. *Bone* 40, 730–736.

**Basavanna, G. and Prapulla, S.G. (2013)** Evaluation of functional aspects of *Lactobacillus fermentum* CFR 2195 isolated from breast fed healthy infants' fecal matter. *J Food Sci Technol* 50, 360–366.

**Bates, C.J. (1993)** Folic Acid. In : *Encyclopaedia of Food Science Food Technology and Nutrition* ((eds) R. Macrae R.K. Robinson, and M.J. Sadler, M.J) Academic Press, London, pp.1936–1944.

**Battersby, A.R. (1994)** How nature builds the pigments of life : the conquest of vitamin B12. *Science* 264, 1551–1557.

**Beck, W.S. (2001)** Cobalamin (Vitamin B12). In : *Handbook of Vitamins* ((eds) R. Rucker, J. Sutie, D. McCormick, and L.J. Machlin), 3rd Edn, Marcell Dekker, New York, pp. 463–512.

**Bokhorst, V.V. ; Van, H. ; Bron, P.A. ; Kleerebezem, M.** Improving the digestive tract robustness of probiotic Lactobacilli. In *Probiotics and Prebiotics : Current Research and Future Trends* ; Caister Academic Press : Norfolk, UK, 2015 ; pp. 195–204.

**Borresen, E.C. ; Henderson, A.J. ; Kumar, A. ; Weir, T.L. ; Ryan, E.P.** Fermented foods : Patented approaches and formulations for nutritional supplementation and health promotion. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 2012, 4, 134–140. [CrossRef]

**Brandao, R.L.; Castro, I.M.; Bambirra, E.A.; Amaral, S.C.; Fietto, L.G.; Tropia, M.J.M.** Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998,64, 564–568. [CrossRef]

**Byrd, A.L. ; Belkaid, Y. ; Segre, J.A.** The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018, 16, 143–155. [CrossRef] [PubMed]

**Camilo, E., Zimmerman, J., Mason, J.B., et al. (1996)** Folate synthesized by bacteria in the human upper small intestine is assimilated by the host. *Gastroenterology* 110, 991–998.

**Capozzi, V., Menga, V., Digesu, et al. (2011)** Biotechnological production of vitamin B2-enriched bread and pasta. *J Agric Food Chem* 59, 8013–8020.

**Carter, A.; Adams, M.; La Ragione, R.M.; Woodward, M.J.** Colonisation of poultry by *Salmonella Enteritidis* S1400 is reduced by combined administration of *Lactobacillus alivarius* 59 and *Enterococcus faecium* PXN-33. *Vet. Microbiol.* 2017, 199, 100–107. [CrossRef] [PubMed]

**Cenit, M. ; Olivares, M. ; Codoñer-Franch, P. ; Sanz, Y.** Intestinal microbiota and celiac disease : Cause, consequence or co-evolution ? *Nutrients* 2015, 7, 6900–6923. [CrossRef]

**Chan, P.A.; Robinette, A.; Montgomery, M.; Almonte, A.; CuUvin, S.; Lonks, J.R.; Chapin, K.C.; Kojic, E.M.; Hardy, E.J.** Extra genital infections caused by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: A review of the literature. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2016, 5758387, 17.

**Chen, X.; Yang, G.; Song, J.H.; Xu, H.; Li, D.; Goldsmith, J.; Zeng, H.; Parsons-Wingerter, P.A.; Reinecker, H.-C.; Kelly, C.P.** Probiotic yeast inhibits VEGFR signaling and angiogenesis in intestinal inflammation. *PLoS ONE* 2013, 8, 1–7. [CrossRef] [PubMed]



**Chingwaru, W. ; Vidmar, J.** Potential of commercial probiotic products and strains *Lactobacillus plantarum* as prophylaxis and therapy against diarrhea caused by *Escherichia coli* in children. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2017, 10, 57–63. [CrossRef]

**Cho, I. ; Blaser, M.J.** The human microbiome : At the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 2012, 13, 260–270. [CrossRef]

**Chung, H. ; Pamp, S.J. ; Hill, J.A. ; Surana, N.K. ; Edelman, S.M. ; Troy, E.B. ; Reading, N.C. ; Villablanca, E.J. ; Wang, S. ; Mora, J.R. ; et al.** Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* 2012, 149, 1578–1593. [CrossRef]

**Cinque, B. ; Palumbo, P. ; La Torre, C. ; Melchiorre, E. ; Corridoni, D. ; Miconi, G. ; Di Marzio, L. ; Cifone, M.G. ; Giuliano, M.** Probiotics in aging skin. In *Textbook of Aging Skin* ; Springer : Berlin/Heidelberg, Germany, 2017 ; pp. 1315–1327.

**Collins, F.L. ; Kim, S.M. ; McCabe, L.R. ; Weaver, C.M.** Intestinal microbiota and bone health : The role of prebiotics, probiotics, and diet. In *Bone Toxicology* ; Springer : Cham, Switzerland, 2017 ; pp. 417–443.

**Cortés-Zavaleta, O. ; López-Malo, A. ; Hernández-Mendoza, A. ; García, H.S.** Antifungal activity of *Lactobacilli* and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 173, 30–35. [CrossRef]

**Cremon, C. ; Barbaro, M.R. ; Ventura, M. ; Barbara, G.** Pre- and probiotic overview. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2018, 43, 87–92. [CrossRef]

**Daniel, R., Bobik, T.A., and Gottschalk, G. (1998)** Biochemistry of coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes. *FEMS Microbiol Rev* 22, 553–566.

**De Montijo-Prieto, S. ; Moreno, E. ; Bergillos-Meca, T. ; Lasserrot, A. ; Ruiz-López, M. ; Ruiz-Bravo, A. ; Jimenez-Valera, M.** A *Lactobacillus plantarum* strain isolated from kefir protects against intestinal infection with *Yersinia enterocolitica* O9 and modulates immunity in mice. *Res. Microbiol.* 2015, 166, 626–632. [CrossRef]

**De Montijo-Prieto, S. ; Moreno, E. ; Bergillos-Meca, T. ; Lasserrot, A. ; Ruiz-López, M. ; Ruiz-Bravo, A. ; Jimenez-Valera, M.** A *Lactobacillus plantarum* strain isolated from kefir

protects against intestinal infection with *Yersinia enterocolitica* O9 and modulates immunity in mice. Res. Microbiol.2015,166,626–632. [CrossRef]

**Durga, J., van Boxtel, M.P., Schouten, E.G., et al. (2007a)** Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial : a randomised, double blind, controlled trial. Lancet 369, 208–216.

**Duthie, S.J., Narayanan, S., Brand, G.M., et al. (2002)** Impact of folate deficiency on DNA stability. J Nutr 132, 2444S–2449S.

**ENNyS (2007)** Encuesta Nacional de Nutrición y Salud. Dirección Nacional de Salud Materno Infantil - Ministerio de Salud – Argentina, <http://msal.gov.ar/htm/Site/ennys/site/default.asp>.

**Escalante-Semerena, J.C. (2007)** Conversion of cobinamide into adenosylcobamide in bacteria and archaea. J Bacteriol 189, 4555–4560.

**European Food Safety Authority (EFSA).** Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA (2017 update). EFSA J.2017, 15, 1–177.

**Ewe, J.A., Wan-Abdullah, W.N., and Liong, M.T. (2010)** Viability and growth characteristics of *Lactobacillus* in soymilk supplemented with B-vitamins. Int J Food Sci Nutr 61, 87–107.

**FAO/WHO (2002)** Human vitamin and mineral requirements. In : Human Vitamin and Mineral Requirements. Bangkok, Thailand.

**Folkman, J.** Angiogenesis. Annu. Rev. Med.2006, 57, 1–18. [CrossRef]

**Gangadharan, D. and Nampoothiri, K.M. (2011)** Folate production using *Lactococcus lactis* ssp cremoris with implications for fortification of skim milk and fruit juices. LWT - Food Sci Technol 44, 1859–1864.

**Ghosh D. and Chattopadhyay P. (2012)** Preparation of idli batter, its properties and nutritional improvement during fermentation. J Food Sci Technol 48, 610–615.

**Gómez-Gallegos, C. ; Salminen, S.** Novel probiotics and prebiotics : How Can they help in human gut microbiota dysbiosis ? Appl. Food Biotechnol.2016, 3, 72–81.

**Guarner, F. ; Schaafsma, G.J. Probiotics. Int. J. Food Microbiol.**1998, 39, 237–238.  
[CrossRef]

**Guarner,F.;Khan,A.G.;Garisch,J.;Eliakim,R.;Gangl,A.;Thomson,A.;Krabshuis,J.;Lemair,T.;Kaufmann,P.; de Paula, J.A.; et al.** World Gastroenterology Organisation Global Guidelines : Probiotics and prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.*2012, 46, 468–481. [CrossRef]  
[PubMed]

**Guillot, J.F.** Probiotic feed additives. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*2003, 26, 52–55.

**Gupta, V. ; Garg, R. Probiotics. Ind. J. Med. Microbiol.**2009, 27, 202–209. [CrossRef]  
[PubMed]

**Hanchi, H. ; Mottawea, W. ; Sebei, K. ; Hammami, R.** The Genus *Enterococcus* : Between Probiotic Potential and Safety Concerns-An Update. *Front. Microbiol.*2018, 9, 1791.  
[CrossRef]

**Hanson,L.;Vusse,L.V.;Jerme,M.;Abad,C.L.;Safdar,N.**Probiotics for treatment and prevention of urogenital infectionsinwomen: Asystematicreview .*J.Midwifery Womens Health* 2016, 61,339–355. [CrossRef][PubMed]

**Hao, Q. ; Dong, B.R. ; Wu, T.**Probiotics for preventing acuteupperrespiratorytract infections. *CochraneDatabase Syst. Rev.*2015, 2, CD006895. [CrossRef]

**Herbert, V. (1996)** Vitamin B12. In : *Present Knowledge in Nutrition* ((eds) E.E. Ziegler and L.J. Filer, L.J), ILSI Press, Washington D.C., pp. 191–205.

**Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al.** The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*2014, 11, 506–514. [CrossRef]

**Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al.** The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*2014, 11, 506–514. [CrossRef]

**Hsiao, E.Y. ; McBride, S.W. ; Hsien, S. ; Sharon, G. ; Hyde, E.R. ; McCue, T. ; Codelli, J.A. ; Chow, J. ; Reisman, S.E. ; Petrosino, J.F. ; et al.** Microbiota modulate behavioral

and physiological abnormalities associated with neuro-developmental disorders. *Cell* 2013, 155, 1451–1463. [CrossRef]

**Hüfner, E., Britton, R.A., Roos, S., et al. (2008)** Global transcriptional response of *Lactobacillus reuteri* to the sourdough environment. *Syst Appl Microbiol* 31, 323–338.

**Hughenoltz, J. and Smid, E.J. (2002)** Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* 13, 497–507.

**Hungin, A.P.S. ; Mitchell, C.R. ; Whorwell, P. ; Mulligan, C. ; Cole, O. ; Agréus, L. ; Fracasso, P. ; Lionis, C. ; Mendive, J. ; de Foy, J.-P.** Systematic review : Probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms—An updated evidence-based international consensus. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2018, 47, 1054–1070. [CrossRef]

**Hussain, S.A. ; Patil, G.R. ; Reddi, S. ; Yadav, V. ; Pothuraju, R. ; Singh, R.R.B. ; Kapila, S.** Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) supplemented probiotic lassi prevents *Shigella* infiltration from epithelial barrier into systemic blood flow in mice model. *Microb. Pathog.* 2017, 102, 143–147. [CrossRef]

**Isolauri, E.; Sutas, Y.; Kankaanpaa, P.; Arvilommi, H.; Salminen, S.** Probiotics: Effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, 73, 444–450. [CrossRef]

**Lee, N.K.; Kim, S.Y.; Han, K.J.; Eom, S.J.; Paik, H.D.** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters. *LWT-Food Sci. Technol.* 2014, 58, 130–134. [CrossRef]

**Jimmy Saint Cyr, M.; Haddad, N. ; Taminiou, B. ; Poezevara, T. ; Quesne, S.; Amelot, M. ; Daube, G. ; Chemaly, M.; Dousset, X.; Guyard-Nicodème, M.** Use of the potential probiotic strain *Lactobacillus salivarius* SMXD51 to control *Campylobacter jejuni* in broilers. *Int. J. Food Microbiol.* 2017, 247, 9–17. [CrossRef] [PubMed]

**Johnston, B.C. ; Supina, A.L. ; Vohra, S.** Probiotics for pediatric antibiotic-associated diarrhea : A meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *CMAJ* 2006, 175, 377–383. [CrossRef]

**Juarez del Valle, M., Laiño, J., Savoy de Giori, G., and LeBlanc, J.G. (2014)** Use of lactic acid bacteria as a biotechnological strategy to increase riboflavin levels in soymilk. *Food Res Int* 62, 1015–1019.

**Kailasapathy, K. ; Chin, J.C.** Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol. Biol.*2000, 78, 80–88. [CrossRef] 207. Shah, N.P. Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.*2007, 17, 1262–1277. [CrossRef]

**Kang, H.J. ; Im, S.H.** Probiotics as an Immune Modulator. *J. Nutr. Sci. Vitam.*2015, 61, S103–S105. [CrossRef] [PubMed]

**Kaprasob, R. ; Kerdchoechuen, O. ; Laohakunjit, N. ; Somboonpanyakul, P.** B vitamins and prebiotic fructooligosaccharides of cashew apple fermented with probiotic strains *Lactobacillus* spp. *Leuconostoc mesenteroides* and *Bifidobacterium longum*. *Process. Biochem.*2018, 70, 9–19. [CrossRef]

**Kemgang, T.S.; Kapila, S.; Shanmugam, V.P.; Kapila, R.** Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system. *J. Appl. Microbiol.*2014, 117, 303–319. [CrossRef]

**Aazmi, S. ; The, L.K.; Ramasamy, K.; Rahman, T.; Salleh, M.Z.** Comparison of the anti-obesity and hypocholesterolaemic effects of single *Lactobacillus casei* strain Shirota and probiotic cocktail. *Int. J. Food Sci. Technol.*2015, 50, 1589–1597. [CrossRef]

**King, S. ; Glanville, J. ; Sanders, M.E. ; Fitzgerald, A. ; Varley, D.** Effectiveness of probiotics on the duration of illness in healthy children and adults who develop common acute respiratory infectious conditions : A systematic review and meta-analysis. *Br. J. Nutr.*2014, 112, 41–54. [CrossRef] [PubMed]

**Kosin, B. ; Rakshit, S.K.** Criteria for production of probiotics. *Food Technol. Biotechnol.*2006, 44, 371–379.

**Krause, L.J., Forsberg, C.W., and O'Connor, D.L. (1996)** Feeding human milk to rats increases *Bifidobacterium* in the cecum and colon which correlates with enhanced folate status. *J Nutr* 126, 1505–1511.

**Kukanova, A., Zhdanov, V.G., and Stepanov, A.I. (1982)** *Bacillus subtilis* mutants resistant to roseoflavin. *Genetika* 18, 319–321.

**Kwon, J.E. ; Lim, J. ; Bang, I. ; Kim, I. ; Kim, D. ; Kang, S.C.** Fermentation product with new equol-producing *Lactobacillus paracasei* as a probiotic like product candidate for prevention of skin and intestinal disorder. *J. Sci. Food Agric.*2019, 99, 4200–4210. [CrossRef]

**Lagier, J.C.; Khelaifia, S.; Alou, M.T.; Ndongo, S.; Dione, N.; Hugon, P.; Caputo, A.; Cadoret, F.; Traore, S.I.; Seck, E.H.; et al.** Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat. Microbiol.* 2016, 1, 16203. [CrossRef]

**Laiño, J.E., Juarez del Valle, M., Savoy de Giori, G. and LeBlanc J. G. (2014)** Applicability of a *Lactobacillus amylovorus* strain as Co-culture for natural folate bio-enrichment of fermented milk. *Int J Food Microb* 191, 10–16 (2014)

**Laiño, J.E., Juarez del Valle, M., Savoy de Giori, G., and LeBlanc, J.G. (2013)** Development of a high folate concentration yogurt naturally bio-enriched using selected lactic acid bacteria. *LWT - Food Sci Technol* 54, 1–5.

**Lakritz, J.R.; Poutahidis, T.; Levkovich, T.; Varian, B.J.; Ibrahim, Y.M.; Chatzigiagkos, A.; Mirabal, S.; Alm, E.J.; Erdman, S.E.** Beneficial bacteria stimulate host immune cells to counteract dietary and genetic predisposition to mammary cancer in mice. *Int. J. Cancer* 2014, 135, 529–540. [CrossRef] [PubMed]

**Lange, K. ; Buerger, M. ; Stallmach, A. ; Bruns, T.** Effects of antibiotics on gut microbiota. *Dig. Dis.* 2016, 34, 260–268. [CrossRef]

**Lebeer, S. ; Bron, P.A. ; Marco, M.L. ; Van Pijkeren, J.P. ; O’Connell Motherway, M. ; Hill, C. ; Pot, B. ; Ross, S. ; Klaenhammer, T.** Identification of probiotic effector molecules : Present state and future perspectives. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018, 49, 217–223. [CrossRef]

**LeBlanc, J.G., Laiño, J.E., Juarez del Valle, et al. (2011)** B-group vitamin production by lactic acid bacteria - Current knowledge and potential applications. *J Appl Microbiol* 111, 1297–309.

**LeBlanc, J.G., Milani, C., Savoy de Giori, G., et al. (2013)** Bacteria as vitamin suppliers to their host : a gut microbiota perspective. *Cur Opin Biotechnol* 24, 160–168.

**LeBlanc, J.G., Rutten, G., Bruinenberg, P., et al. (2016)** A novel dairy product fermented with *Propionibacterium freudenreichii* improves the riboflavin status of deficient rats. *Nutrition* 22, 645–651.

**Lee, Y.K.** Selection and maintenance of probiotic microorganisms. In Handbook of Probiotics and Prebiotics ; Lee, Y.K., Salminen, S., Eds. ; Wiley-VCH : Weinheim, Germany, 2009 ; pp. 177–187.

**Leiva-Gea, I.; Sánchez-Alcoholado, L.; Martín-Tejedor, B.; Castellano Castillo, D.; Moreno-Indias, I.; Urda-Cardona, A.; Tinahones, F.J.; Fernández-García, J.C.; Queipo-Ortuño, M.I.** Gut microbiota differs in composition and functionality between children with Type 1 diabetes and MODY2 and healthy control subjects: A case-control study. *Diabetes Care* 2018, 41, 2385–2395. [CrossRef] [PubMed]

**Lin, M. Y., & Yen, C. L.. (1999).** Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: 10.1021/jf981149

**Luchsinger, J.A., Tang, M.X., Miller, J., et al. (2007)** Relation of higher folate intake to lower risk of Alzheimer disease in the elderly. *Arch Neurol* 64, 86–92.

**Lucock, M. and Yates, Z. (2005)** Folic acid - vitamin and panacea or genetic time bomb ? *Nature Rev Gen* 6, 235–240.

**Man, Z.W., Rao, Z.M., Cheng, Y.P., et al. (2014)** Enhanced riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RF1 through the optimization of agitation speed. *World J Microbiol Biotechnol* 30, 661–667.

**Mansfield, J.A.; Bergin, S.W.; Cooper, J.R.; Olsen, C.H.** Comparative probiotics train efficacy the prevention of eczema in infants and children : A systematic review and meta-analysis. *Mil. Med.* 2014, 179, 580–592. [CrossRef]

**Mardini, H.E. ; Grigorian, A.Y.** Probiotic mix VSL#3 is effective adjunctive therapy for mild to moderately active ulcerative colitis : A meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2014, 20, 1562–1567. [PubMed]

**Martens, J.H., Barg, H., Warren, M.J., and Jahn, D. (2002)** Microbial production of vitamin B12. *Appl Microbiol Biotechnol* 58, 275–285.

**Martin, R., Olivares, M., Marin, M.L., et al. (2005)** Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *Int J Food Microbiol* 104, 267–277.

**Masuda, M., Ide, M., Utsumi, H., et al. (2012)** Production potency of folate, vitamin B(12), and thiamine by lactic acid bacteria isolated from Japanese pickles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 76, 2061–2067.

**Matamoros, S. ; Gras-Leguen, C. ; Le Vacon, F. ; Potel, G. ; De La Cochetiere, M.F.** Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol.*2013, 21, 167–173. [CrossRef] [PubMed]

**Maurice, C.F. ; Haiser, H.J. ; Turnbaugh, P.J.** Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell*2013, 152, 39–50. [CrossRef]

**Mayer, E.A. ; Tillisch, K. ; Gupta, A.** Gut/brain axis and the microbiota. *J. Clin. Investig.*2015, 125, 926–938. [CrossRef]

**Molina, V., Medici, M., Font de Valdez, G., and Taranto, M.P. (2013)** Soybean-based functional food with vitamin B12- Producing lactic acid bacteria. *J Funct Food* 4, 831–836.

**Morris, M.C. and Tangney, C.C. (2007)** Is dietary intake of folate too low ? *Lancet* 369, 166–167.

**O'Brien, M.M., Kiely, M., Harrington, K.E., et al. (2001)** The North/South Ireland Food Consumption Survey : vitamin intakes en 18–64-year-old adults. *Public Health Nutrition* 4, 1069–1079.

**Oak, S.J. ; Jha, R.** The effects of probiotics in lactose intolerance : A systematic review. *Crit. Rev. FoodSci. Nutr.* 2018, 9, 1–9. [CrossRef]

**Oelschlaeger, T.A.** Mechanisms of probiotic actions—A review. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010, 300, 57–62. [CrossRef]

**Olaniyi, R.; Pozzi, C.; Grimaldi, L.; Bagnoli, F.** Staphylococcus aureus-associated skin and soft tissue infections: Anatomical localization, epidemiology, therapy and potential prophylaxis. In *Staphylococcus aureus* ; Bagnoli, F., Rappuoli, R., Grandi, G., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2016; pp. 199–227.

**Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction. *Japanese Journal of Nutrition & Dietetics*, 44(6), 307-316. DOI: 10.5264/eiyogakuzashi.44.307.

**Parker, R.** Probiotic guideline for necrotizing enterocolitis prevention in very low-birth-weight neonates. *Adv. Neonatal Care*2014, 14, 88–95. [CrossRef]



**Perkins, J.B. and Pero, J. (2002)** Vitamin biosynthesis. In : *Bacillus subtilis and its Closest Relatives from Genes to Cells*, ((eds) A. Sonenshein, J. Hoch, and R. Losick), ASM Press, Washington, D.C., pp. 271–286.

**Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., et al. (2007)** Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Appl Environ Microbiol* 73, 179–185.

**Putman, J. and Allshouse, J. (2003)** Trends in U.S. per capita consumption of dairy products, 1909 to 2001 : United States Department of Agriculture Economic Research Service.

**Rodionov, D.A., Vitreschak, A.G., Mironov, A.A., and Gelfand, M.S. (2003)** Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in prokaryotes. *J Biol Chem* 278, 41148–41159.

**Rowland, I.; Gibson, G.; Heinken, A.; Scott, K.; Swann, J.; Thiele, I.; Tuohy, K.** Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* 2018, 57, 1–24. [CrossRef]

**Rucker, R.B., Suttie, J.W., McCormick, D.B., and Machlin, L.T. (2001)** *Handbook of Vitamins*. Marcel Dekker Inc., New York.

**Russo, P., Capozzi, V., Arena, M.P., et al. (2014)** Riboflavin-overproducing strains of *Lactobacillus fermentum* for riboflavin-enriched bread. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 3691–3700.

**Said, H.M. and Mohammed, Z.M. (2006)** Intestinal absorption of water soluble vitamins : an update. *Curr Opin Gastroenterol* 22, 140–146.

**Santos, F., Vera, J.L., Lamosa, P., et al. (2007)** Pseudovitamin B(12) is the corrinoid produced by *Lactobacillus reuteri* CRL1098 under anaerobic conditions. *FEBS Lett* 581, 4865–4870.

**Schoster, A.; Kokotovic, B.; Permin, A.; Pedersen, P.D.; Dal Bello, F.; Guardabassi, L.** In Vitro inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains. *Anaerobe* 2013, 20, 36–41. [CrossRef] [PubMed]

**Scott, J.M. (1999)** Folate and vitamin B12. *P Nutr Soc* 58, 441–448.

**Shanahan, F.; Dinan, T.G.; Ross, P.; Hill, C.** Probiotics in transition. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2012, 10, 1220–1224. [CrossRef]

**Sherwood, K.L., Houghton, L.A., Tarasuk, V., and O'Connor, D.L. (2006)** One-third of pregnant and lactating women may not be meeting their folate requirements from diet alone based on mandated levels of folic acid fortification. *J Nutr* 136, 2820–2826.

**Sikorski, H. ; Smoragiewicz, W.** Role of probiotics in the prevention and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2013, 42, 475–481. [CrossRef]

**Smith, A.G., Croft, M.T., Moulin, M., and Webb, M.E. (2007)** Plants need their vitamins too. *Cur Opin Plant Biol* 10, 266–275.

**Snydman, D.R.** The safety of probiotics. *Clin. Infect. Dis.* 2008, 46, S104–S111. [CrossRef]

**Taranto, M.P., Vera, J.L., Hugenholtz, J., et al. (2003)** *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *J Bacteriol* 185, 5643–5647.

**Thibaut, D., Blanche, F., Cameron, B., et al. (1998)** Vitamin B12 biosynthesis in *Pseudomonas denitrificans*. In : *Vitamin B12 and B12-Proteins* ((eds) B. Kräutler, D. Arigoni, D., and B.T. Golding), Wiley/VCH, Weinheim, pp. 63–67.

**Tjonneland, A., Christensen, J., Olsen, A., et al. (2006)** Folate intake, alcohol and risk of breast cancer among postmenopausal women in Denmark. *Eur J Clin Nutr* 60, 280–286.

**Van Guelpen, B., Hultdin, J., Johansson, I., et al. (2006)** Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut* 55, 1461–1466.

**Vandenbergh, P.A.** Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 1993, 12, 221–238. [CrossRef]

**Velasquez-Manoff, M.** Gut microbiome : The peacekeepers. *Nature* 2015, 518, S3–S11. [CrossRef]

**Ventura, M., Canchaya, C., Fitzgerald, G.F., et al. (2007)** Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation : the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91, 351–72.

**Waigankar, S.S. Patel, V.** Role of probiotics in urogenital healthcare. *J. Mid Life Health* 2011, 2, 5–10. [CrossRef]

**Wang, L. ; Guo, M.J. ; Gao, Q. ; Yang, J.F. ; Yang, L. ; Pang, X.L. ; Jiang, X.J.** The effects of probiotics on total cholesterol : A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)* 2018, 97, e9679. [CrossRef] [PubMed]

**Zelaya, H.; Tsukida, K.; Chiba, E.; Marranzino, G.; Alvarez, S.; Kitazawa, H.; Agüero, G.; Villena, J.** Immunobiotic Lactobacilli reduce viral-associated pulmonary damage through the modulation of inflammation-coagulation interactions. *Int. Immunopharmacol.* 2014, 19, 161–173. [CrossRef]

**Kechagia, M.; Basoulis, D.; Konstantopoulou, S.; Dimitriadi, D.; Gyftopoulou, K.; Skarmoutsou, N.; Fakiri, E.M.** Health benefits of probiotics: A review. *ISRN Nutr.* 2013, 2013, 481651. [CrossRef]

**Zommiti, M. ; Cambronel, M. ; Maillot, O. ; Barreau, M. ; Sebei, K. ; Feuilloy, M. ; Ferchichi, M. ; Connil, N.** Evaluation of Probiotic Properties and Safety of *Enterococcus faecium* Isolated from Artisanal Tunisian Meat “Dried Ossban”. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 1685. [CrossRef] [PubMed]

**Zommiti, M.; Bouffartigues, E.; Maillot, O.; Barreau, M.; Szunerits, S.; Sebei, K.; Feuilloy, M.; Connil, N.; Ferchichi, M.** In vitro Assessment of the Probiotic Properties and Bacteriocinogenic Potential of *Pediococcus pentosaceus* MZF16 Isolated from Artisanal Tunisian Meat “Dried Ossban”. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 2607. [CrossRef] [PubMed]

**Zommiti, M.; Connil, N.; Ben Hamida, J.; Ferchichi, M.** Probiotic Characteristics of *Lactobacillus curvatus* DN317, a Strain Isolated from Chicken Ceca. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 2017, 9, 415–424. [CrossRef]

# **Annexe**

### Milieu spécifique

Composition	g/L
Hydrolysats de caséine	15 g
D glucose	40 g
Acétate de Na	20 g
Ac. ascorbique	4 g
L- cystéine	0,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Sulfate Mg	0,4 g
Sulfate Mn	0,02 g
NaCl	0,02 g
Sulfate de fer 2	0,02 g
Tween	2 g
Pyridoxal	8,5 mg
Ac. folique	200µg
Peptone	1g

pH= 6,1. Autoclavage 121°C pendant 15 min, sauf le complexe vitaminique à filtrer par millipore.

### Courbe d'étalonnage

