

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى

Université Mohamed Seddik Benyahia de Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de
la vie

Département : Microbiologie
Appliquée et Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم: الميكروبيولوجيا التطبيقية و علوم التغذية

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**EVALUATION DU POUVOIR ANTIBACTERIEN ET ANTIOXYDANT DES
BACTERIES LACTIQUES DE LA FLORE INTESTINALE DES NOURRISSONS**

Membres de Jury

Présidente : Dr AKROUM. S

Examinatrice : Dr/ LAGGOUNE. S

Encadreur : Pr/ SIFOUR. M

Présenté par :

BOUHANNA Aldjia

BOUHANNA Bouchra

Année Universitaire 2017-2018

Remerciements

Avant tout, nous remercions "Allah" le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail ,merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*Nous tenons d'abord à remercier très chaleureusement notre promoteur Mr **SIFOURE. M** qui nous a permis de bénéficier de son encadrement, ses conseils qu'il nous a prodigués, sa patience, sa confiance qu'il nous a témoignés et qui ont été déterminantes dans la réalisation de notre travail.*

*Nos remerciements s'étendent également à Mr **KHANOUF .T** pour les précieux conseils.*

Nous voudrions également remercier les membres de Jury qui ont bien voulu jugé ce travail :

***Dr/AKROUM**, qui nous a fait l'honneur de présider ce jury, **Dr/LAGGOUNE**, qui accepté d'examiner ce travail.*

Nos remerciements vont plus particulièrement à nos familles qui ont su nous soutenir tout au long de nos études, Merci à toutes les personnes du laboratoire de microbiologie, ainsi que toutes personnes de près ou de loin, qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers ;

A ma chère mère ; **Farida**....

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que vous m'accompagne toujours.

A mon chère père ; **Abd elhak**....

Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours, puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A mon fiancé **Rekrouk Salah** qui m'a supporté toujours, je te dire merci.

A mes frères **Houssem** et **Ilyes** et mes sœurs **Imane** et son fils **Mohammed raouf** qui je l'aime trop, **Hassiba**, **Nihad**, et la belle **Abir**.

A tous ma famille et mes amies.

A toutes ceux que j'aime et qui je respecte.

Merci à tous

Bouchra

2017-2018



Dédicace

A l'aide de dieu "Allah" tout puissant

Qui m'a tracé le chemin de ma vie,

J'ai pu réaliser ce travail

Je dédie ce travail à ma famille spécialement aux personnes les plus chères au monde. Mes chers parents, qui m'ont apportés leur appui durant toutes mes années d'études, pour leur sacrifices et soutien et qui m'ont donné la confiance, le courage et la sécurité.

A mes frères pour leurs tendresse et leurs permanentes présence à mes côtés, **Farouk, Houda, Dalila, Rima et Romaissa.**

A mon oncle **Abdelhek**, et sa femme **Farida**

A mon binôme Bouchra qui a partagés avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail

A mes très chère amis : **Ahlem, Zineb, Fatiha, Yasmina, Nesrine, Fatima**

A mes collègues au travail

Je le dédie aussi à tous les enseignants de notre faculté qui ont toujours nous guidé tout au long de mon parcours éducatif

Je remercie toutes les personnes que je n'ai pas pu citer leurs noms ici, et qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau 01	Les bactéries lactiques considérées comme probiotiques.	04
Tableau 02	Résultats de différents tests d'identification des souches isolées.	31
Tableau 03	Les valeurs de pH des surnageant avant la neutralisation.	32
Tableau 04	Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches cibles induites par nos bactéries lactiques.	33



Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Figure 01	La balance d'équilibre entre le système antioxydant / pro-oxydant	11
Figure 02	Observation macroscopique des isolats dans le milieu MRS solide et liquide	29
Figure 03	Observation microscopique des souches isolées à l'état frais et après coloration de gram	30
Figure 04	Zones d'inhibition de la bactérie <i>Pseudomonas</i> sp. par nos souches à étudies.	32
Figure 05	Diamètres des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne des isolats contre les bactéries cibles	34
Figure 06	Résultats de pourcentage de piégeage de radical DPPH par notre LAB isolées	36
Figure 07	La croissance des LAB isolées en absence et en présence de peroxyde d'hydrogène à différentes concentration.	37
Figure 08	Les pourcentages de piégeage de radical hydroxyle par les LAB isolées.	38
Figure 09	Pourcentage de chélation des ions de fer par notre LAB isolées.	39
Figure 10	Pourcentage d'inhibition d'auto-oxydation de l'acide ascorbique par les bactéries lactiques isolées.	40
Figure 11	Résistance des isolats intéressants au pH 2 au cours du temps.	41
Figure 12	Taux de croissance des souches isolés en absence et en présence de la bile en différente concentration au cours du temps.	43
Figure 13	Le pourcentage de la survie des souches isolés dans la concentration 0.1% et 0.3% de la bile au cours du temps.	45

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

DPPH : 1.1- Diphenyl-2- picryl hydrazyl

G : Guanine

C : Cytosine

GSH : Glutathione

LAB: Lactic Acid Bacteria

MRS: Man-Rogosa Sharp

PBS: Phosphate Buffer Saline

ROS: Reactive oxygen Species

Rpm: Round per minute

SOD: Superoxide Dismutase

TCA: Trichloroacetic acid

CO₂: Dioxyde de carbone

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

AAT: Activité antioxydante totale

OMS : Organisation mondiale de la santé

FAO: Food and Agriculture Organization

ATTC: American Type Culture Collection



Table des matières

Introduction

Partie I : synthèse bibliographique

I. Généralité sur les bactéries lactiques.....	03
I.1. Les bactéries lactiques.....	03
I.2. Les bactéries à caractère probiotiques.....	03
I.3. Rôle des bactéries lactique intestinales.....	04
II. Activité antimicrobienne.....	06
II.1. Métabolites antimicrobiennes des bactéries lactiques.....	06
II.1.1. Les acides organiques.....	06
II.1.2. Le peroxyde d'hydrogène.....	06
II.1.3. Dioxyde de carbone.....	07
II.1.4. Diacetyl.....	07
II.1.5. Bactériocine.....	08
II.1.5.1. Synthèse.....	08
II.1.5.2. Classification.....	09
II.1.5.3. Mode d'action.....	09
III. Activité antioxydante.....	10
III.1. Stress oxydative.....	10
III.1.1. Définition.....	10
III.1.2. Espèce réactive d'oxygène.....	11
III.1.3. Principaux radicaux libres.....	11
III.1.4. Trouble causés par les radicaux libres.....	12
III.1.4.1. Effet sur l'ADN.....	12
III.1.4.2. Effet sur les protéines.....	12
III.1.4.3. Effet sur les lipides.....	12

Table des matières

III.1.4.3. Auto oxydation du glucose.....	13
III.1.5. Les maladies associées au stress.....	13
III.2. Les antioxydant.....	13
III.2.1. Classification.....	14
III.2.2. Mode d'action des antioxydants.....	15
III.2.2.1. La détoxification endogène enzymatique des ROS.....	15
III.2.2.2. Substances antiradicalaire non enzymatiques.....	15
III.2.2.3. Piégeur d'oxygène singlet.....	15
III.2.2.4. Les chélateurs des métaux de transition.....	15
III.2.2.5. Effet pro-oxydant.....	16
III.2.3. Rôle des antioxydants dans la prévention contre les maladies.....	16
VI. Caractéristiques des LAB produit les molécules antioxydantes.....	17
VI.1. La résistance au l'oxygène et aux radicaux libres.....	17
VI.1.1. La respiration comme une barrière contre les espèces réactives d'oxygènes.....	17
VI.1.2. La NADH peroxydase.....	18
VI.1.3. L'enzyme SOD.....	18
VI.1.4. Glutathion intracellulaire.....	18
VI.1.5. La protéine Rec A.....	18
VI.1.6. L'adaptation.....	18
VI.2. La production des EPS.....	19
VI.3. La résistance au H ₂ O ₂	19
V .Les LAB probiotiques à caractère antioxydant et la prévention de cancer.....	19

Table des matières

Partie II. Partie expérimentale

I. Appareillages.....	21
II. Méthodes.....	22
II.1. Prélèvement des échantillons.....	22
II.2. Isolement et purification des souches.....	22
II.3. Pré-Identification des souches.....	22
II.3.1. Observation macroscopique.....	23
II.3.2. Observation à l'état frais.....	23
II.3.3. Observation à prés coloration.....	23
II.3.4. Identification biochimique.....	23
II.3.4.1. La recherche de catalase.....	23
II.3.4.2. Type fermentaire.....	23
II.3.4.3. Culture à différentes températures.....	23
II.3.4.4. Culture à différentes concentration de Na Cl.....	24
II.3.4.5. Recherche d'arginine déshydrogénase.....	24
II.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	24
II.5. Evaluation de l'activité anti oxydante.....	25
II.5.1. L'évaluation par la méthode DPPH.....	25
II.5.2. Résistance au peroxyde d'hydrogène.....	25
II.5.3. Capacité de piégeage de radicale hydroxyle.....	26
II.5.4. Capacité de chélation des ions de fer.....	26
II.5.5. Activité anti oxydante totale.....	27
II.6. Caractérisation des souches intéressantes.....	27
II.6.1. La résistance aux sels biliaires.....	27
II.6.2. La résistance au pH acide.....	28

Table des matières

III. Résultats et discussion.....	29
III.1. Isolement et identification des souches.....	29
III.1.1. Observation macroscopique.....	29
III.1.2. Observation microscopique.....	29
III.1.3. Test catalase.....	30
III.1.4. Type fermentaire.....	30
III.1.5. Croissance à différentes température.....	30
III.1.6. Culture dans Na Cl.....	31
III.1.7. Recherche d'arginine déshydrogénase.....	31
III.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	32
III.3. Evaluation de l'activité anti oxydante.....	35
III.3.1. La méthode DPPH.....	35
III.3.2. La résistance au peroxyde d'hydrogène.....	36
III.3.3. Capacité de piégeage des radicaux hydroxyles.....	37
III.3.4. Capacité de chélater les ions de fer.....	39
III.3.5. Capacité d'inhibition d'auto-oxydation de l'ascorbate.....	39
IV. Caractérisation des isolats intéressants.....	40
IV.1. Résistance à l'acide.....	41
IV.2. Résistance à la bile.....	42
Conclusion.....	46
Références bibliographiques.....	47
Annexe	

Introduction

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène de procaryotes, généralement considérées comme GRAS (Generally Recognized As Safe), leur habitat naturel est le tractus intestinal, elles sont choisies préférentiellement comme probiotiques (**Rubio et al., 2014**). Elles exercent un effet bénéfique pour l'hôte lorsqu'elles sont administrées en quantité adéquate (**Balcàzar et al., 2007**). Les bactéries lactiques probiotiques suscitent ces dernières années une attention croissante dans le domaine thérapeutique en raison de leurs avantages tels que la prévention et le renforcement de la défense du corps et l'élimination des pathogènes (**Tang et al., 2016**). Les BL possèdent un effet antimicrobien via la production des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines (**Yang et al., 2012**).

Depuis les années 50, la découverte de Gershman et Hartman "free radical theory" sera le point de départ de nombreuses recherches sur le stress oxydatif (**Haleng et al., 2007**), ce nouveau concept est lié à la production excessive ou à l'accumulation des radicaux libres oxygénés toxiques (**Favier, 2006**). Les espèces réactives détruisent les défenses de l'hôte, attaquent les macromolécules biologiques, les protéines, l'ADN et les lipides, une surproduction de ces espèces conduit à des dommages cellulaires provoquant plusieurs maladies chroniques telles que l'athérosclérose, le diabète, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, le cancer... (**Moon et Shibamoto, 2009, Apak et al., 2016**).

L'organisme possède des systèmes endogènes dédiés à l'action protectrice contre les radicaux libres, il s'agit de molécules dites antioxydantes, qui sont des espèces chimiques plus ou moins complexes capables de diminuer le stress. Cependant, cette ligne de défense est facilement perturbée et pour maintenir l'équilibre entre les prooxydants et les antioxydants, des antioxydants sont souvent utilisés (**Desmier 2016**). La recherche des molécules antioxydantes de natures diverses, à partir des aliments, plantes, microorganismes notamment les bactéries lactiques et en particulier les Lactobacilles et les Bifidobactéries, permet de réduire la concentration des radicaux (**Lin et Chang, 2000**). Les activités antioxydantes des bactéries lactiques éliminent les risques toxicologiques potentiels des molécules antioxydantes utilisées actuellement (**Bougandoura et Bendimerad, 2012**).

L'objectif visé dans ce présent travail est d'isoler et identifier des bactéries lactiques à partir des selles des nourrissons et ensuite d'évaluer leur activité antimicrobienne et antioxydante. Le mémoire est structuré en plusieurs parties. En plus d'une introduction et d'une conclusion générale, le mémoire comprend une synthèse bibliographique mettant l'accent sur les bactéries lactiques, leur métabolisme antimicrobien et leurs activités antioxydantes, et une étude expérimentale regroupant l'isolement,

Introduction

l'identification des bactéries lactiques, la mise en évidence des activités citées précédemment et enfin les principaux résultats obtenus et leur discussion.

Partie I: Synthèse bibliographique

I. Généralités sur les bactéries lactiques

I.1. Les bactéries lactiques

Le terme bactéries lactiques (BL) désigne des bactéries qui produisent de l'acide lactique par fermentation des hydrates de carbones. Ce sont des cellules vivantes procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes, qui poussent seulement sur les milieux complexes. C'est un groupe diversifié de bactéries à Gram positif qui a une teneur de GC inférieure à 50%, caractérisé par une morphologie et une physiologie commune, des cocci ou des bacilles, non sporulées, non mobiles (Aly et al., 2006). Les BL sont des microaérophiles ou des anaérobies facultatifs dépourvus de cytochrome et de catalase, peuvent respirer sous les conditions aérobies en présence de l'hème (certaines possèdent des pseudocatalases) (Aly et al., 2006). Les études taxonomiques suggèrent que le groupe des bactéries lactiques incluent les genres suivants : *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus* et *Weissella* (Cintas et al., 2001).

Ces espèces sont très limitées chez les nouveaux nés et les nourrissons jusqu'à leur équilibre à partir de l'âge de deux ans, à cause du régime lacté qui contient des agents antimicrobiens comme facteurs protecteurs. Mais, chez les nourrissons en bonne santé le microbiote est dominé par les bactéries lactiques et les bifidobactéries et en particulier la souche de *L. plantarum* fournie par le lait maternel, qui est une source essentielle de BL susceptibles de coloniser la muqueuse intestinale, interagissant ainsi avec le système immunitaire et qui ont un effet bénéfique sur la santé de l'enfant (Aboseidah et al., 2017 ; Khalil et al., 2007).

I.2. Les bactéries lactiques à caractère probiotique

Les BL ont été appelées probiotiques dans la littérature scientifiques par Lilley et Stilwell en 1965, ensuite Parker en 1974 les a défini comme organismes et substances qui contribuent à l'équilibre microbien intestinal. Ce terme a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancés technologiques jusqu'à celle qui a été certifiée par l'OMS et la FAO : Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère (FAO/ OMS, 2002).

Pour que les bactéries lactiques fonctionnent comme probiotiques elles doivent répondre à certaines exigences, principalement l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales intestinales, la capacité de

Partie I: Synthèse bibliographique

moduler la réponse immunitaire, la production des composés antimicrobiens dont les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène, l'acétaldéhyde, le diacétyl et les acides organiques (Suoh et al., 2018 ; Faisal et al., 2017).

De plus, les bactéries lactiques probiotiques doivent exprimer une tolérance élevée à l'acide et à la bile pour assurer leur persistance dans l'intestin, elles doivent aussi moduler la balance du microbiote intestinal envers les différentes conditions physiologiques pour jouer le rôle de barrière contre les pathogènes (Abdhul et al., 2014).

Tableau 1 : Les bactéries lactiques considérées comme probiotiques (Boukefoussa, 2012).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. celloius</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus dieacetylactis</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>L. fermentum</i>		
<i>L. gallinarum</i>		
<i>L. gasseri</i>		
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

I.3. Rôle des bactéries lactiques intestinales

Le microbiote intestinal constitué au cours de la croissance de l'individu représente l'ensemble des microorganismes vivants au sein du tractus digestif humain, principalement localisé au niveau de l'intestin grêle et du colon. Le microbiote normal équilibré joue un rôle important dès la naissance, au point que l'on peut le considérer comme un organe supplémentaire de notre corps. Tout d'abord, il

Partie I: Synthèse bibliographique

conditionne la structure physiologique du tube digestif, son absence provoque une augmentation du volume du caecum, une diminution des plaques de Payer et un allongement des villosités intestinales. Il intervient aussi dans les activités nutritionnelles de l'organisme; il métabolise l'ensemble des nutriments présents dans le colon par sa capacité enzymatique, dégrade le lactose, le cholestérol et participe dans le phénomène de conjugaison et déconjugaison des sels biliaires (**Bruno, 2012**). L'hôte bénéficie des autres fonctions du microbiote intestinal telles que la production des vitamines B et K, leur effet trophique sur les cellules épithéliales intestinales, le maintien de l'intégralité de la barrière intestinale et la participation au métabolisme des xénobiotiques (**Fond et al., 2015**).

Enfin, ce microbiote renforce le système immunitaire par la stimulation des lymphocytes T helper (TH17) par certaines bactéries qui sont impliquées dans la réponse anti-infectieuse, le processus anti-inflammatoire, les maladies auto-immunes et le cancer. D'autres bactéries stimulent les lymphocytes T régulateurs (Treg). L'équilibre entre TH17 et Treg est indispensable pour maintenir l'homéostasie intestinale (**Bruneau et al., 2017**).

L'effet barrière du microbiote empêche la colonisation des microorganismes exogènes par compétition entre bactéries commensales et bactéries exogènes au niveau des sites de fixation épithéliaux, mais également vis-à-vis des nutriments. En plus de l'effet barrière, le microbiote produit des métabolites à action antimicrobienne tels que les bactériocines et induit la synthèse des peptides antimicrobiens par les cellules de l'hôte et la sécrétion d'immunoglobuline A qui participe au maintien de l'homéostasie intestinale (**Bruneau et al., 2017**). Des études montrent que le pathogène gastrique *Helicobacter pylori* a été inhibé par une protéine sécrétée par *Lactobacillus acidophilus*. *Bifidobacterium infantis* et *Lactobacillus salivarius* excrètent des bactériocines contre *Clostridium difficile* et *E. coli* entérohémorragique (EHEC). Parmi 24 souches de *Bifidobacterium* testées, 6 ont la capacité d'inhiber *Helicobacter pylori* par la production des composés thermostables (**Ljungh et Wadstrom, 2005**).

Au cours de ces dernières décennies, des études ont démontré que les BL intestinales pouvaient exercer une activité antioxydante à différents niveaux. Des études *in vitro* et *in vivo* ont confirmé cette activité ; *L. rhamnosus* a exercé une forte activité antioxydante chez l'homme, par augmentation des niveaux élevés d'antioxydants et par neutralisation des effets des espèces réactives d'oxygène (ROS) (**Yang et al., 2012**). La souche *Bifidobacterium longum* et *Lactobacillus acidophilus* présentaient une capacité d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique par un pourcentage de 24% et 48%, respectivement (**Zhong et al., 2014**).

II. Activité antimicrobienne

Différents agents antimicrobiens ayant la capacité d'inhiber le développement d'une variété d'entérophages dans le but de protéger l'organisme hôte sont produits par les BL à des concentrations bien définies afin d'éviter l'auto-inhibition. Ces substances font appel à une interaction antagoniste entre les BL et les autres pathogènes (Zergoug, 2017).

II.1. Métabolites antimicrobiens des bactéries lactiques

II.1.1. Les acides organiques

La fermentation des hexoses par les bactéries lactiques donne une quantité équilibrée d'acide lactique, d'acide acétique, d'éthanol et de CO₂. L'acide acétique est l'inhibiteur le plus efficace avec un large spectre d'activité contre les levures, les champignons et les bactéries par l'acidification intracellulaire et la dénaturation des protéines (Djabouni, 2013). Une étude a montré que *L. salivarius* CECT5713 est capable de produire l'acide lactique, l'acide acétique et le peroxyde d'hydrogène ce qui la rend capable d'inhiber le développement de *Listeria monocytogenes* et *Klebsiella oxytoca* (Turpin, 2011).

L'acide propionique réduit la croissance fongique, affecte la membrane et empêche également l'assimilation des acides aminés. Ces acides organiques jouent un rôle antimicrobien par le phénomène de perméabilisation membranaire des pathogènes et par réduction du pH cytoplasmique. Comme exemple, l'acide lactique avec sa forme neutralisée peut entrer dans la cellule où il se dissocie et libère des ions H⁺ qui acidifient le cytoplasme, comme il peut rester sous forme non dissociée et cause une chute dans le gradient électrochimique des protons, entraînant la bactériolyse et la mort cellulaire. En plus de la réduction du pH, l'acide lactique intervient dans l'augmentation de la perméabilité des membranes pour faciliter la pénétration des autres substances à effet antimicrobien (Djabouni, 2013).

II.1.2. Le peroxyde d'hydrogène

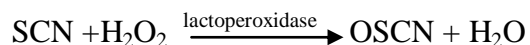
En présence d'oxygène, les bactéries lactiques sont capables de générer le peroxyde d'hydrogène à activité antimicrobienne par l'action des flavoprotéines qui contiennent une oxydase, NADH oxydase et superoxyde dismutase (Salminen et al., 2004 ; Zergoug, 2017).

L'effet bactéricide du H₂O₂ est attribué à son grand effet oxydant dans la cellule bactérienne par oxydation des groupements sulfhydryle, qui induit la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes ainsi

Partie I: Synthèse bibliographique

que la peroxydation des lipides membranaires, de ce fait s'engendre l'augmentation de la perméabilité membranaire (**Salminen et al., 2004**). Le H_2O_2 peut également agir comme un précurseur de la production des radicaux libres bactéricides à partir de l'oxygène moléculaire tel que le superoxyde et les radicaux hydroxyles qui induisent le stress oxydatif dans les cellules des pathogènes (**Zergoug, 2017**).

L'effet antimicrobien du H_2O_2 est renforcé par la présence de thiocyanate (SCN^-), sous l'action de la glycoprotéine lactoperoxydase, qui catalyse l'oxydation du thiocyanate pour générer de hypothiocyanite ($OSCN^-$), et en présence d'un excès de H_2O_2 , il peut former également O_2SCN^- et O_3SCN^- .



Une exposition au 'OSCN' provoque des changements et des dommages dans les membranes bactériennes.

Enfin, un autre effet antibactérien du H_2O_2 , est de bloquer la glycolyse par inhibition du transporteur de glucose et l'activité de l'hexokinase et de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase par oxydation de leur groupement sulfhydryle, cette activité est bactériostatique chez les bactéries à Gram positif et bactéricide chez les bactéries à Gram négatif (**Salminen et al., 2004**).

II.1.3. Dioxyde de carbone

Du CO_2 est formé pendant l'hétérofermentation des hexoses par les BL mais il peut être formé aussi par d'autres voies métaboliques, son effet antimicrobien est expliqué par la création des conditions anaérobiques, mais il a un effet sur l'inhibition de l'activité enzymatique de la décarboxylase, ce qui provoque une accumulation de CO_2 dans la bicouche lipidique causant un déséquilibre de la perméabilité membranaire (**Salminen et al., 2004; Djabouni, 2013**).

II.1.4. Diacetyl

C'est le 2,3 butanedione, identifié par l'arôme et la saveur du beurre. En 1927, *Lemoigne* décrit son activité antibactérienne contre les espèces de *Bacillus*. Cette molécule peut empêcher la croissance des

Partie I: Synthèse bibliographique

bactéries à Gram négatif en affectant l'utilisation de l'arginine, elle est produite par les espèces de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Rediococcus*... (**Salminen et al., 2004; Djabouni, 2013**).

II.1.5. Bactériocines

Les bactériocines sont des molécules inhibitrices produites par les bactéries lactiques pour inhiber la croissance des autres bactéries. Ces bactériocines peuvent être considérées comme des antibiotiques mais ils diffèrent dans certains critères (**Salminen et al., 2004**) :

- les bactériocines ont une synthèse ribosomiale.
- les cellules hôtes ont une immunité envers ces produits.
- le mode d'action diffère de celui des antibiotiques.
- spectre d'action étroit, généralement seulement les bactéries proches de l'espèce productrice

Les bactériocines sont des molécules faciles à dégrader par les enzymes protéolytiques telles que les protéases, elles sont amphiphiles, cationiques et constituées d'un excès de résidus arginine et lysine (**Dridier et Prévost, 2009**).

II.1.5.1. Synthèse

Les bactériocines sont des peptides synthétisés par voie ribosomique et modifiés post traditionnellement. Les gènes qui codent pour la synthèse et l'immunité de ces substances sont généralement organisés en cassettes d'opérons ou peuvent se localiser sur des éléments mobiles comme les chromosomes en association avec des transposons ou sur des plasmides (**Zacharof et Lovitt, 2012**). Après la synthèse de ces peptides qui sont inactifs sous la forme pré-pro-peptides au cours de la phase de croissance, ils seront modifiés par d'autres protéines ou par des acides aminés codés par le groupe des gènes de la bactériocine (**Salminen et al., 2004**).

Les souches productrices de bactériocines doivent se protéger de l'action et de l'effet toxique de leur propre produit par la production des protéines immunitaires spécifiques codée par des gènes qui sont en étroite proximité génétique avec d'autres gènes de structure et de transformation de la bactériocine (souvent sur le même opéron). Ces protéines de résistance empêchent la formation des pores de lyse dans leur membranes (**Savadogo et al., 2006 ; Zacharof et Lovitt, 2012**).

Partie I: Synthèse bibliographique

II.1.5.2. Classification

Les bactériocines des BL peuvent être divisées en trois classes majeures:

Classe 1 : lantibiotiques

Des peptides de petites tailles à structure polycyclique stable à la chaleur largement modifiée après la traduction, caractérisée par la présence des acides aminés thioéthers. Par exemple, la nisine produite par les genres *Lactococcus* et *Lactobacillus*, a une masse moléculaire d'environ 1.8– 4.1 KDa (**Dridier et Prévost, 2009**). La nisine est la bactériocine la plus étudiée. Elle à un large spectre d'activité bactéricide envers une large gamme de bactéries à Gram positif telles que *S. aureus* et *L. monocytogenes*, de plus, elle inhibe les cellules végétatives et les spores des *Bacillus spp* et *Clostridium spp* (**Cintas et al., 2001**).

Classe 2 : Non lantibiotiques

Cette classe est représentée par des molécules relativement stables à la chaleur avec une faible masse moléculaire généralement inférieure de 10KDa et ne subit pas des modifications post-traductionnels (**Dridier et Prévost, 2009**).

Classe 3 : Sont thermostables produites par *Lactococcus helveticus* qui produit la helveticine (**Dridier et Prévost, 2009**).

II.1.5.3. Mode d'action

Les bactériocines peuvent exercer une action bactéricide ou bactériostatique sur les cellules selon plusieurs facteurs, qui peut être accompagnée d'une lyse de cellules comme la nisine A et la plantaricin C. La liaison de ces bactériocines avec l'acide téichoïque et l'acide lipotéichoïque des membranes des cellules conduit à leur libération et donc l'activation des enzymes d'autolyse, qui sont dans les conditions normales liées à ces polymères. Les bactériocines exercent leur mode d'action bactéricide par la déstabilisation et la perméabilisation des membranes cellulaires. Le principe de ce mécanisme consiste à la formation des pores transitoires dans la membrane cytoplasmique par l'interaction entre les trois résidus cationiques de lysine et les anions phospholipidiques qui causent par conséquence une perte des constituants de la cellule (ATP/ K⁺) qui ont un rôle dans le maintien d'équilibre cellulaire (**Cintas et al., 2001 ; Zacharof et Lovitt, 2012**).

Partie I: Synthèse bibliographique

En plus des métabolites, certaines bactéries du microbiote humain telle que *Lactobacillus* et *Streptococcus* spp, dépourvus de cytochrome, de catalase et des flavoprotéines (NADH peroxydases) rendent possible la consommation d'oxygène et entraînent une augmentation de la teneur en anions superoxyde et en peroxyde d'hydrogène qui sont hautement toxiques pour plusieurs microorganismes existant dans la même niche écologique. Donc on peut dire que ces bactéries ont un effet antimicrobien par l'intervention des radicaux libres et la génération d'un stress oxydant qui joue un rôle dans l'inhibition des espèces par le phénomène d'antagonisme (**Kullisaar, 2001**).

III. Activité antioxydante

III.1. Stress oxydatif

III.1.1. Définition

C'est le déséquilibre de la balance entre les espèces oxydantes et le système antioxydant causé par une déficience des systèmes antioxydants ou d'une surproduction énorme des radicaux endogènes et exogènes non neutralisé (**Desmier, 2016; Favier, 2006**). Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques au sein des macrophages et des polynucléaires activées massivement, des cellules endothéliales, le contact de l'O₂ avec les protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (80%) et le cycle redox (**Gardés et al., 2003 ; Desmier, 2016**).

Il est important de noter que la vie moderne confronte notre organisme à des facteurs provoquant une surproduction de ROS tels que : la pollution, l'alcoolisme, les antibiotiques, les anticancéreux, l'exposition au soleil, les rayonnements UV et les particules inhalées (amiante...), ce ci conduit soit à un affaiblissement de nos défenses antioxydantes soit à une surproduction des ROS (**Desmier, 2016**).

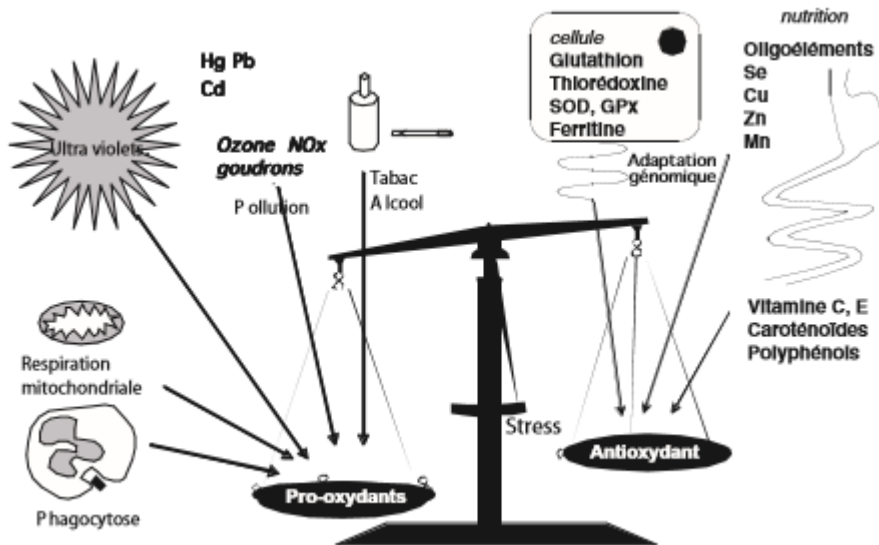


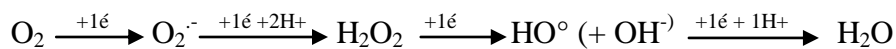
Figure 01 : la balance d'équilibre entre le système antioxydant / pro-oxydants (Favier, 2006).

III.1.2. Espèce réactive d'oxygène (ROS)

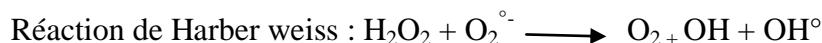
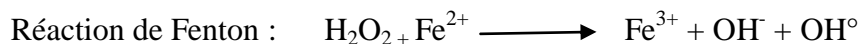
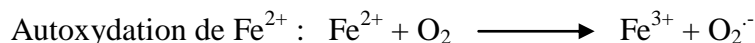
Les espèces réactives d'oxygène sont des molécules chimiques instables et réactives qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (Kouassi, 2017).

III.1.3. Les principaux radicaux libres

Les principaux radicaux libres sont le radical peroxyde (ROO[•]), l'adical alcoocyl (RO[•]), radical superoxyde (O₂^{•-}), radical hydroxyle (OH[•]), monoxyde d'azote (NO[•]), certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires, l'oxygène singulet (¹O₂) et le peroxyde d'hydrogène (Laguerre, 2008).



Des réactions biochimiques conduisent à la formation des ROS comme des sous-produits ou des produits finaux notamment l'autoxydation du fer qui conduit à la formation de O₂^{•-}, leur interaction avec H₂O₂ pour former le OH[•] (Tangvarasittichai, 2015).



Partie I: Synthèse bibliographique

Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre car il présente une plus grande stabilité par rapport aux radicaux libres, mais c'est une espèce réactive d'oxygène car c'est un intermédiaire de certains radicaux libres (**Desmier, 2016**).

III.1.4. Troubles causés par les radicaux libres

Quand la concentration des ROS dépasse les capacités de défense, elles causent des dommages aux protéines, des ruptures dans l'ADN et de la mort cellulaire.

III.1.4.1. Effet sur l'ADN

Le radical hydroxyle, peut provoquer spécifiquement des endommagements de l'ADN au niveau de ses constituants ; ce radical libre a la capacité d'oxyder les bases nucléiques et particulièrement la guanine qui s'oxyde pour générer la 8-hydroxy guanine et la 2.6-diamino-4 hydroxy-5-formamidopyrimidine (**Desmier, 2016**). Le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose créant un site abasique, ou attaque directement le sucre et provoque des coupures dans la chaîne simple brin. Les protéines qui sont en contact avec l'ADN (histone, enzymes et les facteurs de réplication ou de transcription) peuvent être aussi attaquées par les ROS entraînant la formation des ponts, la cause de ce que nous appelons les adduits (**Favier, 2006**). Ces modifications engendrent des altérations dans les systèmes de réparation, de transcription et de traduction cellulaire et par conséquent l'apparition des mutations (**Desmier, 2016**).

III.1.4.2. Effet sur les protéines

Les acides aminés constitutifs des protéines sont très sensibles à l'attaque des ROS. En outre, lorsque une protéine possède une fonction enzymatique, les radicaux hydroxyles sont susceptibles d'inactiver, tout au moins en partie ; le site actif (**Gardés, 2003**). L'oxydation des protéines forme des produits carboxyles ou hydroxyles, cette dernière peut s'effectuer selon **Desmier (2016)** par :

- fragmentation : liée aux maladies de dysfonctionnement des neurotransmetteurs.
- peroxydation des lipoprotéines : est l'origine de développement des plaques d'athérome.
- glyco-oxydation : provoque l'augmentation de la glycémie en cas de diabète

III.1.4.3. Effet sur les lipides

Les lipides sont les cibles majeures pour les dommages du stress oxydatif. Les radicaux libres peuvent attaquer directement les acides gras polyinsaturés dans les membranes et initier la peroxydation

Partie I: Synthèse bibliographique

lipidique qui cause une perturbation de la fluidité et des propriétés membranaires. Ces dommages génèrent des molécules telles que les aldéhydes qui sont également très réactives et endommagent d'autres molécules telles que les protéines (**Kashel et Hamblim, 2017**).

III.1.4.4. Auto oxydation du glucose

En présence de fer, le glucose s'oxyde, entraînant la génération des ROS, mais aussi la production de la forme aldéhyde de glucose, le glyoxal. Cette molécule se fixe rapidement sur les protéines dans lesquelles apparaît un résidu carboxyméthyllysine (CML). Ce groupement capte facilement le cuivre, ce qui provoque le déclenchement d'une réaction de type Fenton avec la production des radicaux libres. Il s'ensuit une augmentation de la peroxydation lipidique, ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi le diabète est souvent associé à des complications cardiovasculaires (**Haleng et al., 2007**).

III.1.5. Les maladies associées au stress

Aux niveaux physiologiques, les radicaux libres sont vitaux pour la présentation des antigènes et la prolifération cellulaires. Cependant à des niveaux élevés, ils peuvent diminuer les fonctions immunitaires (**Willcox et al., 2004**). Les conséquences du stress sont en fonction de la concentration des radicaux libres ; lorsque cette dernière est moyenne ou légère, elle entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire et une expression des protéines d'adhésion qui facilitent enfin l'apoptose. Mais si la concentration est relativement élevée, les ROS engendrent la nécrose et des stress violents désorganisant la membrane entraînant des lyses immédiates (**Favier, 2006**).

Le stress est ainsi un des facteurs potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson et la maladie de Charcot), l'athérosclérose, le cancer, les inflammations, le vieillissement accéléré... (**Desmier, 2016**).

III.2. Les antioxydants

L'antioxydant est une substance capable de prévenir ou de fortement retarder l'oxydation de matériel facilement oxydable notamment les graisses. Un antioxydant peut donc soit prévenir la synthèse des radicaux libres en inhibant l'initiation des chaîne réactionnels, soit par désactivation directe des ROS (**Pisoschi et Negulescu, 2011; Desmier, 2016**).

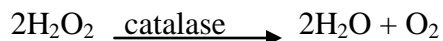
Partie I: Synthèse bibliographique

III.2.1. Classification

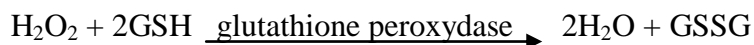
Deux types de voies antioxydantes ont été décrits, les systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques. Les enzymes jouent le rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre des niveaux des ROS dans l'organisme. Cependant, les systèmes non enzymatiques sont impliqués dans la prévention du stress excessif.

Antioxydants enzymatiques : réagissent avec les radicaux libres pour les convertir en produits plus stables ou capturent les électrons et les ions d'hydrogène pour stopper la chaîne de réaction (**Asakalidou et Papadimitriou, 2001**). Plusieurs enzymes y sont impliquées:

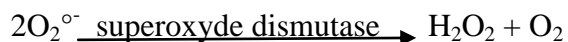
La catalase : est constituée de quatre chaînes polypeptidiques avec quatre atomes de fer (Fe^{3+}) qui constitue le site actif de cette enzyme, il catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau selon la réaction :



La glutathion peroxydase : enzyme à sélénium, catalyse la réduction des hydroperoxydes, son activité principale est de permettre l'oxydation du glutathion par la réaction de dimérisation avec formation d'un pont disulfure (**Desmier, 2016**), comme elle constitue la voie majeure de la dégradation du peroxyde d'hydrogène.



La superoxyde dismutase (SOD) : permet de catalyser la dismutation de l'anion superoxyde d'oxygène dans un milieu acide et va permettre d'agir simultanément avec deux anions superoxydes pour former le dioxygène et peroxyde d'hydrogène, leur classification dépend de cofacteur métaboliques (Cu, Zn, Fe, Mn...) (**Desmier, 2016**):



Antioxydants non enzymatiques : Il existe plusieurs antioxydants naturels : (glutathion, les vitamines, caroténoïdes, les polyphénols, oligoéléments.....).

Glutathion (GSH) : tripeptide constitué d'acide glutamique, cystéine et glycine.

Les vitamines : acides ascorbiques (vitamine C), acide folique (vitamine B8) et la vitamine E (**Desmier, 2016**).

III.2.2. Mode d'action des antioxydants

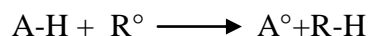
La diversité des voies d'oxydation conduit nécessairement à une multiplicité des voies antioxydantes:

1. La détoxification endogène enzymatique des ROS

Constitue une voie de prévention de l'oxydation, elle concerne toutes les enzymes antioxydantes qui ont la capacité de détoxifier les radicaux libres et le peroxyde d'hydrogène telle que la SOD, la glutathion peroxydase... (**Laguerre, 2008**).

2. Substances anti-radicalaires non enzymatique

Cette catégorie d'antioxydants va le plus souvent réduire les radicaux libres par cession d'un atome d'hydrogène selon la réaction suivante :



Pour se faire, ces anti-radicalaires doivent posséder un pouvoir réducteur inférieur à celui du substrat (**Pisoschi et Negulescu, 2011**). Ces molécules sont capables d'interrompre la chaîne autocatalytique de l'oxygène en bloquant les radicaux lipidiques et la formation des aldéhydes (**Mishra et al., 2015**).

3. Piégeurs d'oxygène singulet

Ce mode d'action s'exerce par désactivation de 1O_2 en 3O_2 , les piégeurs d' $^{\circ}O_2$ sont les tocophérols et les thiols, ainsi que l'acide ascorbique, qui agit sur l'oxygène par oxydoréduction grâce à sa fonction ène-diol et se transforme en acide déshydroascorbique (**Pisoschi et Negulescu, 2011; Jean et Multon, 2009**). L'acide ascorbique présente toutefois le défaut de réduire le fer ferrique en fer ferreux, forme plus active pour initier les réactions d'oxydation par décomposition des hydroperoxydes en radicaux (**Mishra et al., 2015**). Il a été montré que *L. fermentum* L31 a une forte capacité de piéger les radicaux libres et il a été suggéré que cette souche est intéressante comme complément alimentaire probiotique car elle peut augmenter les niveaux de la production des antioxydants *in vivo* (**Persichetti et al., 2014**).

4-Les chélateurs des métaux de transition

Il s'agit de protéines telles que la transferrine, la ferritine, la lactalbumine qui séquestrent le fer, ou encore la céruloplamine et l'albumine qui séquestrent le cuivre. Ce mode d'antioxydants serait mineur

Partie I: Synthèse bibliographique

pour l'inhibition de la peroxydation lipidique, mais dominant dans l'inhibition de la coupure oxydante des brins d'ADN (**Laguerre, 2008**). La capacité de chélation des ions métalliques des BL a été mesurée par Lin et Yen en 1999, *L. casei* KCTC 3260 possède une capacité anti oxydante élevée en chélatant le Fe^{2+} ou le Cu^{2+} (**Wang et al., 2017**).

5- Effet pro-oxydant

Tout antioxydant est un composé réducteur. La capacité réductrice d'une molécule peut certes jouer en faveur de la capacité antioxydante par la réduction d'espèces oxydantes, (comme les radicaux libres), mais également un effet pro-oxydant. On pose alors la question, par quel mécanisme une réaction de réduction peut induire un effet pro-oxydant ?

Parmi les plus connus, nous pouvons citer la réduction de l' O_2 en espèces réactives d'oxygène, ou bien la réduction du cation Fe^{3+} en réaction de Fenton de type Fe^{2+} .

Concernant l'acide ascorbique, il est bien connu qu'il agit plutôt comme un antioxydant en présence d'ions de métaux de transition. Ceci est dû au fait que l'acide ascorbique réduit ces derniers ($MN^{n+1} \longrightarrow Mn^n$) et génère du peroxyde d'hydrogène par autoxydation, qui génère à son tour, par réaction de Fenton des radicaux hydroxy (**Pisoschi et Negulescu, 2011**).

III.2.3. Rôle des antioxydants dans la prévention contre les maladies

Les antioxydants jouent un rôle très important dans le corps humain dans la prévention contre les maladies chroniques de nos jours, tels que le cancer, diabète, SIDA.... Les cellules cancéreuses envahissantes et métastatiques génèrent de grandes quantités de peroxyde d'hydrogène qui fonctionnent comme des molécules de signal impliquées dans la survie de ces cellules. Les antioxydants peuvent supprimer le peroxyde d'hydrogène et inhibent la prolifération des cellules cancéreuses (**Willcox et al., 2004**). Aussi, une étude *in vitro* a indiqué que les antioxydants possèdent une forte capacité d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate par intervention aux niveaux de l'activité des protéines de qui interviennent dans la croissance des cellules tumorales (**Edeas, 2006**).

L'augmentation de l'activité de SOD diminue les superoxydes contenus dans la cellule ce qui réduit les ROS médiateurs de croissance des cellules cancéreuses, ces SOD sont considérées comme une protéine suppresseur des tumeurs (**Valko et al., 2007**).

Partie I: Synthèse bibliographique

Les neurones sont très sensibles aux radicaux libres car ils contiennent un niveau très faible de glutathion dans leurs cellules ce qui provoque la maladie d'Alzheimer. Des études *in vitro* sur la culture des neurones ont rapporté que la vitamine E et d'autres antioxydants empêchent la toxicité des radicaux libres conduisant à cette maladie qui est généralement initiée par le peroxyde d'hydrogène (**Edeas, 2006**).

Les antioxydants peuvent améliorer la réponse immunitaire en contrôlant la production des radicaux libres dans la cellule, comme ils peuvent moduler la réponse excessive du système immunitaire dans les processus anti-inflammatoires (**Wilcox et al., 2004 ; Edeas, 2006**), car il a été remarqué *in vivo* que les lymphocytes des patients atteints de SIDA sont déficients en glutathion. Le médicament N-acetylcystéine, précurseur de GSH a été proposé pour être utilisé contre cette maladie. De plus, la vitamine E est significativement associée à une progression plus lente de l'infection par HIV et augmente le nombre des CD4+ (**Willcox et al., 2004**).

VI. Caractéristiques des BL capables de produire des molécules antioxydantes et antimicrobiennes

Plusieurs caractères doivent être présents chez les BL productrices des molécules antioxydantes et des métabolites antimicrobiens pour qu'elles s'adaptent à cette fonction.

VI.1. La résistance à l'oxygène et aux radicaux libres

Tant que les bactéries lactiques sont des microaérophiles ou des anaérobies facultatifs, l'oxygène représente un stress pour elles. L'oxygène est une molécule biradicale (O-O), formée de deux électrons non appariés à la couche externe, il peut réagir avec les métaux en particulier le Fer et les acides aminés, les produits de ces réactions sont plus toxiques que l'O₂ lui-même, les radicaux libres et le H₂O₂ (**Asakalidou et Papadimitriou, 2001**).

Pour que les bactéries puissent détoxifier les radicaux libres produits dans le milieu, elles doivent d'abord les résister. Il existe différents mécanismes de résistance qui caractérisent ce type de bactéries :

1- La respiration comme une barrière contre les espèces réactives d'oxygènes

Des études expérimentales ont révélé que les bactéries lactiques sont capables d'activer une cytochrome oxydase hème-dépendante et établir une chaîne de respiration complète (le cytochrome A),

Partie I: Synthèse bibliographique

dans laquelle s'effectue le transfert des électrons jusqu'à l'accepteur final (oxygène) pour les réduire en H₂O avec formation d'ATP (Asakalidou et Papadimitriou, 2001; Miyoshi et al., 2003).

2- La NADH peroxydase

Le mécanisme de résistance au stress oxydatif est réalisé par un système complet de NADH oxydase, NADH peroxydase conduisant à la transformation de l'oxygène en H₂O (Miyoshi et al., 2003). Ces enzymes de détoxification sont codées par le génome bactérien de quelques bactéries lactiques telles que les *Bifidobactéries* (Kawaski et al., 2018).

3-L'enzyme SOD

Cette enzyme est capable d'éliminer le radicaux O₂⁻ chez la plupart des bactéries lactiques (Desmier, 2016).

4- Glutathion intra cellulaire

Un mécanisme alternatif pour éliminer les radicaux d'oxygènes qui pourrait compenser l'activité faible des SOD peut être formé par des niveaux élevés de glutathion intracellulaire. Des études ont montré que le GSH intervient même dans la résistance au stress, l'acidité et le stress osmotique (Hugenholtz et al., 2003).

5-La protéine Rec A

C'est une protéine qui joue un rôle dans le système SOS. Il est remarqué qu'en absence de recA, le radical OH[•] généré par la réaction Fenton est responsable de dommages de l'ADN. L'activation de recA par le stress oxydatif confère une protection contre le choc thermique (Miyoshi et al., 2003).

6-L'adaptation

Les bactéries peuvent déclencher un mécanisme adaptatif qui permet à la cellule de tolérer les conditions difficiles (Miyoshi et al., 2003). En général, la réponse des bactéries lactiques envers le stress oxydatif est entretenue par une augmentation de l'expression des enzymes de détoxification, ainsi que des systèmes de protection supplémentaires pour la réparation des dommages, protection des enzymes de l'inactivation et le contrôle des niveaux de Fer libre (Kashel et Hamblim, 2017). L'étude de Kullisaar a montré que les souches E-3 et E-18 de *Lactobacillus fermentum* ont une activité

Partie I: Synthèse bibliographique

antioxydante par l'expression de MN-SOD et expriment une résistance accrue à plusieurs ROS comme le peroxyde d'hydrogène, superoxyde et les radicaux hydroxyles (**Kullisaar et al., 2001**).

VI.2. La production d'EPS

De nombreuses espèces de BL sont connues pour leur capacité de produire des polysaccharides libres ou attachés pendant leur métabolisme. Environ 30 espèces de *Lactobacillus* sont connues par cette capacité telles que *Lb.rhamnosus*, *Lb. helveticus*, *Lb. sakei* et *Lb.plantarum* (**Mahdhi et al., 2017 ; Wang et al., 2017**). Les EPS sont des polysaccharides excrétés à l'extérieur de la cellule, ils contribuent à la santé humaine comme anti-tumoraux, antiulcères, immunomodulateurs, réducteurs du taux de cholestérol et protecteurs contre les conditions physico-chimiques et biologiques de l'environnement. Ils interviennent dans la résistance aux bactériophages, pH, stress osmotique et ce qui nous concerne, le stress oxydatif (**Drider et Prévost, 2009; Xu et al., 2011**). Selon les travaux de Trabelsi et ses collègues ; les EPS de *Lactobacillus* sp montrent une propriété antioxydante et antimicrobienne relativement significative (**Trabelsi et al., 2017**).

VI.3. La résistance au H₂O₂

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène par les BL, la catalase réduit l'H₂O₂ en H₂O et O₂, mais les BL sont largement considérées comme microorganismes dépourvus de la catalase comme nous avons cité précédemment mise à part la souche *L. plantarum* ATCC14431 qui possède dans son génome des gènes spécifiant des catalases hémiques, qui sont dépendantes d'une source exogène, dans le cas de l'impossibilité de synthétiser l'hème. L'absence de la catalase chez les bactéries lactiques est compensée par l'enzyme NADH peroxydase ou le système Glutathion peroxydase / Glutathion réductase chez *Lactobacillus lactis* qui confère à cette bactérie une meilleure résistance au H₂O₂ (**Ebel, 2012**). D'autres mécanismes ont été découverts chez les bactéries dépourvues de NADH peroxydase et de la SOD, elles produisent le pyruvate qui réagit de façon non enzymatique avec le H₂O₂ pour former l'H₂O et l'acétate, fournissant à la bactérie un mécanisme de protection contre le H₂O₂, il a été identifié pour la première fois chez *L. delbrueckii* (**Condon, 1987 ; Miyoshi et al., 2003**).

V. Les BL probiotiques à caractère antioxydant et la prévention du cancer

Les choses se compliquent lorsqu'il s'agit de proposer des stratégies antioxydantes au cours du cancer et plus précisément, au cours des traitements par radio et chimiothérapies dans le but de traiter leurs

Partie I: Synthèse bibliographique

conséquences oxydatives. Les cellules cancéreuses doivent être éliminées par le mécanisme d'apoptose, ce dernier s'effectue par une chaîne de réactions dans la quelle les ROS agissent comme des déclencheurs et des médiateurs (**Kumar et al., 2010**).

Le cancer est une série bien définie de séquences provoquées par des mutations, des activations, et délétions d'oncogènes et des supresseurs de tumeurs (**Mohamed et al., 2017**). Dans les cellules cancéreuses, les risques apoptotiques favorisent l'accumulation de la protéine P53 qui déclenche la libération des ROS. Ces produits libérés activent des enzymes protéolytiques appelés CAS PASES qui digèrent des protéines PIVOTS et favorisent une désoxyribonucléase qui clive des protéines et de l'ADN et déclenchent la mort apoptotique, donc une mutation au niveau du gène P53 rend les cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose et les médicaments anti-cancéreux (**Kumar et al., 2010**).

Plusieurs études ont montré que les BL peuvent jouer un rôle dans la régulation de l'apoptose cellulaire par l'expression des enzymes antioxydantes précédemment citées ou des processus qui protègent les cellules contre les carcinogènes (**Daniluk, 2012; Kumar et al., 2012**). Une étude a montré que *L. acidophilus*, *L. casei* et *B. longum* possèdent un effet anti tumoral et supprime la prolifération des cellules tumorales, et *L. casei Shirota* exerce de puissants effets anti métastatiques sur les cellules tumorales et supprime la carcinogénèse induite chimiquement (**Zhong et al., 2014**). Les souches probiotiques exercent des effets antiprolifératifs des cellules cancéreuses du colon via la synergie entre l'adhésion à ces cellules et la production des acides gras à courtes chaînes tels que l'acide butyrique et l'acide propionique (**Mohamed et al., 2017**). Les exopolysaccharides de *L. acidophilus* ont été impliqués dans la mort cellulaire du cancer du colon via l'autophagie (**Daniluk, 2012**).

La chimiothérapie anticancéreuse repose essentiellement sur l'induction d'une surproduction des ROS dans les cellules tumorales pour induire l'apoptose. Dans ce contexte, une étude suggère que *L. acidophilus* et *L. casei* peut augmenter la capacité d'induction de l'apoptose des cellules du carcinome colorectal LS513, suggérant que ces probiotiques peuvent être utilisés comme adjuvants dans la chimiothérapie anticancéreuse (**Daniluk, 2012**).

On comprendra que les antioxydants peuvent potentiellement s'opposer à l'action de ces traitements et limiter leur efficacité, pour cela on utilise ces antioxydants associés à ce traitement pour diminuer leurs effets secondaires. De nombreux antioxydants ont été proposés comme N-acétyl- cysteine et plus récemment, la SOD devient intéressante (**Brack, 2015**).

Partie I: Synthèse bibliographique

Notre travail porte sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante des souches isolées à partir des selles des nourrissons. Cette étude à été réalisée au niveau des laboratoires pédagogiques de l'université Mohammed Seddik Benyahia de Jijel.

I. Appareillages, Milieux de culture et souches bactériennes

Les appareils utilisés dans les différentes étapes de notre travail sont :

- + Etuve de 37°C et 170°C (MEMMERT).
- + Autoclave
- + Réfrigérateur (ENIEM).
- + Balance (SARTORIUS).
- + Vortex (VWR).
- + pH mètre (HANNA).
- + Microscope optique (OLYMPUS).
- + Bain marie (Gerhardt).
- + Micropipettes
- + Plaque chauffons.
- + Centrifugeuse (Hettich).
- + Spectrophotomètre (Specord 50 plus).

Milieu de culture et tampon :

- + Gélose et bouillon MRS (Man-Rogosa et Sharp) (Annexe 01).
- + Gélose Mueller- Hinton.
- + Gélose nutritive.
- + Tampon PBS à pH= 7.4 (Annexe 03).
- + Milieu Möeller avec arginine.

Produits chimiques et réactifs :

- + Réactifs et produits : DPPH, FeSO₄, Acide ascorbique, Trichloroacétic acid (TCA), H₂O₂, NaOH, 1-10-phénolthrolène.
- + Colorants : Violet de Gentiane, fuschine, bleu de méthylène.
- + Alcool et autres : lugol, éthanol, méthanol, eau distillé stérile, eau physiologique stérile.

Partie I: Synthèse bibliographique

Les souches cibles utilisées dans l'activité antimicrobienne, sont fournies par le laboratoire de recherche de l'université de Jijel.

✚ *Escherichia coli* ATCC 20404

✚ *Staphylococcus*

✚ *S. aureus* ATCC29522

✚ *Pseudomonas*

✚ *Listeria monocytogenes*

II. Méthodes

II.1. Prélèvement des échantillons

Les souches utilisées dans cette étude ont été isolées à partir des selles fraîches des nourrissons de 2 mois nourris seulement par le lait maternel. Devant le bec Bunsen et avec une spatule stérile, nous avons prélevé 1g des selles et dissous dans 10 ml d'eau physiologique stérile à l'aide d'un vortex pour l'obtention de la solution mère, à partir de cette dernière nous avons prélevé et introduit aseptiquement 1 ml dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, nous obtenons alors la dilution 10^{-1} . Avec la même opération on continue les dilutions jusqu'à 10^{-4} .

II.2. Isolement et purification des souches

L'isolement des souches bactériennes a été réalisé sur la gélose MRS; milieu adapté à la recherche spécifique des lactobacilles. Les boîtes de Pétri contenant la gélose MRS préalablement coulées et solidifiées sontensemencées en étalant à leur surface 100 μ l de chaque dilution 10^{-3} et 10^{-4} de notre échantillon E3, les boîtesensemencées sont incubées ensuite à 37°C pendant 48h. Après incubation, des repiquages successifs sur le bouillon MRS et ensuite sur la gélose MRS ont été réalisés pour l'obtention des colonies homogènes de la même taille, de la même forme et de la même couleur. Ces isolats purifiés subissent différents tests d'identification. Après chaque étape de purification, des testes de confirmation tels que la coloration de Gram ont été réalisés (Gheziel et al., 2013).

II.3. Pré-identification des souches

L'identification est établie en se basant sur les caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : test de la catalase, température de croissance, type de fermentation et la production de CO_2 (Mostefaoui et al.,2014 ; Badis et al.,2005 ; Sandes et al., 2017).

II.3.1.Observation macroscopique

Les observations macroscopiques des colonies obtenues sur la gélose MRS nous ont permis de déterminer leur taille, leur forme et leur couleur sur le milieu solide (**Badis et al., 2005**)

II.3.2. Observation à l'état frais

La réalisation de l'état frais se fait par l'ajout d'une colonie de culture jeune de 18h à une goutte d'eau distillée stérile sur une lame, ensuite la lamelle est déposée soigneusement sans laisser de bulles d'air. L'observation se fait par un microscope optique à grossissement x40 (**Mostefaoui et al., 2014**).

II.3.3.Observation après coloration

Elle est basée sur la coloration de Gram des frottis réalisés à partir des colonies pures (Annexe 02), et observation sous microscope optique grossissement x100 après l'ajout de l'huile à immersion. Cette observation permet de mettre en évidence les bactéries à Gram + de celles à Gram -, la forme, et le mode de regroupement (**Mostefaoui et al., 2014**).

II.3.4. Pré-identification biochimique

II.3.4.1. Test de la catalase

Il consiste à mettre dans une lame stérile une goutte d'eau oxygénée stérile, dans laquelle sera émulsionnée une colonie d'une souche à tester. Cette dernière est définie comme catalase positive s'il y a l'apparition des bulles d'air (**Tabac et Bensoultane, 2012**).

II.3.4.2. Type fermentaire

Ce test permet de différencier entre les bactéries lactiques homofarmentaires et hétérofermentaires (formation de CO₂). Chaque souche a été ensemencée dans un tube contenant 10 ml de bouillon MRS additionné d'une cloche de Durham. Après incubation à 37 °C pendant 48h, le CO₂ produit par les souches hétérofermentaires s'accumule dans les cloches de Durham (**Badis et al., 2004**).

II.3.4.3. Culture à différentes températures

Ce test permet de distinguer entre les BL mésophiles et thermophiles. 3ml de bouillon MRS ont été ensemencés par 200 µl d'une culture fraîche de 18h. L'incubation se fait à 15, 25, 30 et 45 °C pendant 48h. La résistance à la température se traduit par la formation d'un trouble (**Badis et al., 2005**).

II.3.4.4. Culture à différentes concentrations de NaCl

La croissance à différentes concentration de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les souches à tester ont étéensemencées dans des bouillons MRS additionnés de 4% et 6.5% de NaCl. Pour chaque souche, 100 µl ont été prélevés de la culture fraîche etensemencés dans 3 ml de bouillon MRS hyper-salé. Après une incubation de 48h à 37 °C, l'aptitude à croître dans ces concentrations de sel se manifeste par l'apparition d'un trouble du milieu (**Badis et al., 2005**).

II.3.4.6. Recherche de l'arginine déshydrogénase

L'enzyme arginine déshydrogénase nous a parmi la caractérisation des bactéries lactiques par la dégradation de l'arginine et la libération de l'ammoniac. Pour réaliser ce test, chaque souche estensemencée dans un tube contenant le bouillon Möeller avec l'arginine, un témoin dépourvu de l'arginine est utilisé. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 4 jours (**Gelman et al., 2000 ; Badis et al., 2004**).

II.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les différentes méthodes décrites pour la détection des métabolites à activité antimicrobienne des bactéries lactiques sont basées sur le principe que ces substances peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec la souche cible. La production de ces substances est détectée par le pouvoir inhibiteur du filtrat de la bactérie lactique testée sur la croissance du germe cible (**Labioui et al., 2005**).

Les souches cibles qui proviennent d'une culture jeune sont préparées dans de l'eau physiologique stérile. L'inoculum et standardisé a une absorbance entre 0.08 et 0.1 à une DO à 620nm. Ensuite, elles sontensemencées (50 µl) par étalement sur la gélose Muller Hinton préalablement coulée et solidifié. La méthode utilisée est la méthode des puits formés par des embouts stérile. Les puits de 5 mm sont remplis par 50µl du surnagent et du surnagent neutralisé filtré par des filtres Millipore (0.22µm) obtenus après une centrifugation à 6000 rpm pendant 20 min de chaque culture jeune des souches cultivées sur MRS. Le surnagent à été neutralisé par NaOH (0.1N) de façon à obtenir un pH entre 6.5 et 6.9 (**Labioui et al., 2005**). Les boites sont laissées sur la paillasse un certain moment pour assurer la diffusion du surnagent, ensuite elles sont incubées à 37°C pendant 24h. L'activité antimicrobienne est traduite par l'apparition des zones claires autour des puits.

II.5. Mesure de l'activité antioxydante

II.5.1. Evaluation par la méthode du DPPH

L'DPPH est le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl-hydrate, est un radical organique de nitrogène, qui possède un électron non apparié sur un atome d'azote. Ce dernier a la possibilité d'être délocalisé pour rendre ce radical stable, ce qui explique la diminution visuelle de sa coloration pourpre lors de la réaction avec un antioxydant (**Kouassi, 2017**). Le test est basé sur la mesure de la capacité réductrice des antioxydants envers le DPPH par le dosage de la perte de couleur de ce radical par spectrophotomètre à 517 nm.

Avant de réaliser ce test, la préparation de l'inoculum est effectuée, les cultures jeunes de 18h (inoculées à 1% dans MRS liquide) ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 20mn, les surnageants ont été récupérés et les culots ont subi des lavages et ont été remis en suspension dans le PBS. La culture a été ensuite standardisée à un nombre de cellule correspondant à une DO = 0.4 (**Zhai et al., 2015**).

Selon la méthode de Shimada et al, avec quelques modifications ; 800 µl de cellules intactes ou du surnageant et 200 µl de la solution du DPPH fraîchement préparée (0.2mM) dans le méthanol diluée à 50% avec de l'eau distillée stérile sont incubés et laissés réagir durant 30min dans l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 517 nm contre un blanc contenant du méthanol tandis que le témoin contient seulement du PBS et du DPPH.

Capacité du piégeage = Absorbance du témoin – Absorbance de l'échantillon / Absorbance du témoin x 100 (Ynlin et al., 2000).

II.5.2. La résistance au peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant relativement faible, mais il est hautement diffusif et a une longue durée de vie. A cause de ces caractéristiques de base, le peroxyde d'hydrogène contribue aux dommages oxydatifs soit directement ou comme un précurseur de radicaux hydroxyles (**Zhang et al., 2011**).

Pour évaluer la résistance aux ROS, nous avons testé la survie des cellules intactes en présence de peroxyde d'hydrogène. Selon la méthode de **Buchmeier et al., (1997)**, le bouillon MRS additionné par le peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations ; 0.4, 0.7 et 1 mM est inoculé par des cultures jeunes de 18 h de chaque souche. Un témoin dépourvu de peroxyde d'hydrogène est utilisé. La

croissance des cellules est mesurée au cours de temps (0h, 3h, 24h et 48h) par le spectrophotomètre à 600 nm (Li et al., 2012).

II.5.3. La capacité de piéger les radicaux hydroxyles

Le radical hydroxyle est le ROS le plus réactif et le plus toxique, a une courte durée de vie, et est un oxydant puissant qui peut réagir de manière non spécifique avec l'ADN et les protéines et intervient dans la peroxydation lipidique (Desmier, 2016). Ce radical peut provenir soit de la réaction entre O_2^- et le H_2O_2 , ou de la réaction de Fenton qui a été procédée dans notre étude.

Selon Zhang et al., (2011), la génération des radicaux hydroxyles est effectuée par la solution contenant 0.5 ml de 1.10-phénolthroline, 0.5 ml de tampon phosphate (0.15 M), 0.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de $FeSO_4$ (2.5 mM). La réaction de Fenton est déclenchée par l'ajout de 0.5 ml de H_2O_2 (20 mM), cette solution est définie comme le contrôle. Un deuxième mélange est préparé en parallèle, qui contient les mêmes compositions que le contrôle sauf que le volume de H_2O_2 est remplacé par l'eau distillée, il est exprimé comme blanc.

Pour le troisième mélange nommé échantillon qui contient tous les composants du contrôle sauf que l'eau distillée est remplacée par l'échantillon (surnageant ou culot bactérien). Le surnageant ou le culot est préparé à partir d'une culture jeune de 18h centrifugée à 6000 rpm pendant 20 min, le culot subit des lavages avec PBS ensuite une standardisation à une DO de 0.2-0.3. Le mélange est incubé pendant 1h et 30 min à 37°C et l'absorbance est mesurée à 536 nm.

Le pourcentage de scavenger du radical hydroxyle est défini comme suit :

$$\text{Effet scavenger} = \frac{\text{Ab échantillon} - \text{Ab contrôle}}{\text{Ab blanc} - \text{Ab contrôle}}$$

II.5.4. La capacité de chélation des ions de fer

Le contrôle du Fer dans le domaine de l'évaluation de l'activité antioxydante est important parce que le fer participe à la génération des radicaux hydroxyles. Le fer et en particulier le fer ferreux provoque des dommages tissulaires en catalysant la formation des ROS et stimule la peroxydation lipidique, et en conséquence la chélation du fer est une activité antioxydante très efficace pour la prévention de la peroxydation lipidique (Kim et al., 2005).

Cette capacité a été estimée en utilisant la méthode de Lin et al. (1999) avec des modifications mineures. Tout d'abord, 0.5 ml de l'échantillon (culot de culture fraîche standardisée à une DO = 0.8, et le surnageant obtenu par la centrifugation de la culture à 6000rpm pendant 20 mn) a été mélangé

Partie I: Synthèse bibliographique

avec 0.1 ml de l'acide ascorbique (10 g/l), 0.1 ml de FeSO₄ (4 g/l) et 1ml de NaOH (0.2 M). Le mélange a été incubé à 37°C dans le bain-marie pendant 20 min, ensuite 0.2 ml de TCA (10%) a été ajouté. Le surnageant obtenu après la centrifugation à 6000 rpm pendant 20 min est additionné de 0.2 ml de 1.10-phéna-throline (1 g/l). Laisser se réagir pendant 10min, ensuite l'absorbance a été mesurée à 510nm (**Tang et al., 2016**).

$$\text{Capacité de chélation} = 1 - (\text{Ab échantillon} / \text{Ab témoin}) \times 100.$$

II.5.5. Activité antioxydant totale

Cette activité est mesurée dans notre étude par la capacité d'inhibition de l'auto-oxydation de l'acide ascorbique, qui est décrit par **Mishra et Kovachich (1984)** où 0.2 ml de l'échantillon (solution du culot) est ajouté à 0.2 ml de la solution de l'acide ascorbique (0.1 ml d'acide ascorbique (5 mM) + 9.8 ml de PBS (0.2 M)). Les tubes sont incubés à 37°C pendant 10 min, ensuite leur absorbance est mesurée à 265 nm, et comparée avec le contrôle dépourvu d'échantillon.

La capacité des souches à inhiber l'auto-oxydation de l'ascorbate est mesurée comme suit :

$$\text{AAT\%} = (\text{Ab échantillon} / \text{Ab contrôle} - 1) \times 100 \quad (\text{Wang et al., 2006}).$$

II.6. La caractérisation des souches intéressantes

Pour que les souches probiotiques exercent leur effet bénéfique pour l'hôte, elles doivent être capables de survivre au cours de leur passage dans le tube digestif, spécifiquement la résistance au pH acide de l'estomac et les sels biliaires (**Maragkoudakis et al., 2006**).

Après l'évaluation de l'activité anti-oxydante des 6 souches isolées à partir des selles des nourrissons, nous avons sélectionné 4 souches possédant le plus fort pouvoir antioxydant (E3B, E3C, E3D, E3F), pour tester leur capacité de survivre sous les conditions hostiles de pH et des sels biliaire dans le tube digestif afin de confirmer leurs pouvoirs probiotiques. Pour ce faire, la culture fraîche de nos souches sélectionnées est centrifugée à 5000 rpm pendant 10 min, puis les culots ont subit deux lavages avec le PBS à pH= 7.4, puis ils sont remis en suspensions dans 1ml du PBS.

II.6.1. La résistance aux sels biliaires

Selon **Kaewnopparat et ces collaborateurs (2013)**, Trois séries de tubes contenant 10 ml de MRS additionné par différentes concentration des sels biliaires sont ensemencés par 200µl de la solution

Partie I: Synthèse bibliographique

bactérienne, la première série de MRS à 0% de sels est considérée comme témoin, la deuxième contenant 0.1% et la troisième 0.3%.

La survie des cellules en présence de la bile est évaluée par la mesure de l'absorbance à 620 nm à T_0 et après 2h et 4h d'incubation à 37 °C.

Le taux de survie des cellules est déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ de survie} = (\text{DO}_2 / \text{DO}_1) \times 100$$

DO_1 : La densité optique initiale.

DO_2 : La densité optique finale.

Pour comparer le profil de croissance des souches en présence de la bile par rapport au témoin à 0% de la bile, il faut calculer le taux de croissance de chaque culture séparément par l'équation suivante (**Wei et al., 2009**) :

$$\mu = 1 / \text{DO}_0 \times (\text{DO}_t - \text{DO}_0) / (T - T_0)$$

μ : Taux de croissance (h^{-1}).

DO_0 : Absorbance à t_0 .

DO_t : Absorbance à un temps t .

T : Temps après incubation.

T_0 : Temps initiale.

II.6.2. La résistance au pH acide

Deux séries de tubes contenant le bouillon MRS à différents pH sontensemencés par 1% de la culture bactérienne ; la première série à pH 6.4 est considérée comme témoin, et la deuxième à pH 2. Le comptage des cellules se fait par la cellule de Thomas à partir de la dilution 10^{-1} à T_0 et après 1h, 2h et 4h d'incubation à 37 °C (**Kaewnopparat et al., 2013**).

$$\% \text{ de survie} = (\text{N des cellules finale} / \text{N des cellules initiale}) \times 100$$

III. Résultats et discussion

III.1. Isolement et identification des souches

L'isolement réalisé dans notre travail a été fait à partir d'un échantillon des selles d'un nourrisson de 2 mois nourri au lait maternel. À partir de cet échantillon nous avons fait l'isolement de six souches susceptibles d'être des bactéries lactiques selon la forme des colonies et la coloration de Gram. Quelques tests d'identification ont été réalisés pour déterminer le genre.

III.1.1. Observation macroscopique des souches isolées

Les souches isolées donnent sur la gélose MRS (Figure 02.a) des colonies rondes avec des contours réguliers et une surface lisse, blanchâtres ou transparents de différentes tailles selon l'isolat, forme caractéristique des bactéries lactiques. Sur le bouillon MRS, la croissance des isolats se traduit par la formation de trouble et la formation d'un précipité blanc au fond du tube dû à la formation de l'acide lactique (Figure 02.b).

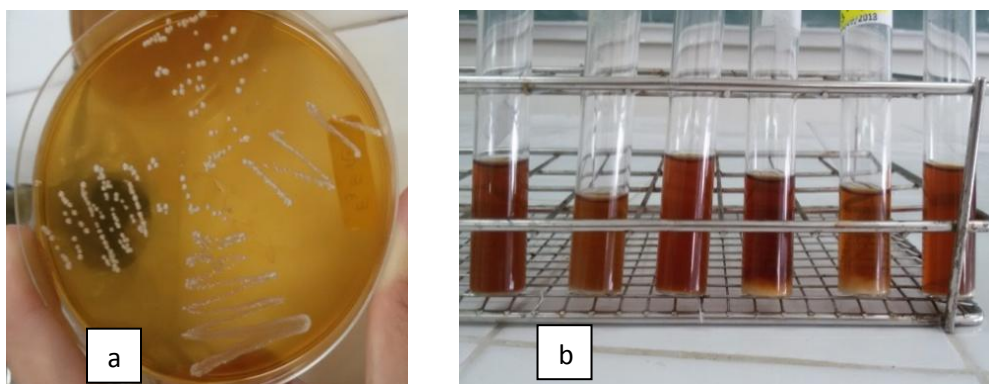


Figure 02 : Observation macroscopique des souches isolées. (a) Aspect des colonies sur la gélose MRS, (b) Culture dans le bouillon MRS.

III.1.2. Observation microscopique

Les isolats testés montrent après coloration de Gram (Figure 03a) des cellules de couleur violette, sous forme de bacilles avec différentes formes de regroupement ; en paires ou en courte chainettes, l'immobilité des cellules est vérifiée par observation à l'état frais (Figure 03b).

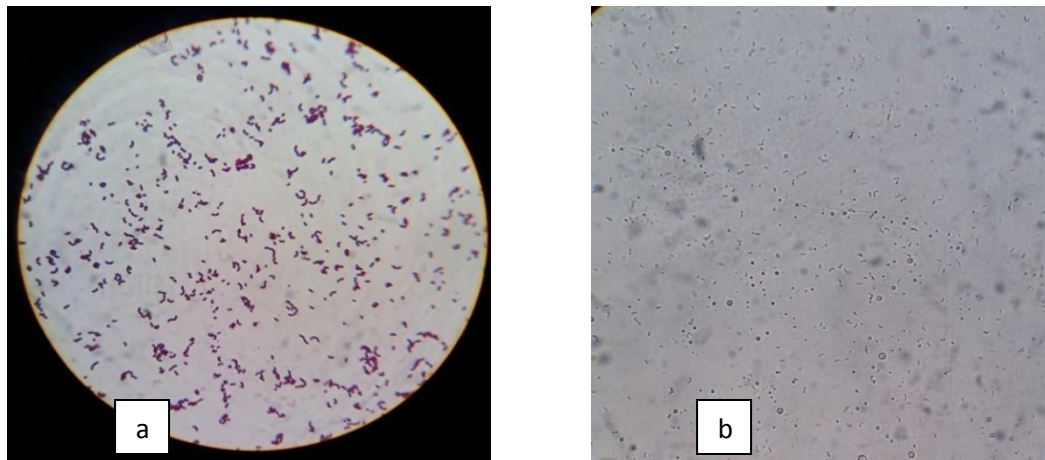


Figure 03 : Observation microscopique des souches isolées. (a) Observation après coloration de Gram (Gx100), (b) observation de l'état frais (Gx40)

I.3. Test de la catalase

Toutes les souches isolées sont dépourvues de la catalase d'où leur incapacité de dégrader l'eau oxygénée ce qui confirme leur identité comme BL (tableau 02) (**Tabak et Bensoltane, 2012**).

I.4. Type fermentaire

Toutes les souches testées forment un trouble dans le bouillon MRS et produisent de l'acide lactique au fond du tube, mais elles sont divisées en homo-fermentaires non productrices de CO₂ et hétéro-fermentaires qui produisent de faibles quantités de ce gaz selon le tableau 02. Les lactobacilles peuvent être homofermentaires ou hétérofermentaires selon les espèces ou les souches (**Muller, 1990 ; Badis et al., 2005**).

I.5. Croissance aux différentes températures

La croissance dans les différentes températures est traduite par l'apparition des troubles. Les résultats ont été résumés dans le tableau 02. D'après nos résultats, nous avons remarqué que tous les isolats sont des thermophiles qui peuvent pousser à 45°C, sauf la souche E3A qui ne pousse pas à 45°C mais à 30°C, donc elle est mésophile. Il est à noter que la souche E3C donne un résultat négatif à 15°C (**Badis et al., 2004**)

Partie II: Partie Expérimentale

I.6. Croissance à différentes concentrations de NaCl

Toutes les souches étudiées montrent une croissance en présence de 4% de NaCl, cependant elles ne peuvent pas résister la concentration de 6% sauf la souche E3A et la souche E3E (tableau 02) (**Badis et al., 2004**).

I.7. Recherche de l'arginine déshydratase

Toutes les souches étaient ADH négative sauf la souche E3F, ce qui explique leur incapacité à décomposer l'arginine et libérer l'ammoniac. Le test négatif se traduit par une couleur jaune du milieu de culture et le test positif transforme cette couleur en violette dû à l'hydrolyse de l'arginine après la fermentation du lactose (Tableau 02) (**Gelman et al., 2000 ; Badis et al., 2004**).

Tableau 02 : Résultats des différents tests d'identification des souches isolées.

Souche	Gram	Forme	Cat	ADH	Ferm	Température				NaCl	
						15°C	25°C	30°C	45°C	4%	6%
E3A	+	Cocco bacilles	-	-	HO	+	+	+	-	+	+
E3B	+	Cocco bacilles	-	-	HE	+	+	+	+	+	-
E3C	+	Bacilles courtes	-	-	HE	-	+	+	+	+	-
E3D	+	Bacilles isolées	-	-	HE	+	+	+	+	+	-
E3E	+	Cocco bacilles	-	-	HE	+	+	+	+	+	+
E3F	+	bacilles	-	+	HO	+	+	+	+	+	-

+ : Présence de croissance

- : Absence de croissance

Ferm : Type fermentaire

HO : homofermentaire, HE : hétérofermentaire

Les résultats des caractères biochimiques étudiés au cours de notre travail afin de caractériser le genre des bactéries lactiques isolées s'accordent avec ceux trouvés par **Badis et al. (2005)** et **Ennadir et al. (2014)**. Donc on peut présumer que nos BL isolées appartiennent au genre *Lactobacillus* sp.

Partie II: Partie Expérimentale

II. Evaluation de l'activité antimicrobienne des souches lactiques isolées

Pour un bon fonctionnement d'un probiotique, son activité antimicrobienne joue un rôle crucial. La capacité antibactérienne de nos souches contre quelques pathogènes est étudiée dans ce travail. Après centrifugation des cultures lactiques et mesure du pH des surnageants, il s'est avéré que les valeurs de pH obtenues diffèrent d'une souche à une autre selon la quantité des acides organiques produits (Tableau 03). Afin d'éliminer l'effet de ces acides dans l'inhibition des souches cibles, une neutralisation des surnageants a été effectuée par l'ajout du NaOH jusqu'à arriver à un pH proche de la neutralité (pH 6.8).

Tableau 03 : Valeurs du pH des surnageants avant neutralisation.

Souche	E3A	E3B	E3C	E3D	E3E	E3F
pH	4.8	5.16	5.15	4.38	4.6	5.1

Les résultats de ce test ont montré la présence d'une activité antibactérienne traduite par l'apparition des zones d'inhibition bien claires avec des bordures bien distinctes et des diamètres variables (Figure 04). Les résultats de cette activité sont présentés dans le tableau 04.



Figure 04 : L'effet des surnageant des bactéries lactiques sur *Pseudomonas* sp.

Partie II: Partie Expérimentale

Tableau 04: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches cibles induites par les bactéries lactiques isolées.

Souches	Zone d'inhibition (mm)									
	<i>E. coli</i> ATCC 20404		<i>Staphylococcus</i> sp.		<i>S. aureus</i> ATCC 29522		<i>Pseudomonas</i> sp.		<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	
Surnageant	NN	N	NN	N	NN	N	NN	N	NN	N
E3A	-	-	14	10	11	10	13	9	-	-
E3B	-	-	12	7	10	7	12	10	-	-
E3C	-	-	8	6	6	6	15	-	-	-
E3D	6	6	7	6	13	13	12	6	15	6
E3E	12	7	15	15	15	13	12	7	15	19
E3F	6	-	10	12	10	7	14	6	10	10

NN : non neutralisé, N : neutralisé

Selon la figure 05 qui représente les diamètres des zones d'inhibitions des surnageants neutralisés (N) et non neutralisés (NN) des souches lactiques contre les différentes souches cibles citées dans le tableau 04, on remarque que toutes les souches ont une activité antagoniste contre *Staphylococcus* sp., *S. aureus* ATCC29522 et *Pseudomonas* sp., toutefois seules les souches E3D, E3E, E3F expriment cette activité contre *E. coli* ATCC20404 et *L. monocytogenes*.

Cette activité antibactérienne des BL est probablement le résultat de la production des métabolites bactéricides ou bactériostatiques tels que le diacétyl, le peroxyde d'hydrogène, les bactériocines et les acides organiques qui peuvent abaisser le pH et rendent le milieu défavorable pour les bactéries pathogènes (Tulumoglu et al., 2013).

La présence d'une activité inhibitrice pour les surnageants neutralisés peut confirmer cette information et montre que nos souches sont capables de produire des métabolites à activité antibactérienne autres que les acides organiques.

Partie II: Partie Expérimentale

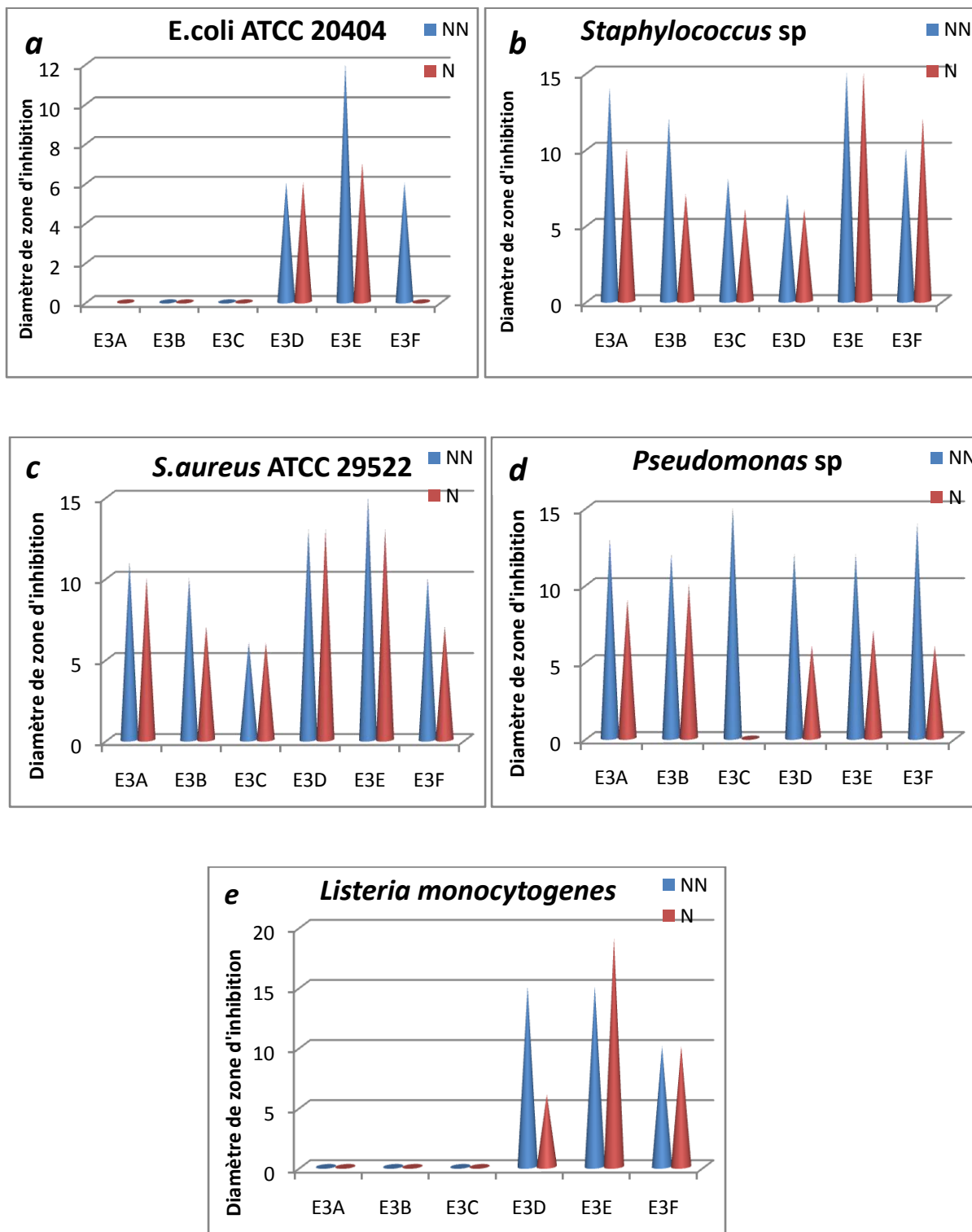


Figure 05 : Diamètres des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne des isolats contre les bactéries cibles par les surnageants non neutralisés (NN) et les surnageants neutralisés (N).

Partie II: Partie Expérimentale

Nous remarquons que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'activité antibactérienne que les Grams négatifs. Des résultats semblables ont été obtenus par plusieurs chercheurs, dont **Bagher (2017)**, qui a expliqué ça par l'effet non efficace ou moins efficace des bactériocines sur les bactéries à Gram négatif par rapport à leurs effets sur les bactéries à Gram positif (**Bagher, 2017**). Car ces dernières sont caractérisées par la présence des anions sur leurs membranes qui interagissent avec les bactériocines et conduisent à la formation des pores dans leur couche de peptidoglycane (**Zacharof et Lovitt, 2012**).

Les trois souches E3D, E3E, E3F peuvent être donc utilisées dans la bio-préservation des aliments car elles ont une activité antibactérienne contre les pathogènes alimentaires (*S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*...) (**Wang et al., 2010**).

III. Evaluation de l'activité antioxydante

III.1. Par la méthode DPPH

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante d'un composé ou d'une cellule bactérienne, plusieurs méthodes sont mises en évidence, toutes basées sur le piégeage des radicaux (**Kouassi, 2017**). Le plus utilisé est le radical DPPH à cause de sa simplicité et la rapidité de la réalisation du test (**Prior et al., 2005**). Le principe de ce test repose sur la réduction du DPPH en solution méthanolique en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène qui transforme le DPPH en DPPH₂ non radicalaire, ce phénomène est traduit par la réduction de la coloration violette de la solution DPPH et ainsi la diminution de l'absorbance à 517nm, qui est fonction de l'activité anti oxydante (**Zhang et al., 2011**).

La figure 06 représente le pourcentage de piégeage du radical DPPH par les différentes souches lactiques. Selon la figure, on remarque que nos souches montrent différents niveaux de piégeage de ce radical, les valeurs varient entre 71.3 % et 52.9% pour les cellules intactes, et entre 94.59% et 2.64% pour leurs surnageants. La plus haute valeur a été remarquée avec le surnageant de la souche E3D par un pourcentage de 94.59%, ceci est probablement associé à la présence de différents métabolites cellulaires dans le surnageant qui ont une activité antioxydante, tels que les EPS, les protéines, les peptides, les microéléments et d'autres molécules.

Partie II: Partie Expérimentale

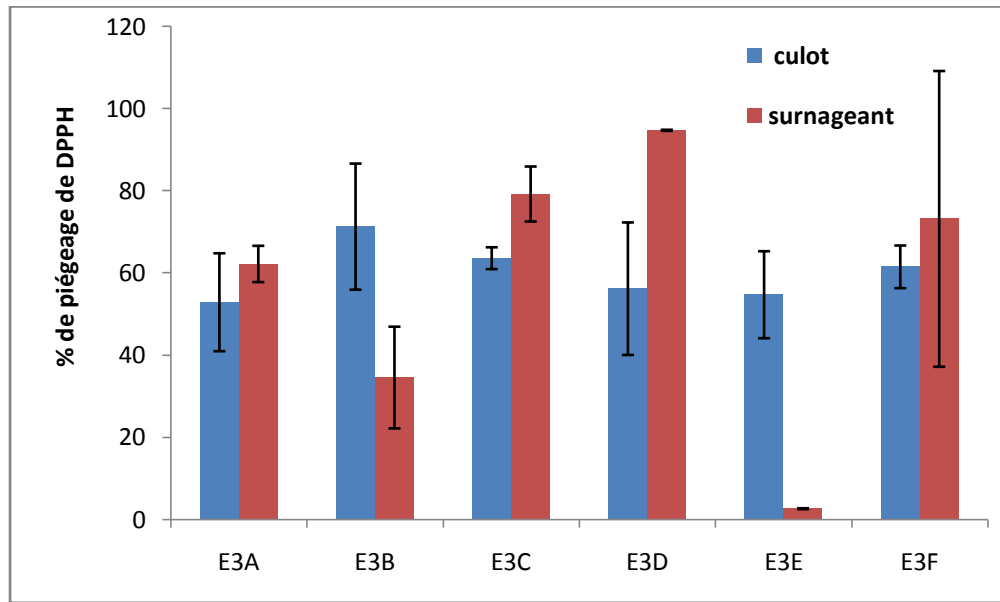


Figure 06 : Résultats du pourcentage de piégeage du radical DPPH par les BL isolées.

Pour les cellules intactes, la valeur la plus grande est celle de la souche E3B, toutefois il est remarquable que toutes les cellules ont une activité de piégeage du DPPH relativement considérable. L'étude de **Li et al. (2012)** a montré que les protéines et les polysaccharides de la surface bactérienne ont une capacité importante de piéger le radical DPPH, cela peut expliquer les résultats obtenus par les cellules intactes.

III.2. La résistance au peroxyde d'hydrogène

Malgré la faible toxicité du peroxyde d'hydrogène, il est impliqué dans la formation des ROS tels que les radicaux hydroxyles qui entraînent des dommages dans les cellules. Les bactéries qui possèdent une catalase sont très résistantes aux H_2O_2 mais les BL en générale et comme notre étude le montre ont une faible résistance au H_2O_2 en raison de l'absence de cette activité (**Tang et al., 2016**).

En comparant la croissance cellulaire en absence et en présence du H_2O_2 à différentes concentrations (Figure 07), on peut remarquer que la croissance des souches est affectée par sa présence en diminuant leurs taux de croissance, ce qui indique que la présence du peroxyde d'hydrogène cause des dommages pour la cellule bactérienne entraînant une diminution de la croissance (**Wang et al., 2006**).

Toutefois, la survie des cellules est remarquable chez toutes les souches jusqu'à 48 h d'incubation même en présence de fortes concentrations en H_2O_2 (1 mmol) sauf pour la souche E3A qui n'a pas pu le résister plus de 3h avec les deux concentrations 0.7 et 1 mmol. Ce résultat confirme la présence

Partie II: Partie Expérimentale

d'autres systèmes de défense chez ces bactéries à catalase négative contre le H_2O_2 autre que l'enzyme catalase.

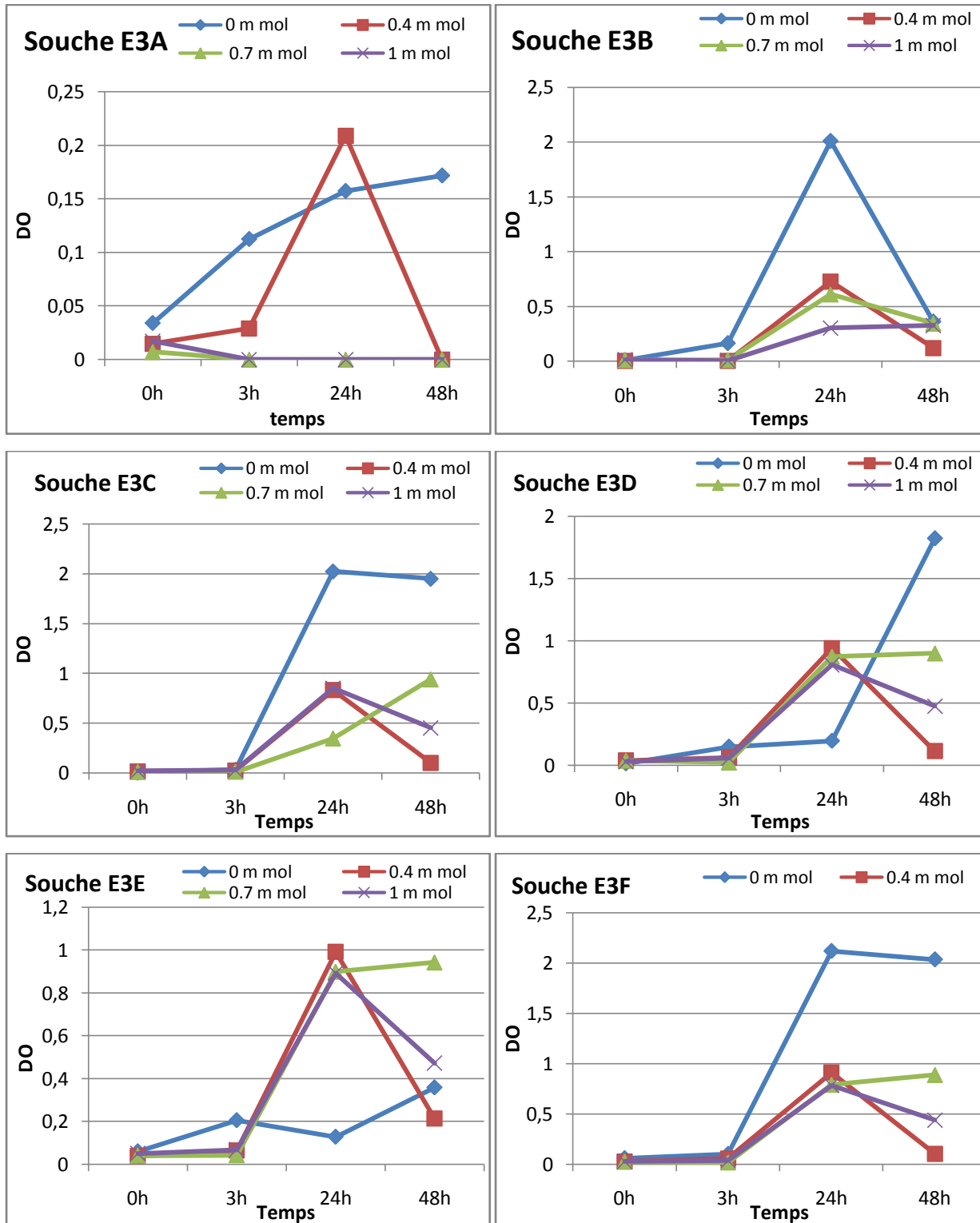


Figure 07 : Croissance des BL isolées en absence et en présence du peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations.

III.3. La capacité de piégeage du radical hydroxyle

Le radical hydroxyle, qui est le ROS le plus réactif et le plus toxique, a une courte durée de vie, il s'agit d'un oxydant très puissant pouvant réagir de manière non spécifique avec l'ADN et les protéines et intervient dans la peroxydation lipidique, ce radical peut provenir soit de la réaction entre $O_2^{\cdot-}$ et le H_2O_2 , ou de la réaction de Fenton (Desmier, 2016).

La figure 08 représente le pourcentage de piégeage du radical hydroxyle par les cellules des BL et leurs surnageants séparément. On remarque que les cellules intactes possèdent une capacité de piégeage plus importante que les surnageants où les valeurs sont entre 80.80% pour la souche E3C et 58.41% pour la souche E3A. Les autres valeurs sont importantes et égales à 71.39%, 71.01%, 68.67% et 73.35% pour les souches E3B, E3D, E3E et E3F, respectivement. Ces résultats peuvent être expliqués par la présence des polysaccharides sur la surface bactérienne qui peuvent inhiber la formation des radicaux hydroxyles par capture de l'hydrogène ou des électrons générés par le système Fe^{+2}/H_2O_2 (Xu et al., 2001).

La capacité « scavenger » des surnageants est aussi importante est variée entre 59.41% (E3D) et 9.01% (E3C). Selon Li et al., (2012) ces chiffres sont le résultat de la capacité des EPS présents dans le surnageant de chélater les ions de transition et inhiber la formation des radicaux hydroxyles (Li et al., 2012).

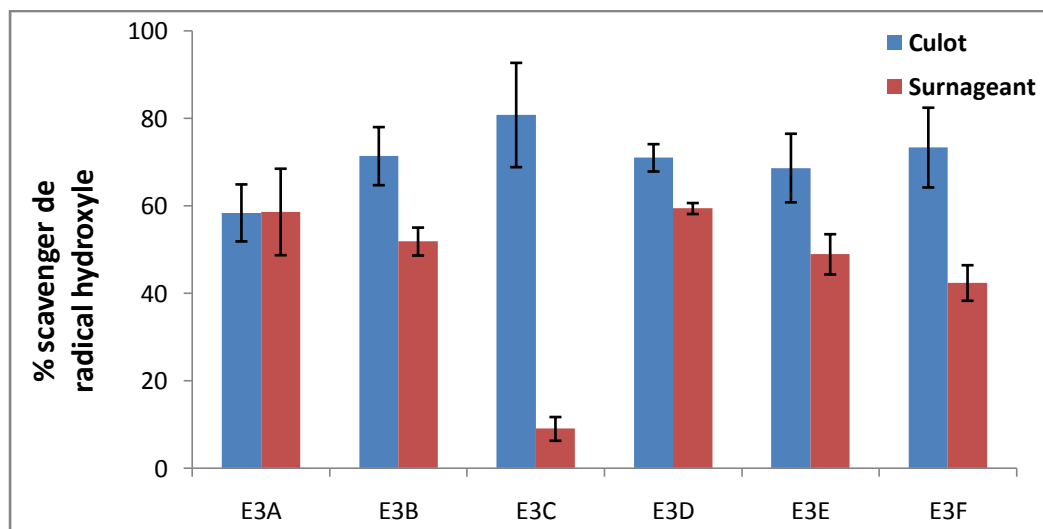


Figure 08 : Pourcentage de piégeage du radical hydroxyle par les BL isolées.

Partie II: Partie Expérimentale

III.4. La chélation des ions de fer

Parmi les nombreux ions métalliques impliqués dans les réactions d'oxydation, les ions de fer sont des catalyseurs très réactifs, les plus abondants et les plus importants pour la formation des ROS en particulier les radicaux hydroxyles toxiques (Zhang et al., 2011) :



Les résultats de ce test ont montré que toutes les cellules intactes ont une capacité de chélater le fer relativement importante (Figure 09), la plus élevée est remarquée chez la souche E3E avec 78.88% et la plus faible chez la souche E3B avec 42.58%, cependant, cette dernière présente le pourcentage le plus élevé de chélation dans son surnageant qui est égal à 93.3%. D'autre part, les surnageants des souches E3C et ECD ne possèdent aucune activité.

Cette activité pourraient être due aux protéines chélateurs de fer qui sont soit fixées sur la surface ou celles excrétées à l'extérieur, qui peuvent capturer le fer et inhiber son oxydation. Donc les effets élevés de chélation des BL sont très bénéfiques (Kim et al., 2004).

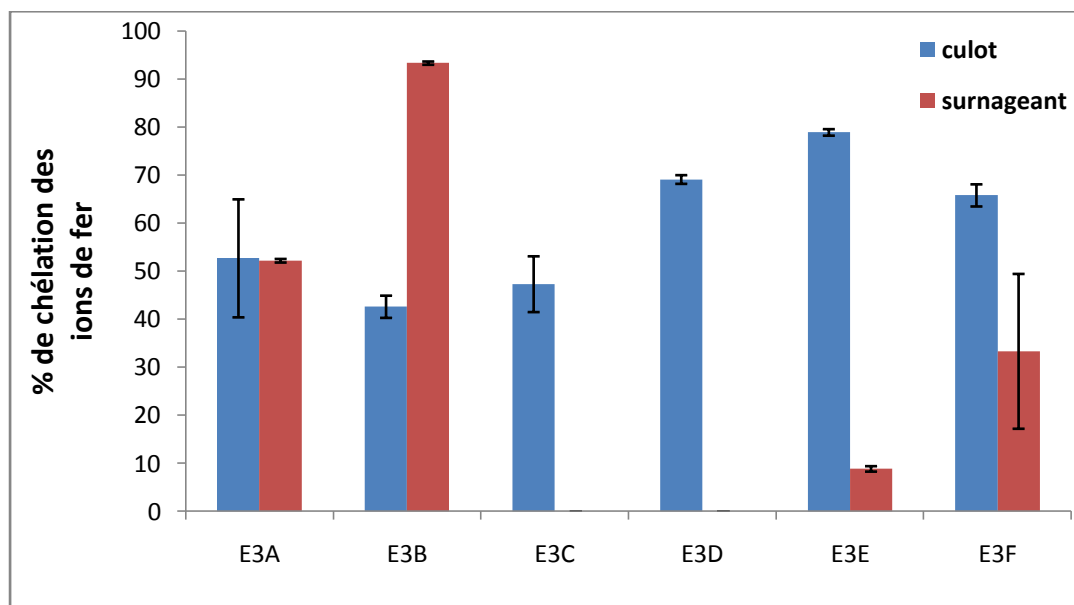


Figure 09 : Pourcentage de chélation des ions de fer par les différentes souches bactérienne.

III.5. Capacité d'inhibition de l'auto-oxydation de l'ascorbate

Plusieurs méthodes permettent de mesurer la capacité antioxydante totale des bactéries lactiques qui diffèrent par leurs réactions chimiques et leurs méthodes de calcul. Nous avons dans notre travail

Partie II: Partie Expérimentale

réalisé ce test en se basant sur le calcul du pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide ascorbique par les souches testées.

Le choix de l'acide ascorbique repose sur sa grande fonction dans l'organisme, défense contre les infections bactérienne et virale, protection des vaisseaux sanguins et assimilation du fer, il est aussi considéré comme un bon capteur des espèces réactives d'oxygène et des radicaux libres. Donc la capacité d'inhibition de son auto-oxydation est considérée comme une activité antioxydante qui sert à diminuer les dommages causés par les ROS (Kim et al., 2004 ; Lenzi, 2011).

On remarque que toutes les souches étudiées ont une capacité d'inhiber l'oxydation de l'acide ascorbique (Figure 10), la plus élevée est celle de la souche E3B avec un pourcentage de 50.01%. Ces résultats montrent que ces souches peuvent être utilisées comme additifs alimentaires pour conserver la valeur de cette vitamine durant la période de stockage et de commercialisation des produits par inhibition de leur oxydation (Hyardin, 2008).

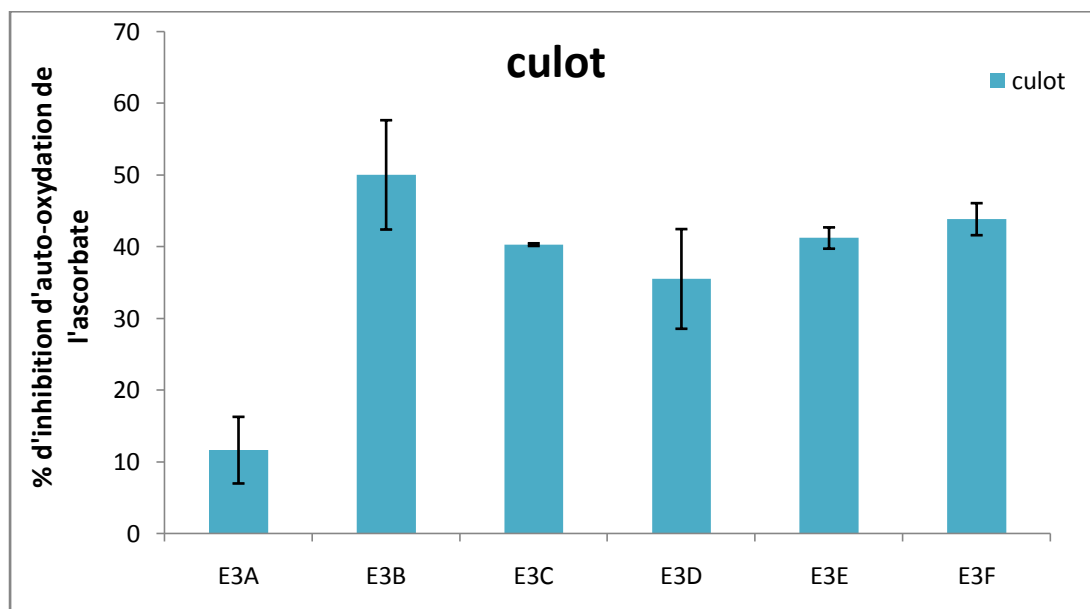


Figure 10 : Pourcentage d'inhibition de l'auto oxydation de l'acide ascorbique par les BL isolées.

IV. Caractérisation des souches intéressantes

L'étude de la survie des souches *in vitro* pourrait donner une prédiction sur leur survie effective *in vivo* lorsqu'elles sont consommées de façon non protégée (Zhang et al., 2011). La résistance à l'acide de l'estomac et à la bile constituent les principaux critères de sélection des souches probiotiques.

Partie II: Partie Expérimentale

IV.1. Résistance à l'acide

D'abord, le pH du suc gastrique est d'environ de 2 (entre 1 et 4.5 en fonction des changements physiologiques) et la digestion des aliments prend environ 3h (Maragkoukakis et al., 2006). Selon ces conditions on a choisi le travail à pH 2.0 pendant 3h *in vitro* comme une condition extrême de l'estomac utilisée pour sélectionner les souches résistantes à ces conditions hostiles du tube digestif (Con et al., 2001).

Les souches qui avaient une forte activité antioxydante (E3B, E3C, E3D, E3F) parmi les six souches de départ, ont été testées pour évaluer leur résistance à l'acide et la bile comme des caractères probiotiques. D'après les courbes de survie à pH 2.0 (Figure 11), on remarque que nos souches testées présentent une forte résistance au pH 2.0 dont le pourcentage de survie est entre 98.6 % (E3D) et 93.82 % (E3B) après 4h d'incubation, cependant, la survie des souches E3C et E3F après ce temps d'incubation est de 96.51% et 98.66%, respectivement.

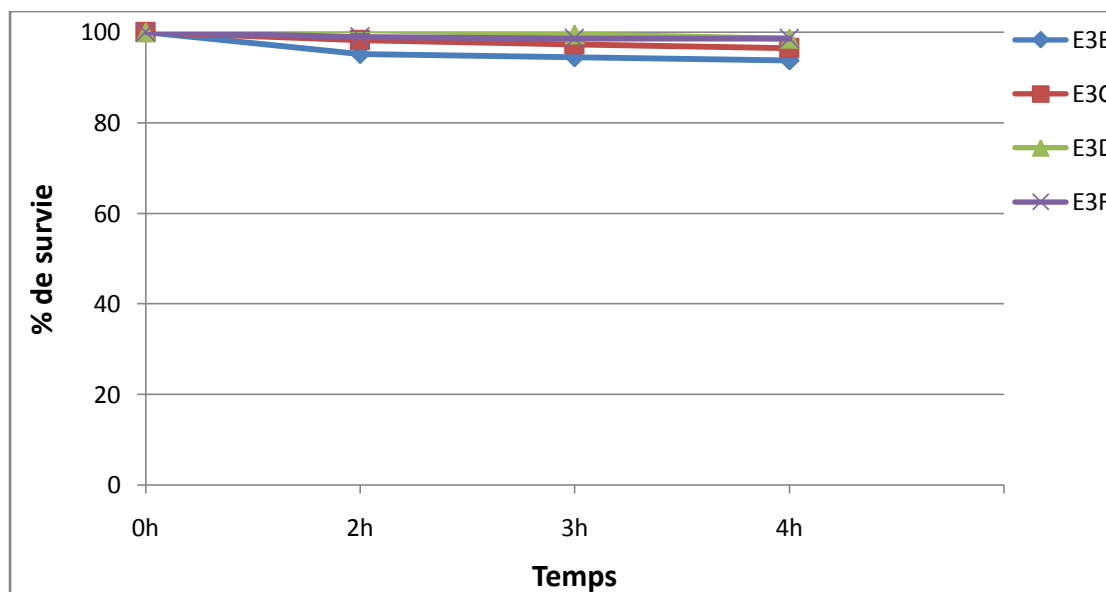


Figure 11 : Croissance des isolats intéressants à pH 2.0 au cours du temps.

A pH 2.0, toutes les souches étudiées ont résisté avec une faible diminution de leur viabilité par rapport au témoin où la souche est incubée à pH 6.4 (Annexe). Ces résultats sont similaires à ceux de Wang et al. (2010) qui ont trouvé que les souches *Lactobacillus* peuvent résister à pH 2.0 mais avec une perte en nombre. Certaines souches ont un pourcentage de survie proche de celui trouvé par les miennes; 91.37% et 97.79%. Toutefois, il faut signaler que le pH de l'estomac *in vivo* peut chuter jusqu'à un pH inférieur à 1.0, dans ce cas il faut augmenter le nombre de bactéries dans les préparations ingérées ou

Partie II: Partie Expérimentale

les protéger par encapsulation afin d'assurer leur nombre suffisant pour exercer l'effet probiotique souhaité (**Prasad et al., 1998**).

La résistance des souches au stress acide dans le suc gastrique ou dans les produits alimentaires peut être due à l'expression de la protéine glutathion (GSH) par ces bactéries (**Zhang et al., 2007**) qui protège de plus ces souches contre le stress oxydatif (**Li et al., 2003**). L'étude de la résistance de ces souches aux valeurs faibles du pH est importante non seulement pour la résistance au stress gastrique, mais aussi pour la survie dans les aliments où elles sont ajoutées comme additifs et compléments alimentaires (**Wang et al., 2010**).

IV.2. Résistance aux sels biliaires

La bile joue un rôle fondamental dans la défense spécifique et non spécifique de l'intestin (**Wang et al., 2010**). Sa concentration physiologique chez l'Homme est comprise entre 0.3% et 0.5%, et la concentration de 0.3% est souvent considérée comme critique pour la sélection des souches résistantes (**Prasad et al., 1998, Wang et al., 2010**).

On remarque d'après les courbes obtenues (Figure 12) que la bile peut causer un stress sur les bactéries, celui-ci diffère selon la concentration de cette dernière, cela se traduit par la diminution du taux de croissance des souches par rapport au témoin.

Partie II: Partie Expérimentale

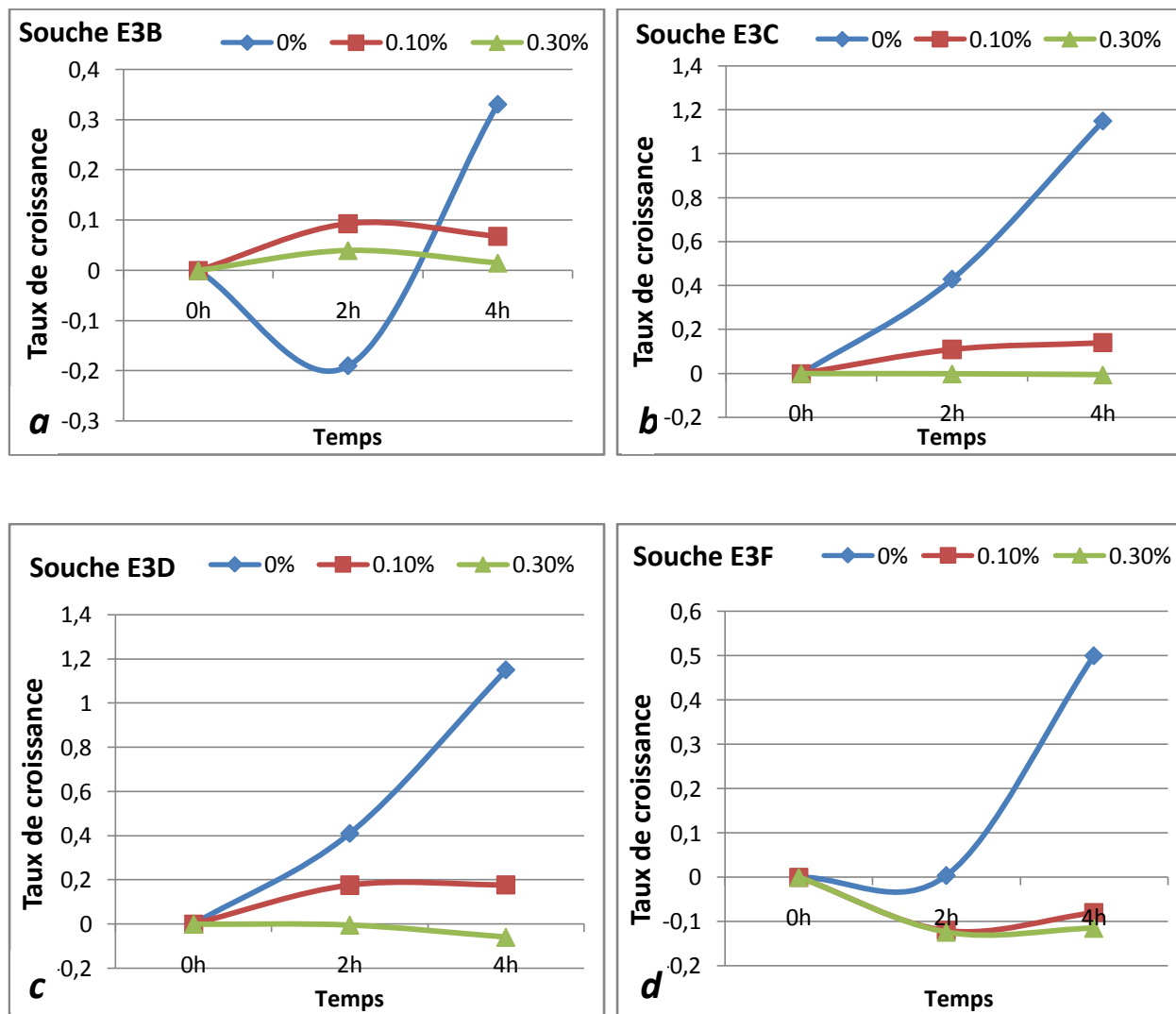


Figure 12 : Taux de croissance des souches lactiques en absence et en présence de la bile à différentes concentration au cours du temps.

Il a été suggéré que les BL résistantes au stress de la bile possèdent généralement l'enzyme Bile Salt Hydrolase (BSH) (Wang et al., 2010), Hydrolase des sels biliaires active qui est considérée comme facteur de colonisation important de l'intestin et responsable de la réduction du taux de cholestérol par la déconjugaison des sels biliaires (Kumar, 2012).

Malgré le stress cité précédemment, nos souches présentent une certaine résistance car elles peuvent croître dans la concentration 0.1% de la bile (E3B, E3C, E3D), ou faiblement diminuer pour la souche E3F (Figure 13). Pour la concentration 0.3% de la bile, on remarque que la croissance des souches est faiblement altérée car après 4h d'incubation les pourcentages de survie varient entre 106.2% et 53.6%.

Partie II: Partie Expérimentale

La haute valeur est enregistrée avec la souche E3B où elle représente une grande stabilité à cette concentration de la bile, sa résistance est considérée comme excellente. Les autres souches représentent un pourcentage de survie de 97.7%, 76.22% et 53.6% pour les souches E3C, E3D, E3F, respectivement.

Les travaux de **Shahbez** et ces collègues ont trouvé que la résistance de certaines souches probiotiques à une concentration de 0.3% de la bile diffère d'une souche à une autre où la souche *B. bifidus* montre un pourcentage de survie proche de celui trouvé chez notre souche E3B qui est égale à 106% (**Shahbez et al., 2017**). Les résultats de **N'tcha et al.** s'accordent aussi avec nos résultats obtenues avec la souche E3B, où ils ont trouvé que *L. fermentum* peut résister à une concentration de 0.3% de la bile après 2h d'incubation par un pourcentage de 106% (**N'tcha et al., 2016**).

Partie II: Partie Expérimentale

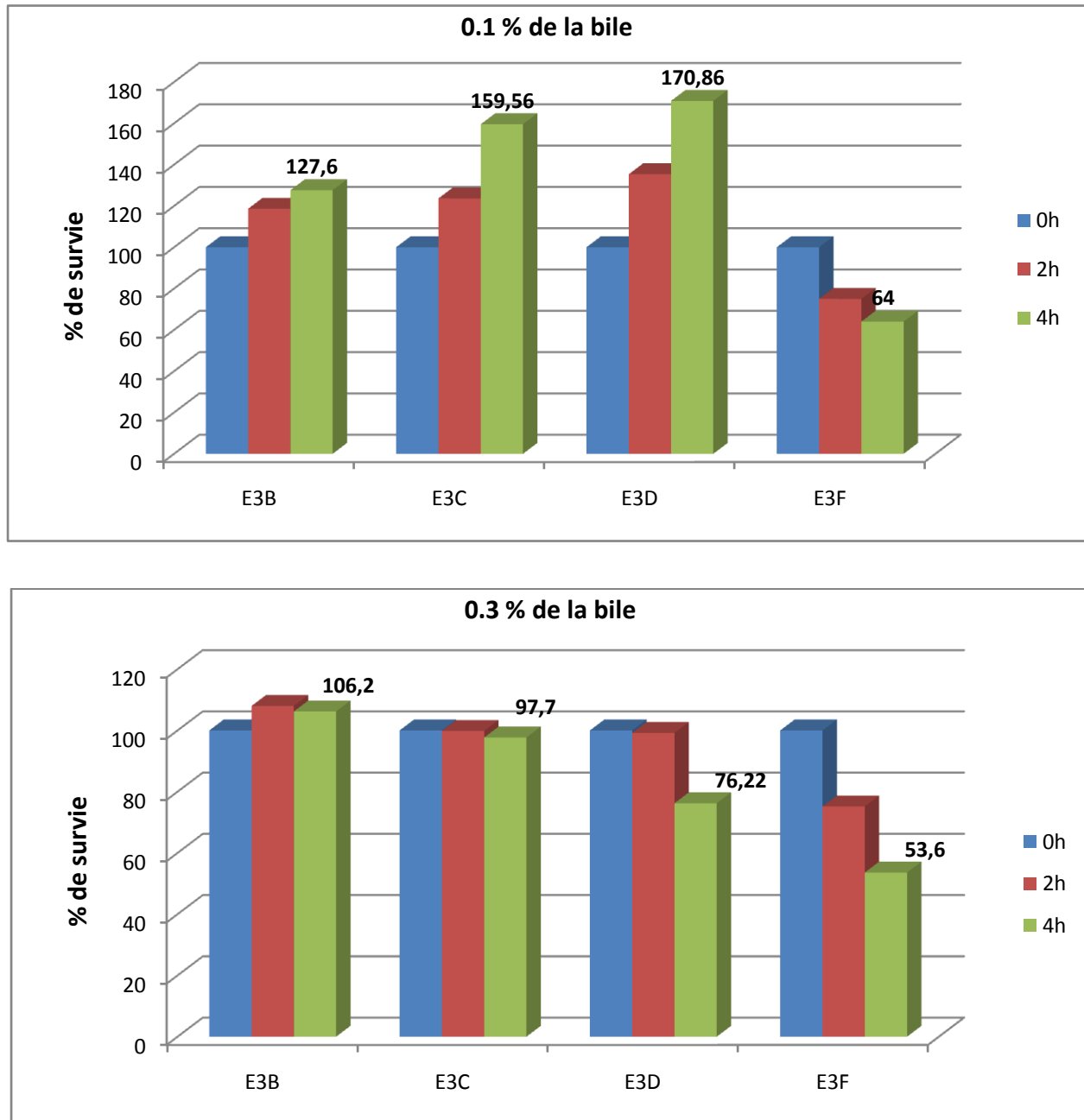


Figure 13 : Pourcentage de survie des souches lactiques isolées dans la concentration 0.1% et 0.3% de la bile au cours du temps.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de ce travail est d'isoler et d'identifier des souches de bactéries lactiques à partir des selles des nourrissons, évaluer leur activité antibactérienne et antioxydante et enfin d'étudier la résistance des meilleures souches au pH acide et à la bile comme caractères probiotiques.

Six souches ont été isolées et des tests d'identification ont été réalisés. Ces derniers nous ont permis de déterminer l'appartenance des souches au genre *Lactobacillus* sp.

En ce qui concerne l'activité antimicrobienne, nous avons trouvé que les six souches ont une activité anti *Satphylococcus* sp, anti *Staphylococcus aureus* ATTC 29522 et anti *Pseudomonas* sp. Cependant seulement trois souches ont une activité anti *Escherichia coli* ATCC 20404 et anti *Listeria monocytogenes*.

L'activité antioxydante de ces souches a été évaluée *in vitro* par différentes méthodes, qui ont affirmé que nos souches ont une capacité antioxydante considérable avec différents degrés.

Pour l'utilisation des ces souches comme probiotiques où comme additifs alimentaires, nous avons testé leur résistance au pH acide et à la bile et nous avons trouvé que ces bactéries montraient une excellente résistance à ces deux paramètres.

Dans le cas d'isolement de souches à caractères intéressants comme nos souches, des études complémentaires et plus poussées restent toujours nécessaires pour déterminer la nature des métabolites antibactériens sécrétés par les souches isolées. De plus, des études *in vivo* sont nécessaires pour évaluer leur activité antioxydante.

Références bibliographiques

A

Abdhul, K., Ganesh, M., Shamughapriya, S., Kanagavel, M., Anabarasu, K., Natarajaseenivasan, K. (2014). Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain *Enterococcus faecium* (BDu4) from Nagari. *International Journal of Biological Macromolecules*. 70, 450-454.

Aboseidah, A., Rasmey, A., Osman, M., Desouky, S., Kamal, N. (2017). Cholesterol reduction in vitro by novel probiotic lactic acid bacterial strains of *Enterococcus* isolated from healthy infants' stool. *African Journal of Microbiology Research*. 11(38), 1434-1444.

Aly, S., Cheik, O., Imael, B., Alfred, T. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria. *African Journal of Biotechnology*. 5 (9), 678-683.

Apak R. Özyürek M. Güçlü K. Çapanoğlu E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer(et)-based assays. *Agricultural and Food Chemistry*. 64, 997–1027.

Asakalidou, E., Papadimitriou, K. (2001). *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*, Editos-Springer. 111-120.

B

Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B., Henni, D., Kihal, M., (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiolgy*. 21, 579- 588.

Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M, et Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux population locales « Arabia et kabyle ». *Science et Technologie*. 23, 30-37.

Bagher Hashemi, S.M., Mousavi Khaneghah, A., Kontominas, M, Es, I., Sant' Ana, A., Martínez, R., Drider, D,(2017). Fermentation of sarshir by lactic acid bacteria: Antibacterail activity, antioxidant properties, lipid and protein oxidation and fatty acid profile. 97, 4595-4603.

Balcàzar, L., Vendrell, D., Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Girone, O., Muzquiz, L. (2007). In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Veterinary Microbiology*. 122, 373–380.

Références bibliographiques

Bougandoura, N., Bendimerad, N. (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.)* Briq. Nature & Technologie. (9), 14–19.

Boukefoussa, Z. (2012) Etude de l'effet probiotique de quelques bactéries lactiques vis-à-vis de l'intolérance au lactose. Thèse de Magister Université Hassiba Ben Bouali.

Bruneau, A., Baylatry, M., Joly, A., Sokol, H. (2017). Le microbiote intestinal : quels impacts sur la carcinogénèse et la traitement du cancer colorectal ? Bulletin de cancer 105, 70-80.

C

Cintas, L., Casaus, M., Herranz, C., Nes, I., and Hernandez, P. (2001). Bacteriocine of lactic acid bacteria. Food Science and Technology International. 7, 281-305.

Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygens. FEMS microbiology reviews.

Carole Kouasse, M., (2017). Polysaccharides fonctionnalisés par des composés d'origine naturelle aux propriétés antioxydants et antibactériennes. Université de ROUEN.

Chieh Wang, Y., Chui Yu, R., Chun Chou., C. (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food microbiology 23.128-135.

Con, H., Gokalp, Y., Kaya, M. (2001). Antagonistic effect on *Listeri monocytogenes* and *Listeria innocua* of a bacteriocin- like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. Meat science. 59, (4): 437-441.

D

Daniluk, U. (2012). Probiotiques thé, new approach for cancer prévention and/ or potentialisation of anti cancer treatment. Journal of Clinical and Experimental Oncology. 1: 2.

De reynal, B., Jean, Multon, L. (2009). Additifs et auxiliaries de fabrication dans les industries agroalimentaire. TEC and DOC edition. 4^{eme} édition. Lavoisier. Paris.

Desmier, T. (2016). Les antioxydants de nos jours, définition et applications. Thèse pour l'obtention de docteur en pharmacie. Université de limoges faculté de pharmacie.

Djabouni, F. (2013). Evaluation de l'activité antimicrobienne des isolats de bactéries lactiques et détermination de spectre d'action de leurs biopeptides vis-à-vis des germes d'altération. Thèse de doctorat. Université d'Oran, Es-Séria.

Références bibliographiques

Drider, D., Prévost, H. (2009). Bactéries lactiques. *Economica journal*.71-120.

E

Ebel, B. (2012). Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie module, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz. thèse de docteur de Université de Bourgogne.

Edeas, M. (2006). La curcumine. Springer. *Phytothérapie*. 4, 230-233.

Ennadir, J., Hassikou, R., Al Askari, G., Arahou, M., Bouazza, F., Amallah, L., Amine, S., Khedid, K. Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine marocaine. *Mater Environmental Science*. 5 (4), 1125-1132.

F

Faisal, M., Akram, S., Ashraf, M., Ali, S., kazmi, S. (2017). Isolation of gram positive bacteria from different sources and evaluation of their probiotic properties. *Journal Med Microbial Infection Disease*. 5 (1-2), 12-16.

Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 64, 390-396.

Fond, G., Chevalier, G., Eberl, G., Leboyen, M. (2015). Le rôle potentiel du microbiote intestinale dans les troubles psychiatriques majeurs: mécanismes, données fondamentale comorbidités gastro intestinales et options thérapeutique. 45, 7-19.

G

Gardés, M., Albert, Bonnefont, D., Rousselot, abedinzadeh, Z., et Jone, D., (2003). Espèce réactives d'oxygène, comment l'oxygène peut-il toxique ? 2003 : 1.

Gelman, A., Drabkin, V., Glatman, L., (2000). Evaluation of lactic acid bacteria isolated from lightly preserved fish products starter cultures for new fish based food products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 1, 219-622.

Gheziel, C., Russo, P., Arena, M., Spano, G., Ouzari, H., Kheroua, O., Saidi, D., Fiocco, D., Kddouri, H., Capozzi, V. (2018). Evaluating the probiotic potential of lactobacillus plantarum strains from Algerian infant faces: Towards the design of probiotic starter cultures tailored for developing countries. *Probiotics and antimicrobial proteins*. V(2018), 1-11.

Références bibliographiques

H

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O, Charlier, C., Chapelle, JP. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège.* 62, 628-638.

Hilmi Çon, A., Yusuf Gökalp, H., Kaya M, (2001). Antagonistic effect on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua* of a bacteriocin-like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. *Meat Science.* 59, (4): 437-441

Hyardin, A. (2008). Etude de la fonctionnalité alimentaire de plats industriels. Thèse de doctora en procédé biotechnologiques et alimentaire. Institut national polytechnique de lorraine.

K

Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri, M., Settharaksa, S., (2013). In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Clinical microbiology.* 333, 1-8.

Kashef, N., Hamblim, M. (2017). Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? *Drug Resistance Updates.* 31, 31-42.

Kawaski, S., Watanada, M., Fukiya, S., Yakota, A. (2018). Stress responses of *Bifidobacteria*: Oxygen and bile acid as the stressors (7), *The Bifidobacteria and related organisms.* 131-143.

Khalil, R., Mohrous, H., El-Halfawy, K., Kamaly, K., ElSoda, M.(2007). Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in egypt. *African Journal of Biotechnology.* 6(7), 939-949.

Kim, H.S., Chae, H.S., Jeong, S.G., Ham, J.s., Im, C.N., Ahn, C.N., Lee, J.M. (2004). Antioxidant activity of some yogurt starter cultures. *Asian- Australasian journal of animal science.* 18, 255-258.

Kim, H-S., Chae, H-S., Jeong, S-G., Ham, J-S., Im, S-K., Ahn, C-N and Lee, J-M., (2005). Antioxydant activity of some yogurt starter cultures. *Journal of Animal Science.* 18 (2) ; 255-258.

Kouassi, M. C. (2017). Polysaccharides fonctionnalisés par des composés d'origine naturelle aux propriétés antioxydantes et antibactériennes. Thèse de Doctorat, Université de Normandie.

Références bibliographiques

Kullissar, T., Zilmen, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, A. (2001). Two antioxidative lactobacilli strains promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 72, 215-224.

Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Chakraborty, C., Singh, B., Maritta, F., Jain, S., Yadav, H. (2012). Cholesterol lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental Diabetes Research*. 2015 ,14.

Kumar, M., Kumar, A, Nagpal, R., Mohania, D., Behare, P., Verma, V., Kumar, P., Poddar, D., Aggarwal, P., Henry; C., Jain, S., Yadav, H. (2010). Cancer- preventing attributes of probiotics: an update. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 61(5): 473-496.

L

Labioui, H., Elmoualdi, L., Elyachioui, M., Ouhassine, M., (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull soc. Pharm. Bordeaux*. 144, 237-250.

Laguerre, M. (2008). Bases moléculaires de la capacité antioxydant de composés phénoliques : étude en milieux homogène, émulsionné et cellulaire. Thèse de doctorat, Université montpellier 2 .

Langhendries, JP., paquay, T., Hannon, M., Darimaount, J. (1997). Acquisition de la flore intestinale neonatal: rôle sur la morbidité et perspectives thérapeutiques. *Archives de pédiatrie*. 5, 644-653.

Lenzi, F. (2011). Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traineau en course de sprint. Pour l'obtention de grade de docteur vétérinaire. Lyon.

Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., Niu, C., Yang, Z., Wang, Q. (2012). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional chinese fermented foods. *Food Chemistry*. 135, 1914-1919.

Li, Y., Hugenholtz, J., Abee, T., Molenaer, D. (2003). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(10), 5739-5745.

Lin, M et Chang, F., (2000). Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive Diseases and Sciences*. 45(8), 1617–1622.

Références bibliographiques

Ljungh, A., Wadstrom, T.(2005). Lactic acid bacteria are brobiotics. issues intestinal microbiol 7, 73-90.

M

Mahdhi,A., Leban,N., Chaouch,MA., Hafsa,J., Fdhila,K., Mahdouini,K., Majdoub,H. (2017). Extracellulaire polysaccharide derived from potential probiotic strain with antioxidant and antibacterial activites as a probiotic agent to control pathogenic bacterial biofilm formation, microbial pathogenesis. **109, 214-220.**

Maragkoudakis,P., Zoumpoulou, G., Miaris, Ch., Kalantzopoulos, G, pot, B.,Tsakalidou,E., (2006).Probiotic potential of lactobacillus strains isolated from dairy products. International Dairy Journal. 16, 189-199.

Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., Prajapati,J. (2015). Probiotics as potential antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **613, 14, 3615-3626.**

Miyoshi, A., Rochat, T., Gratadaux, F., le loir, Y., Costa oliveira, S., Langella, P., Azevedo, V. (2003). Oxidative stress in *Lactococcus lactic*. Genetics and Molecular Research. 2(4), 348-359.

Mohamed, W., Al. Rabeea, O., Abu Shady, H., and Allah I. Youssef, H. (2017). Combining prebiotic and mixture of freeze dried probiotics to develop symbiotic that induce apoptosis in human colon tumor cells. Egyptian Journal of Microbiology, 52, 101-111.

Moon, J. K., Shibamoto, T, (2009). Antioxidant assays for plant and food components. J Agr Food Chem. 57, 1655-1666.

Mostefaoui,A., Hakem, A., Yabrir B., Boutaiba,S., Badis, A. 2014.Screening for exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian raw camel milk. African journal of Microbiology Research,8(22),2208-2214.

N

N'tcha, C., Haziz, S., Agbobatinkpo, P., Vieira- Dalodé, G., Boya, B., Claude Codija, J., Kayodé, P., Baba- Moussa, L. (2016). Probiotic propertires of lactic acid bacteria isolated from a beninese traditional beer's ferment. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. 7,314-330.

Références bibliographiques

P

- Papamamoli, E., Tzanetakis, N., Litpoulou- Tzanetaki, E., Kotzekidou, P. (2003).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry- Fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*. 65, 859-867.
- Persichetti, E., De Michele, A., Codini, M., Triaina, G. (2014).** Antioxydative capacity of *Lactobacillus Fermentum* evaluated *in vitro* by oxygen radical absorbance capacity Assay. *Nutrition*. 30, 936-938.
- Piard, Jc., Desmazeamd, M., (1991).** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.1. oxygen metabolites and catabolism end-products. INRA, station de recherche laitières, unité de microbiologie, 78350 Jouy –en-Josas, France.
- Pisoschi, A., negulescu, G. (2011).** Methods of total antioxidant activity determination – *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 1, 25
- Prior, R., Wu, X., Schoirch, K., (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 4290-4302.

R

- Rndolf, I., Salganik, k., MD, Phd. (2001).** The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *Journal of the American College of Nutrition*. 20(5), 464-472.
- Rubio, R., Jofré, A., Belén, M., Aymerich,T., Garriga, M. (2014) .** Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiology*. 38, 303-311.

S

- Salminen, S., Wright, A., Ouwehand, A. (2004).** Lactic acid bacteria- Microbiological and functional aspects- 3^{ème} édition- - Marcel Dekker.Inc- page: 375-380.
- Sandes, S., Alvim, L., Silva, B.,Acurcio, L., Santos,C., Campos,M., Nques,A.2017.** Selection of new lactic acid bacteria strains bearing probiotic features from mucosal microbiota of healthy

Références bibliographiques

calves: looking for immunobiotics through in vitro and in vivo approaches for imminoprophulaxis applications. Microbiologicazl Reasearch, 200,1-13.

Savado, A., Traore, A. (2011). La flore microbienne et les proprietes fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. Internationnal journal of biological and chemical sciences. 5(5) : 2057-2075.

Shahbaz Akram, M., Ashraf, M., Ali, S., Iqra Kazmi, S. (2017). Isolation of gram positive bacteria from different sources and evaluation of their probiotic proprietes. Med Microbiol Infec Dis. 5(1-2), 12-6.

T

Tabak , S., Bensoltane, A. (2012). L'acivité antagoniste des bactéries lactiques (Streptococcus thermophilus, Bifidobactérium bifidum et Lactobacillus bulgaricus) vis-à-vis de la souche helicobacter pylori responsable des maladies garstoduodénales. Nature et technologie. Page 71à 79.

Tang, W., Xing, Z., Li, C., Wang, J., Wang, Y. (2016). Molecular mechanisms and *in vitro* antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. Food Chemistry. 221, 1642-1649.

Tang, W., Dong, M., Wang, W., Han, S., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Zhang, Q., Wu, J., Li, W. (2017). Structural characterization and antioxidant property of released' exopolysacharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp bulgaricus SRFM-1. Carbohydrate polymers. 173, 654-664.

Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemier and type 2 diabétes mellitus. World Journal of Diabetes. 6(3): 456-480.

Trabelsi, I., Ktari, N., Ben Slima, S., Triki, M., Bardaa, S., Mnif, H., Ben Salah, R. (2017). Evaluation of dermal wound healing activity and in vitro antibacterial and antioxidant activités of a new exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp.Ca6. International Journal of Biological Macromolecule. 103, 194-201.

Tulumoglu, S., Yuksekdog, Z., Beyatli, Y., Simsek, O., Cinar, B., Yasar, E, (2013). Probiotic properties of Lactobacilli species isolated from children's faces. Anaerobe 24, 36-42.

Références bibliographiques

Turpin,W.(2011). Vers une évaluation des potentialités probiotique et nutritionnelle des bactéries lactiques constitutives du microbiote d'un aliment fermenté traditionnel à base de mil par une approche moléculaire. Université Montpellier 2 sciences et techniques du Languedoc.

V

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Croniun, M., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease- the international Journal of Biochemistry and Cell Biology. 39, 44-48.

W

Wang, Y., Yu, R., Chou, C. (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiology. 23, 128-135.

Wang, C., Lin, P., Chai Ng, C., Shyu, Y. (2010). Probiotic properties of lactobacillus strains isolated from the faces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. Anaerobe 16- 578-585.

Wang, X., Shao, C., Liu, L., Guo, X., Xu, Y., Lu,X. (2017). Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. International Journal of Biological Macromolecules. 103, 1173-1184.

Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., YU, D., Wang, Y., Li, W.(2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. Nutrients 9(5), 521.

Wei, G., Fan, L., Zhu, W., Fu, Y., Yu, J., Tang, M. (2009). Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWS33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. Journal of Hazardous Materials. 162(1), 50-56.

Willcox, J., Ash, S., Catignani, G. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. Critical Review in Food Science and Nutrition. 44, 275-295.

X

Xu, R., Shang, N., Li, P.(2011). In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH. Anaerobe. 17, 226-231.

Y

Références bibliographiques

Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S, (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB express* 2:48, 1.

Yintit, Hugenholtz, F., Abec, T., and Molenaar, D. (2003). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress- - *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 5739-5745.

Z

Zacharof, M.P ., Lovitt, R.W. (2012). Bacteriocine produced by lactic acid bacteria. *Procedia APCBEE*.

Zergoug, A .(2017). Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires .Universite Abdelhamid Benbadis – Mostaganem.

Zhai, Q., Yin, R., Yu, L., Wang, G., Tian, F., Yu, R., Zhao, J., Liu X., Chen, Y., Zhang, H., Chen w. (2015). Screening of lactic acid bacteria with potential protective effects against cadmium toxicity. *Food controle*.

Zhang, S., Liu, L., Su, Y., Li, H., Sun, Q., Liang, X., Lv, J. (2011). Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. *African journal of microbiology recherche*. 5(29), 5194-5201.

Zhong,L., Zhang,X., Covasa, M. (2014). Emerging roles of Latic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World journal of Gastroenterology*. 20(24) :7878-7886.

Annexes

Annexe 1 : Procédure de préparation du MRS (gélose et bouillon).

Pour 1 litre d'eau distillée, on ajoute 55.3 g de bouillons MRS (Biokar diagnostics) et 17.3 g d'agar (pour la gélose), le tous sur une plaque chauffante avec agitation jusqu'à la dissolution totales des produits. Après l'ajustement du pH (6.4 ± 2) la gélose (ou le bouillon) est répartie dans des flacons de 250 ml et autoclavé pendant 20 mn à 120°C.

MRS préparé à partir des constituants :

Peptone.....	10g
Extrait de levure.....	04g
Extrait de viande.....	8g
Glucose.....	20g
Phosphate dipotassique.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	5g
Sulfate d'ammonium.....	2g
Sulfate de manganèse.....	0.05g
Tween 80.....	1ml
Agar (dans le cas de gélose).....	15g
Cystéine.....	0.1g
Eau distillée.....	1000 ml

$$\text{pH} = 6.2 \pm 0.2$$

Annexe 2 : Procédure de coloration de gram

- ✓ Recouvrir le frottis fixé par une quantité de violet de Gentiane et laisser le en contact pendant 1 mn et rincer par l'eau de robinet.
- ✓ Fixer la coloration avec de lugol par un contact de 30 sec.
- ✓ Décolorer par l'ajout de l'acool sur la lame placée obliquement pendant 10 sec et lavé par l'eau de robinet.
- ✓ Recouvrir la lame avec la solution de fuschine et laisser en contact pendant 30 sec puis rincer et sécher.

Annexes

Annexe 3 : Préparation du PBS

Nous avons préparés 500 ml de PBS par les quantités suivantes :

NaCl.....4 g

KCl.....0.1 g

K₂HPO₄.....0.72 g

KH₂PO₄.....0.12 g

pH : 7.4 ± 2

Annexe 4: Tableau des résultats bruts

Tableau 01 : Résultats de DO obtenus de test DPPH

Souche DO	E3A	E3B	E3C	E3D	E3E	E3F
Cellules intactes	0.1232	0.126	0.1219	0.1032	0.1204	0.1334
	0.1769	0.0568	0.1099	0.1759	0.1681	0.1109
Surnageant	0.1104	0.2364	0.0812	0.0164	0.3100	0.1665
	0.1303	0.1806	0.0510	0.017	0.3105	0.0043
témoin	0.3187	0.3187	0.3187	0.3187	0.3187	0.3187

Tableau 02: Résultat du test de capacité scavanger des radicaux hydroxyles (DO)

	E3A	E3B	E3C	E3D	E3E	E3F
Cellules intactes	0.3215	0.2709	0.2787	0.2997	0.2967	0.3316
	0.3423	0.2947	0.3137	0.3096	0.3218	0.3061
Blanc cellules intactes	0.2380	0.2103	0.2564	0.2397	0.2389	0.2662
Surnageant	0.3174	0.3640	0.4410	0.3383	0.3629	0.3701
	0.3486	0.3549	0.4490	0.3420	0.3755	0.3820
Blanc surnageant	0.2407	0.2626	0.2553	0.2557	0.2705	0.2568
Contrôle	0.4638					

Annexes

Tableau 03: Résultat de test de la chélation des ions de fer (DO)

	E3A	E3B	E3C	E3D	E3E	E3F
Cellules intactes	0.0485 0.0703	0.07 0.0741	0.061 0.0713	0.038 0.0396	0.0259 0.0271	0.045 0.0409
Surnageant	0.0597 0.06	0.0087 0.0081	0 0	0 0	0.119 0.1139	0.098 0.0694
Contrôle	0.1255					

Tableau 04: Résultat de DO du test d'inhibition de l'auto oxydation d'acide ascorbique des cellules intactes.

	E3A	E3B	E3C	E3D	E3E	E3F
Essai 1	0.412	0.55	0.533	0.4966	0.541	0.541
Essai 2	0.437	0.597	0.525	0.534	0.533	0.553
contrôle	0.3803					

Tableau 05: Résultat du test de la résistance au peroxyde d'hydrogène (DO)

	0 m mol H ₂ O ₂			
	T0	T1	T2	T3
E3A	0.034	0.1124	0.1578	0.1717
E3B	0.0103	0.1646	2.0098	0.3616
E3C	0.0038	0.0326	2.0247	1.9513
E3D	0.014	0.1486	1.9549	1.8218
E3E	0.06	0.2053	2.1281	0.3585
E3F	0.06	0.1016	2.1213	2.0376

	0.4 m mol H ₂ O ₂			
	T0	T1	T2	T3
E3A	0.0146	0.029	0.2089	0
E3B	0.0037	0.0039	0.7285	0.1221
E3C	0.0176	0.0256	0.8331	0.1021
E3D	0.0389	0.0645	0.9410	0.114
E3E	0.038	0.0645	0.9918	0.2133
E3F	0.029	0.0584	0.9137	0.1061

Annexes

	0.7 m mol H ₂ O ₂			
	T0	T1	T2	T3
E3A	0.0071	0	0	0
E3B	0.012	0.0126	0.6117	0.3450
E3C	0.0119	0.014	0.3486	0.942
E3D	0.0375	0.0221	0.8724	0.899
E3E	0.0401	0.0425	0.9001	0.943
E3F	0.0262	0.017	0.7923	0.8894

	1 m mol H ₂ O ₂			
	T0	T1	T2	T3
E3A	0.017	0	0	0
E3B	0.0054	0.013	0.3034	0.326
E3C	0.0213	0.0315	0.8515	0.452
E3D	0.0293	0.0558	0.8077	0.4737
E3E	0.0506	0.0683	0.8918	0.472
E3F	0.0281	0.0353	0.7849	0.4396

Tableau 06 : Nombre des cellules comptés par cellules de thomas dans le test de résistance au pH

	pH = 6.4				pH = 2			
	E3B	E3C	E3D	E3F	E3B	E3C	E3D	E3F
T0	7.2x10 ⁵	7.6x10 ⁵	7.8x10 ⁵	10x10 ⁵	6.8x10 ⁵	5.6x10 ⁵	5.4x10 ⁵	9.8x10 ⁵
T1	28x10 ⁵	23x10 ⁵	25x10 ⁵	35x10 ⁵	3.6x10 ⁵	4.4x10 ⁵	5.8x10 ⁵	8.6x10 ⁵
T2	30x10 ⁵	25x10 ⁵	27x10 ⁵	37x10 ⁵	3x10 ⁵	3.5x10 ⁵	4.5x10 ⁵	7.8x10 ⁵

Tableau 07: Résultat du test de la résistance aux sels biliaires (DO)

	Souches			
	E3B	E3C	E3D	E3F
	0% sels biliaires			
T0	0.0441	0.0348	0.0304	0.0479
T1	0.0273	0.0648	0.0554	0.0483
T2	0.1029	0.1948	0.1176	0.1487
	0.1% sels biliaires			
T0	0.1438	0.1108	0.1270	0.1610
T1	0.1706	0.1370	0.1719	0.1219
T2	0.1835	0.1768	0.2170	0.1044
	0.3% sels biliaires			
T0	0.1000	0.1260	0.1220	0.1011
T1	0.1080	0.1258	0.1210	0.0760
T2	0.1062	0.1232	0.093	0.0542

Présidente : Dr/ AKROUM S.
Encadreur : Pr/ SIFOUR M.
Examinatrice : Dr/ LAGGOUNE S.

Présenté par :
BOUHANNA Aldjia
BOUHANNA Bouchra

Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des bactéries lactiques des nourrissons

Résumé

Notre étude tente d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne des bactéries lactiques isolées à partir des selles des nourrissons nourris au lait maternel. Six souches affiliées au genre *Lactobacillus* sp. ont été utilisées dans ce travail. Toutes les souches testées présentaient une activité antagoniste contre *S. aureus* ATCC29522, *Pseudomonas* sp. et *Staphylococcus* sp., cependant, seulement les souches E3D, E3E et E3F ont cette activité contre *E. coli* ATCC20404 et *Listeria monocytogenes*. L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par plusieurs méthodes, le test DPPH a permis de sélectionner la souche E3D qui présente un effet scavenger de 94,59% pour le surnageant et la souche E3B avec un pourcentage de 71,31% pour les cellules intactes. La capacité de piégeage du radical hydroxyle par les souches E3A, E3B, E3D, E3E et E3F est similaire. Toutes les cellules intactes ont des activités de chélation du fer relativement importantes, notamment la souche E3E avec un pourcentage de 78,88%, et une capacité de 93,3% pour le surnageant. La souche E3B a la capacité la plus élevés pour inhiber l'oxydation de l'acide ascorbique à 50,01%. Toutes les souches utilisées sont résistantes aux différentes concentrations de H₂O₂ jusqu'à plus de 48h d'incubation sauf la souche E3A. L'évaluation des propriétés probiotiques a été effectuée, les BL testées présentent une forte résistance au pH 2.0 dont les pourcentages de survie sont 93,82 % (E3B), 96,51% (E3C), 98,6% (E3D), et 98.33% (E3D) après 4h d'incubation. La résistance à la bile montre que la souche E3B résiste mieux avec un pourcentage de 107,1%.

Mots clés : Bactéries lactiques, Probiotiques, activité antioxydante, Activité antibactérienne.

Abstract

Our study attempts to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of isolated lactic acid bacteria from the stool of breastfeeding milk infant. Six strains belonging to the genus *Lactobacillus* sp. were used in this work. All strains have an antagonistic activity against *S. aureus* 29522, *Pseudomonas* sp. and *Staphylococcus* sp., whereas, only the strains E3D, E3E and E3F have this activity against *E.coli* 20404 and *Listeria monocytogenes*. The evaluation of the antioxidant activity was carried out by several methods, the DPPH test allow as to select the strain E3D which has the scavenger effect of 94.59% for the supernatant and the strain E3B with a percentage of 71, 31% for the intact cells. The ability of trapping hydroxyl radical by strains E3A, E3B, E3D, E3E and E3F are similar. All intact cells have a relatively important activity of iron chelating, especially the strain E3E with a percentage of 78.88%, and a capacity of 93.3% for the supernatant. The E3B strain has the highest ability to inhibit ascorbic acid oxidation by 50.01%. All used strains are resistant to different concentrations of H₂O₂ up to more than 48h of incubation, except the strain E3A. The evaluation of the probiotic properties was carried out, the tested LAB present a strong resistance to pH 2.0 with a survival percentage of 93.82 % (E3B), 96,51% (E3C), 98,6% (E3D) and 98.33% (E3D) after 4h of incubation. The bile resistance test shows that the E3B strain is more resistant with a percentage of 107,1%.

Key words: Lactic acid bacteria, Probiotics, Antioxidant activity, Antibacterien activity.

المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة و المضاد للميكروبات لبكتيريا حمض اللبن المعزولة من براز الرضع ذوي الرضاعة الطبيعية. خلال هذه الدراسة عزلت ست سلالات تنتمي إلى الجنس *Lactobacillus* sp. جميع السلالات أظهرت نشاطا مضادا ل *S. aureus* 29522, *Pseudomonas* sp, *Staphylococcus* sp لكن السلالات E3D, E3E, E3F فقط كان لديها نشاطا مضادا ضد *E.coli* 20404 و *Listeria monocytogenes*. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بعدة اختبارات، اختبار DPPH سمح بانتقاء السلالة E3D بنشاط 94.59% بالنسبة للرائق و السلالة E3B بنشاط قدره 71,31% بالنسبة للخلايا الكاملة. كانت القدرة على اصطياد الجذور الهيدروجينية متشابهة عند السلالات E3A, E3B, E3D, E3E, E3F، في حين جميع الخلايا الكاملة تمتلك القدرة على جذب ايونات الحديد خاصة السلالة E3E بنسبة 78.88% بالنسبة للخلايا الكاملة و 93.3% بالنسبة للرائق. السلالة E3B لها القدرة الأكبر على تثبيط أكسدة حمض الاسكوربيك بنسبة 50.01%. جميع السلالات قاومت مختلف تراكيز مختلفة من H₂O₂ ما عدى السلالة E3A. تم تقييم الخصائص البروبيوتكية خاصة مقاومة الحموضة والأملاح الصفراوية فتبين أن السلالات المستعملة تقاوم الحموضة عند الرقم الهيدروجيني 2 بالقيم التالية (E3D) 98.33%, (E3D) 96,51%, (E3B) 93.82% وكانت السلالة E3B أكثر مقاومة للأملاح الصفراوية بنسبة 107.1% الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللبن، بروبيوتيك، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للبكتيريا.

