

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل

Université Mohamed Seddik Benyahia - Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie Appliquée et

des Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية وعلوم التغذية

Mémoire de fin de cycle

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

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Evaluation du pouvoir antioxydant des exopolysaccharides
de quelques bactéries lactiques de la microflore intestinale
des nourrissons

Membres de Jury :

Présidente : D^r. AIT MEDDOUR Amel

Examineur : M^r. KHENNOUF Tarek

Encadreur : P^r. SIFOUR Mohamed

Présenté par :

M^{elle} SLIMOUNE Romaisa

M^{elle} KINIOUAR Sabrina

Année Universitaire 2017 – 2018

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abreviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii
Introduction	1
Partie I. Synthèse bibliographique	
I- Les bactéries lactiques.....	3
I.1. Introduction	4
I.2. Classification des bactéries lactiques.....	4
I. 3. Propriétés et activités des bactéries lactiques	5
I.3.1. Propriétés probiotiques	5
I.3.2. Propriétés technologiques	6
II. Stress oxydatif et les systèmes antioxydants	7
II.1. Définition du stress oxydatif	7
II.2. Principales espèces réactives.....	7
II.2.1. Espèces réactives de l'oxygène ERO	8
II.2.2.Espèces réactives de l'azote ERN.....	9
II. 3. Dommages des espèces réactives	10
II.4. Systèmes antioxydants.....	11
II.4.1. Les antioxydants	11
III. EPS des bactéries lactiques et l'activité antioxydante	13
III.1. Aactivité antioxydante des bactéries lactiques	13
III.2. Exopolysaccharides des bactéries lactiques.....	14
III.2.1.Généralités.....	14
III.2.2. Fonctions et intérêt des EPS	14
III.2.3. Pouvoir antioxydant des EPS des bactéries lactiques	15
Partie II. Matériel et méthodes	
II.1. Isolement et purification des souches bactériennes.....	18
II.2. Identification	18
II.2.1. Examen macroscopique.....	18
II.2.2. Examen microscopique	18
II.2.3. Tests physiologiques et biochimiques.....	18
II.2.3.1. Recherche de la catalase	18
II.2.3.2. Croissance à différentes températures	19
II.2.3.3. Croissance à différentes concentrations de NaCl	19
II.2.3.5. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH).....	19
II.3. Criblage des souches productrices d'EPS.....	19

II.4. Production d'EPS	20
II.5. Extraction d'EPS	20
II.6. Quantification d'EPS	20
II.7. Evaluation de l'activité antioxydante	20
II.7.1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH	21
II.7.2. Capacité de piégeage des radicaux hydroxyles	21
II.7.3. Activité de chélation des ions de fer	21
II.8. Etude de quelques propriétés probiotiques	22
II.8.1. La tolérance à l'acidité	22
II.8.2. La tolérance à la bile	22
Partie III. Résultats et discussion	
III.1. Isolement, purification et identification préliminaire	24
III.1.1. Aspect macroscopique	24
III.1.2. Aspect microscopique	25
III.2. Tests physiologiques et biochimiques	25
III.2.1. Test de la catalase	25
III.2.2. Croissance à différentes températures	25
III.2.3. Croissance à différentes concentrations de NaCl	25
III.2.4. Type fermentaire.....	26
III.2.5. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH).....	26
III. 3. Criblage des souches productrices d'EPS	26
III.4. Quantification d'EPS.....	28
III.5. Evaluation de l'activité antioxydante	29
III.5.1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH	29
III.5.2. Capacité de piégeage des radicaux hydroxyles	30
III.5.3. Activité de chélation des ions de fer	32
III.6. Etude de quelques propriétés probiotiques (La tolérance à l'acidité et aux sels biliaires)....	33
Conclusion	36
References.....	38
Annexe	

Remerciements

On remercie Allah le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

*Au terme de ce travail, il est agréable de présenter nos remerciements les plus sincères à notre encadreur **P^r. SIFOUR Mohamed** pour nous avoir proposé ce sujet si intéressant et avoir accepté de nous encadrer et orienter tout au long de notre travail.*

Nos vifs remerciements à tous les membres de jury pour avoir accepté de juger ce travail :

*Nous remercions **D^r. AIT MEDDOUR Amel** qui a accepté de présider ce jury.*

*Nos sincères remerciements vont à **M^r KHENNOUF Tarek** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

On souhaite également remercier l'ensemble du personnel travaillant au laboratoire de Microbiologie appliquée ainsi que le personnel du département de Microbiologie Appliquée et Sciences Alimentaires qui ont contribué pour mener à bien ce travail.

Nos remerciements vont également à nos enseignants qui nous ont accompagnés pendant notre cursus universitaire.

Enfin, on adresse nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail

À ma chère mère, je ne te remercierai jamais assez pour tout l'amour sans égal que tu m'apportes. Tu as été toujours présente à mes côtés, tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie.

*À la mémoire de **mon cher père** qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études, La personne que j'aurai voulu la plus voir présente en ce jour. Tu as été toujours dans mon esprit et dans mon cœur et tu aurais été extrêmement fière de moi. Que Dieu le miséricordieux vous accueille dans son éternel paradis.*

À mes chères sœurs, mon cher frère, et mon adorable petite nièce, pour leur présence constante dans ma vie, pour leur affection et les moments agréables que je passe en leur compagnie. Je vous souhaite tout le bonheur du monde.

*À toutes mes amies, je cite en particulier ma copine et mon binôme **Romaissa**, qui a partagé avec moi tous les moments de ce travail.*

KINIOUAR Sabrina

Je dédie ce modeste travail

À mon très cher père, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi... Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

À ma chère mère, Affable, honorable, aimable : Tu représentes le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et prier pour moi ; ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

À mes chers frères et ma chère sœur, pour leur compréhension, affection et patience, pour tous les bons moments que nous avons partagés.

*À mes collègues de la promotion et toutes mes amies, je cite à part mon binôme **Sabrina** pour son soutien et ce lien tout particulier qui s'est créé entre nous.*

SLIMOUNE Romaiassa

<u>Abréviations</u>	<u>Expansion</u>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGI	Acide gras insaturé
C	Cytosine
CAT	Catalase
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EPS	Exopolysaccharide
ERN	Espèce réactive d'azote
ERO	Espèce réactive d'oxygène
FAO	Food and agriculture organization
G	Guanosine
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Le glutathion oxydé
MDA	Malondialdéhyde
MRS	Man-Rogosa Sharp
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBS	Phosphate Buffer saline
rpm	rotations par minute
SOD	Superoxyde dismutase
TCA	Trichloroacetic acid solution

N°	Le titre	La page
Figure 1:	Schéma de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants	7
Figure 2 :	les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives d'azote (ERN)	8
Figure 3 :	les dommages causés par le stress oxydatif	11
Figure 4 :	les principales activités des EPS des bactéries lactiques sur la muqueuse intestinale	15
Figure 5 :	colonies de bactéries lactiques sur la gélose MRS	24
Figure 6 :	Observation microscopique des bactéries lactiques après coloration de Gram (G : 10×100)	25
Figure 7 :	Exopolysaccharides produits par des souches de bactéries lactiques sur la gélose hypersaccharosée	27
Figure 8 :	Teneur totale en sucre des échantillons d'EPS des souches testées	29
Figure 9 :	Capacité de piégeage des radicaux libres DPPH par les souches de bactéries lactiques	30
Figure 10 :	Capacité de piégeage des radicaux hydroxyles par les souches de bactéries lactiques	31
Figure 11 :	Capacité de chélation des ions de fer par les EPS et surnageant des souches de Lactobacilles	32
Figure 12 :	Taux de survie (%) de la souche Ro dans le milieu acide à pH après 2h et 4h d'incubation	34
Figure 13 :	Taux de croissance (min^{-1}) de la souche Ro dans du bouillon MRS sans bile, avec 0.1% et 0.3% de sels biliaries après 2h et 4h d'incubation	34

N°	Le titre	La page
	Tableau 1 : Les principales caractéristiques des bactéries lactiques	5
	Tableau 2 : Les types d'antioxydants (enzymatiques et non enzymatiques)	11
	Tableau 3 : Exemples de bactéries lactiques productrices d'EPS à potentiel antioxydant	16
	Tableau 4 : Code des souches de bactéries lactiques sélectionnées des échantillons E1, E2 et E3	24
	Tableau 5 : Profil physiologique et biochimique des souches isolées	26
	Tableau 6 : Les résultats de la capacité de production d'EPS par les bactéries lactiques	28

Introduction

Une découverte a montré que des radicaux libres se produisent dans notre organisme ce qui a donné naissance à des recherches sur leur source de production (**Droge, 2002; Defraigne et Pincemail, 2008**). De plus, une rupture de l'équilibre entre la formation des espèces réactives connues sous le nom de pro oxydants qui sont associés à la vie aérobie normale et la consommation des antioxydants a un effet néfaste sur les molécules biologiques de l'organisme, ce déséquilibre est qualifié de stress oxydant (**Sies, 1991; Powers et al., 2011; Al Dalaen et Al-Qtaitat, 2014**). La majorité des espèces réactives sont d'origine endogène y compris les sous-produits des processus métaboliques normaux bien que des sources exogènes comme la prise anarchique des médicaments, l'exposition aux polluants de l'environnement, les radiations, les solvants les produits chimiques et d'autres facteurs aboutissant à la perturbation de l'homéostasie cellulaire normale qui contribuent à des graves dommages et pathologies dans l'organisme vivant (**Valko et al., 2006 ; Kullisaar et al., 2012 ; Bhattacharyya et al., 2014**).

Il a été rapporté que l'exposition d'organismes vivants à des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est associée à de nombreux avantages. Plusieurs chercheurs ont maintenant documenté leurs effets utiles dans des niveaux faibles à modérés avec une importance physiologique dans la fonction des systèmes de réponses cellulaires, l'expression des gènes et aussi pour la production de l'énergie nécessaire à tout processus biologique (**Sies, 1991; Valko et al., 2006; Powers et al., 2011 ; Rao et al., 2011**). En revanche, les effets délétères d'espèces réactives de l'oxygène ont été démontrés dont la production accrue de ces dernières conduisant au stress oxydatif cellulaire est liée à de nombreuses pathologies (**Powers et al., 2011; Choudhari et al., 2014**).

Les organismes vivants disposent de plusieurs mécanismes pour entraver le stress oxydatif comprenant des systèmes antioxydants très complexes dont le rôle est de réduire l'excès des radicaux libres en réduisant ainsi les dommages causés par ces oxydants et de prévenir la progression des maladies (**Kim et al., 2006 ; Rao et al., 2011**). Bien que ces antioxydants dites "endogènes" semblent efficaces, ils peuvent être dans certains cas insuffisants pour protéger le corps contre les effets toxiques de ces molécules. Une supplémentation en antioxydants exogènes ainsi que la prise des aliments contenant des antioxydants est souhaitée afin d'assurer une protection maximale des sites biologiques (**Defraigne et Pincemail, 2008; Pan et Mei, 2010 ; Rao et al., 2011 ; Choudhari et al., 2014**). L'utilisation d'antioxydants naturels en tant qu'alternative aux antioxydants synthétiques peut être souhaitable. Des antioxydants tels que l'hydroxytoluène butylé (BHT) présente des risques potentiels et peut avoir des effets toxiques (**Abubakr et al., 2012 ; Shori, 2013 ; Li et al., 2014**).

Il est connu que les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans plusieurs fermentations alimentaires d'où leur utilisation pour la conservation des aliments et sont considérées comme des microorganismes bénéfiques pour la santé de l'hôte (**Coşkun et al., 2010; Xiao et al., 2014; Pieniz et al., 2015 ; Su et al., 2015**), ainsi que lorsqu'elles sont sélectionnées principalement de la microflore humaine avec des preuves d'innocuité et d'efficacité pour la santé de l'hôte sont considérées comme des probiotiques potentiels (**Kim et al., 2006 ; Kullisaar et al., 2012 ; Silva et al., 2017 ; Gheziel et al., 2018**).

Les microorganismes possèdent des systèmes antioxydants qui ne sont pas toxiques pour les cellules. Les propriétés antioxydantes des bactéries lactiques *in vivo* et *in vitro* sont largement étudiées pour leur rôle dans la réduction des niveaux des radicaux libres par sécrétion d'enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD) favorisant ainsi la production d'antioxydants non enzymatiques (**Afify et al., 2012 ; Shori, 2013**). Plusieurs bactéries lactiques sont connues pour la synthèse des exopolysaccharides (EPS) qui ont montrés un grand intérêt probiotique et technologique d'où leur utilisation dans de nombreuses applications industrielles en raison de leur propriétés épaississantes, stabilisantes et émulsifiantes notamment dans l'industrie alimentaire (**Pan et Mei, 2010**). De plus, plusieurs études ont été intéressées par l'utilisation des bactéries lactiques productrices d'EPS pour leurs activités biologiques telles que l'activité antioxydante par piégeage des espèces radicalaires (**Xu et al., 2011; Polak et al., 2013; Li et al., 2014**).

Les objectifs fixés dans ce travail sont de sélectionner des souches de bactéries lactiques de la microflore intestinale des nourrissons sur la base d'une production d'EPS. Après extraction et quantification des EPS, ils vont être évalués et comparés pour leur activité antioxydante en se basant sur différentes méthodes antioxydantes, ainsi qu'une évaluation de certaines propriétés probiotiques de l'un des isolats sélectionné.

Partie I

Synthèse

bibliographique

I- Bactéries lactiques

I.1. Introduction

Les bactéries lactiques autrement dit les bactéries de l'acide lactique sont des cellules vivantes procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles forment un groupe très hétérogène sur les plans physiologiques et morphologiques. Ce groupe comprend des bactéries en forme de coque ou de bacille dont la principale caractéristique est la production de l'acide lactique (**Badis et al., 2005 ; Yang et al., 2015; Ismaili et al., 2016**).

Ces bactéries du fait de leur souplesse d'adaptation physiologique peuvent coloniser différents milieux et occupent différents habitats. Elles font partie de la flore intestinale et vaginale humaine et animale, elles sont aussi associées aux plantes, aux ensilages et aussi aux produits laitiers (**Tserovska et al., 2002 ; Badis et al., 2005 ; Abdul-Abbas, 2016**).

Ces bactéries présentent des caractéristiques communes qui indiquent leur regroupement. Ce sont des Gram positifs dont la teneur en G+C est inférieure à 50%. Elles sont généralement immobiles, non sporulées, acido-tolérantes et capables de croître à des températures entre 10° et 45°C. Elles sont dépourvues de la nitrate réductase, du cytochrome oxydase et sont catalase négative à l'exception de certaines souches qui ont une pseudo catalase (**Atlan, 1996 ; Drouault et Corthier, 2001 ; Khalid, 2011 ; Yang et al., 2015**).

Les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire anaérobie facultatif et ont la capacité de fermenter les glucides soit par voie homolactique (production seulement de l'acide lactique) ou par voie hétérolactique (production de l'acide lactique, éthanol, acide acétique, CO₂,...) (**Drouault et Corthier, 2001 ; Abdul-Abbas, 2016**). Le tableau 1 résume les principales caractéristiques des bactéries lactiques.

I.2. Classification des bactéries lactiques

La classification des bactéries lactiques est largement basée sur des caractéristiques phénotypiques et biochimiques. Ce groupe renferme treize genres dont les plus étudiés sont : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*. Les lactobacilles désignent le genre principal de la famille des *Lactobacilaceae* (**Salminen et Von Wright, 2004 ; Dortu, 2009 ; Guetouache et Guessas, 2015**).

Tableau 1. les principaux caractères des bactéries lactiques (Badis *et al.*, 2007 ; Abdul-Abbas, 2016)

Les principaux caractères des bactéries lactiques:	
Forme	Bacille et coque
Gram	Gram positif
Type de respiration	Anaérobie facultatif ou aérotolérante
Type de fermentation	Homo ou hétérolactique
Spore	Non sporulées
Mobilité	Immobilés à l'exception de quelques espèces du genre <i>Vagococcus</i> , <i>Oneococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Enterococcus</i> ...
Enzymes	Catalase-, Oxydase-, Nitrate réductase-.
Exigences nutritionnelles	Sucres fermentescibles, acides gras, acides aminés, peptides, vitamines et sels minéraux.

I. 3. Propriétés et activités des bactéries lactiques

Le champ d'application des bactéries lactiques est très large et elles sont connues depuis longtemps comme étant des microbes très utiles et bénéfiques pour l'homme ainsi que pour l'animal en raison de leurs propriétés probiotiques, fonctionnelles et technologiques (Zhao *et al.*, 2016).

I.3.1. Propriétés probiotiques

Les bactéries lactiques sont majoritairement considérées comme des bactéries probiotiques dont elles sont non pathogènes, adaptées aux processus industriels d'un point de vue technologique, résistantes à l'acide et la bile et produisent des substances antimicrobiennes (Heyman *et al.*, 2002 ; Shehata *et al.*, 2016).

Le terme probiotiques est défini comme "microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère". (FAO/ OMS, 2002). Afin de satisfaire à cette définition, ces bactéries doivent répondre à plusieurs critères, elles doivent être viables, sécuritaires pour la santé humaine, aptes à survivre dans les conditions drastiques rencontrées dans le tractus gastro-intestinal, de pouvoir adhérer aux cellules épithéliales intestinales et être évaluées et documentées pour conférer l'avantage et l'usage prévu pour la santé de l'hôte (Boukefoussa, 2012; Kullisaar *et al.*, 2012).

Au cours des dernières décennies l'effet bénéfique des bactéries probiotiques pour la santé a considérablement dévoilé. Elles constituent une barrière sûre et naturelle contre les infections microbiennes, leur adhésion aux épithéliales intestinales inhibent l'attachement des pathogènes par exclusion compétitive et/ou par effet antagoniste, permettent une amélioration de la digestion des nutriments toute en rétablissant l'équilibre du microbiote intestinal lorsqu'il est perturbé (le cas d'une antibiothérapie), contribuent à l'amélioration de l'utilisation du lactose ; leur utilisation dans le traitement des diarrhées aiguës infantiles et les diarrhées associées aux antibiotiques est révélée bénéfique ; ainsi pour la résistance contre les infections bactériennes (infections par *Helicobacter pylori*), les maladies inflammatoires et irritables des intestins et la régulation de toute anomalie en stimulant le système immunitaire (**Dupont, 1998 ; Heyman et al., 2002 ; Shehata et al., 2016 ; Xiao et al., 2014 ; Kerry, 2018**).

Le rôle positif de ce groupe de bactéries dans la santé humaine réside dans le fait qu'il possède de telles activités, à savoir l'activité antimicrobienne. Ces bactéries sont capables de produire des substances telles que les acides organiques (acide lactique, acétique, propionique, acide succinique etc.), acidifiant le milieu et empêchant ainsi la croissance des microorganismes acido-sensibles. D'autres composés actifs doués d'activité antagoniste à un large spectre de microorganismes pouvant inhiber la croissance de la flore pathogène y compris le peroxyde d'hydrogène, les bactériocines ainsi que d'autres substances inhibitrices produites en quantités plus faibles comme le diacétyl, l'acétaldéhyde les acides gras, l'éthanol, l'ammoniac etc. (**De Vuyst et al., 1994 ; Chakoosari et al., 2014 ; Zidani, 2015 ; Prabhurajeshwar et al., 2017**).

I.3.2. Propriétés technologiques

Actuellement, les bactéries lactiques sont au centre d'intérêt des nouvelles recherches en raison de leurs propriétés fonctionnelles et technologiques intéressantes (**Othman et al., 2017**). Ces propriétés sont essentielles pour avoir une bioconversion optimale et une texture caractéristique des produits fermentés et transformés tels que les produits laitiers en premier lieu ainsi que les produits carnés, alcoolisés, les dérivés des matières premières agricoles, ... (**Labioui et al., 2005 ; Dortu, 2009**).

Celles-ci recouvrent l'activité acidifiante et aromatisante, l'activité protéolytique et lipolytique ainsi que le rôle hygiénique qu'elles jouent par leur pouvoir de production de composés inhibiteurs tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines qui empêchent le développement des microorganismes indésirables (**Denev, 2006 ; Dortu, 2009 ; Zidani, 2015**).

II. Stress oxydant et systèmes antioxydants

II.1. Définition du stress oxydatif

L'oxygène moléculaire est nécessaire pour la vie des êtres vivants qui s'adaptent à sa présence par le développement d'un système qui le métabolise. Un dysfonctionnement de ce métabolisme entraîne ce qu'on appelle un stress oxydatif (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Haleng *et al.*, 2007 ; Ali *et al.*, 2012). Le stress oxydatif est défini comme étant le résultat d'un déséquilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant (**figure 1**) ; cela veut dire entre les tissus qui génèrent les radicaux libres et les systèmes de défense de l'organisme qui interviennent pour rétablir l'équilibre. La perturbation de cette balance est la conséquence d'un déficit en antioxydants ou d'une surproduction de ces radicaux (Favier, 2003 ; Kullisaar *et al.*, 2012 ; Ali *et al.*, 2012 ; Mouassi, 2017).

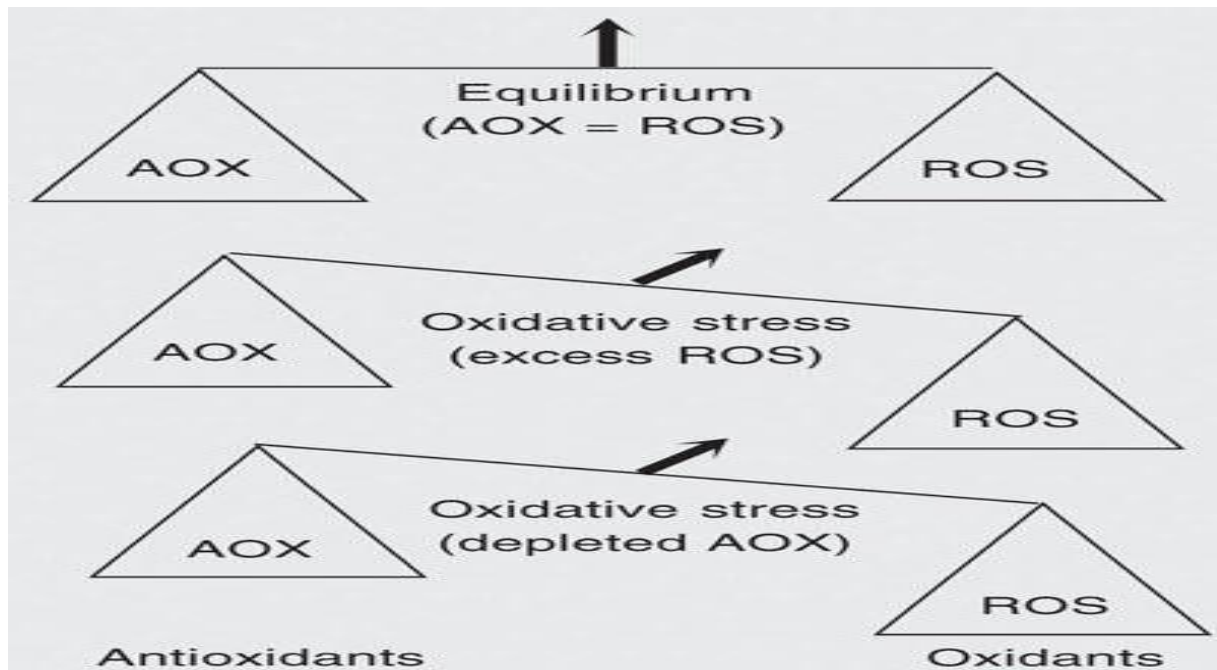


Figure 1 : Schéma de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants (Kunwar et Priyadarsini, 2011).

II.2. Principales espèces réactives

Un radical libre est toute molécule ou atome ayant un ou plusieurs électrons libres et non appariés sur sa couche externe ce qui leur rend très actif et instable. Les radicaux libres et leurs précurseurs sont appelés espèce réactive (Favier, 2003 ; Kouassi, 2017). Il existe différents types d'espèces radicalaires dont les principales sont les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives d'azote (ERN) et elles sont présentées dans la **figure 2** (Phaniendra *et al.*, 2015).

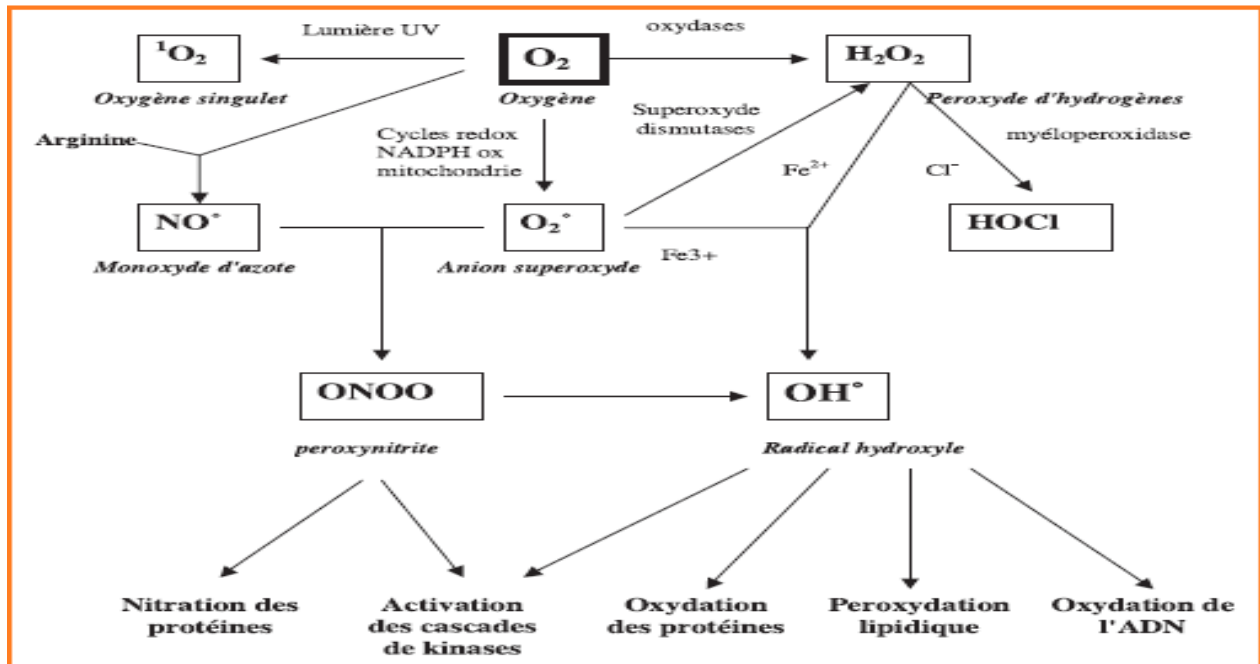


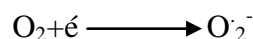
Figure 2 : Les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives d'azote (ERN) (Favier, 2003).

II.2.1. Espèces réactives de l'oxygène ERO

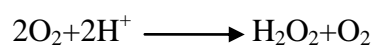
L'oxygène moléculaire, par sa configuration électronique, est considéré comme étant un radical libre. Les espèces réactives de l'oxygène sont les métabolites réduits de ce dernier et qui sont : l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle,... (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

II.2.1.1. L'anion superoxyde de l'oxygène

L'anion superoxyde est l'un des formes réduites de l'oxygène moléculaire qui est formé par la réception d'un électron par le cytochrome oxydase selon l'équation suivante (Koechlin-Ramonatxo, 2006):



Ce radical peut résulter également par l'auto-oxydation des neuromédiateurs, des thiols, des coenzymes, mais aussi de la détoxification des xénobiotiques par le système cytochrome et il peut être aussi l'origine des autres ERO (Droge, 2002 ; Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Sisein, 2014).

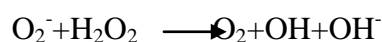


II.2.1.2. Le radical hydroxyle OH[•]

Le radical OH est la forme neutre de l'ion hydroxyde et il est très réactif. Il peut être généré par la réduction de H₂O₂ en présence des ions métalliques (Fe²⁺, Cu²⁺) selon la réaction de Fenton (**Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Sisein, 2014**).



Mais il peut être aussi formé par la réaction de H₂O₂ avec O₂⁻ selon l'équation de Haber-Weiss (**Phaniendra *et al.*, 2015**).



II.2.1.3. Les radicaux pyroxyles et alkyles

Ces radicaux sont formés à la suite d'une réaction d'oxydation des acides gras insaturés (AGI) par d'autres ERO selon l'équation suivantes (**Rees *et al.*, 2014**).



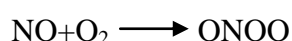
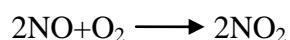
II.2.1.3. L'oxygène singulet

L'oxygène singulet est une autre espèce oxygénée très réactive et qui peut réagir avec les AGI. Il peut être produit par la photo-oxydation de l'oxygène ou par certaines réactions enzymatiques telles que les lipoxygénases (**Rees *et al.*, 2004 ; Phaniendra *et al.*, 2015**).

II.2.2. Espèces réactives de l'azote ERN

II.2.2.1. Le monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote est synthétisé par voie enzymatique à partir de l'azote de l'acide aminé arginine et l'oxygène par l'oxyde nitrique synthase. Les réactions de NO avec l'oxygène forment le dioxyde d'azote (NO₂) et l'anion peroxydinitrite (ONOO⁻) selon les équations suivantes (**Droge, 2002 ; Powers et Jackson, 2008 ; Sisein, 2014**):



II.2.2.2. Le peroxy-nitrite (ONOO-)

Le peroxy-nitrite est une espèce réactive d'azote mais aussi d'oxygène, son apparition est rapide et il se forme à partir de deux espèces réactives (NO) et (O₂). Il cause beaucoup de dommages aux composants cellulaires (Sisein, 2014 ; Phaniendra *et al.*, 2015).

II. 3. Dommages des espèces réactives

Les radicaux libres sont des molécules instables qui interagissent avec des biomolécules du corps (protéines, ADN, lipides) ce qui induit la mort cellulaire (**Figure 3**) (Kim *et al.*, 2006 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006). Les ERO sont à l'origine de nombreuses pathologies. L'athérosclérose, le diabète sucré, le cancer, les maladies neurodégénératives (Alzheimer), le parkinson ainsi que d'autres pathologies sont engendrées par le stress oxydant (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Valko, 2006).

✓ L'une des cibles majeure des ERO est l'endommagement de l'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial impliquant la modification et la dégradation des bases azotées, modification du sucre, des cassures ou des lésions de l'ADN simple ou double brin, des mutations, délétions ou translocations ainsi que des liaisons possibles ADN- protéines (Koechlin-Ramonatxo, 2006 ; Al-Dalaen *et al.*, 2014). La formation de 8-oxoguanine (8-OH-G) est la lésion de l'ADN la plus connue qui induit la modification des facteurs de transcription et ainsi modifie l'expression des gènes (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Birben *et al.*, 2012).

✓ Les ERO sont capables de réagir avec les acides aminés constitutifs des protéines et peuvent causer une fragmentation de la chaîne peptidique, une altération de la charge électrique des protéines, l'oxydation des acides aminés et l'agrégation des protéines ce qui mènent à leur dégradation par protéolyse (Koechlin-Ramonatxo, 2006 ; Birben *et al.*, 2012; Al-Dalaen *et al.*, 2014). L'interaction radical-protéine peut altérer les fonctions de certaines protéines telles que les enzymes de réparation de l'ADN entraînant une augmentation de la fréquence des mutations. Par ailleurs, l'oxydation de certains acides aminés est susceptible de modifier la conformation ainsi que la fonction de la protéine (Koechlin-Ramonatxo, 2006 ; Choudhari *et al.*, 2014).

✓ En présence d'oxygène, les radicaux libres peuvent réagir avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines induisant ainsi une peroxydation lipidique qui provoque une désintégration de la membrane lipidique, une perte de sa fluidité et de ses fonctions d'échange ainsi que l'inactivation des récepteurs et des enzymes liés à la membrane augmentant sa perméabilité (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006 ; Al-Dalaen *et al.*, 2014). Les

produits qui résultent de cette dégradation sont des aldéhydes dont le malondialdéhyde (MDA), des hydroperoxydes lipidiques, ils peuvent se lier à l'ADN et révéler mutagènes (Choudhari *et al.*, 2014).

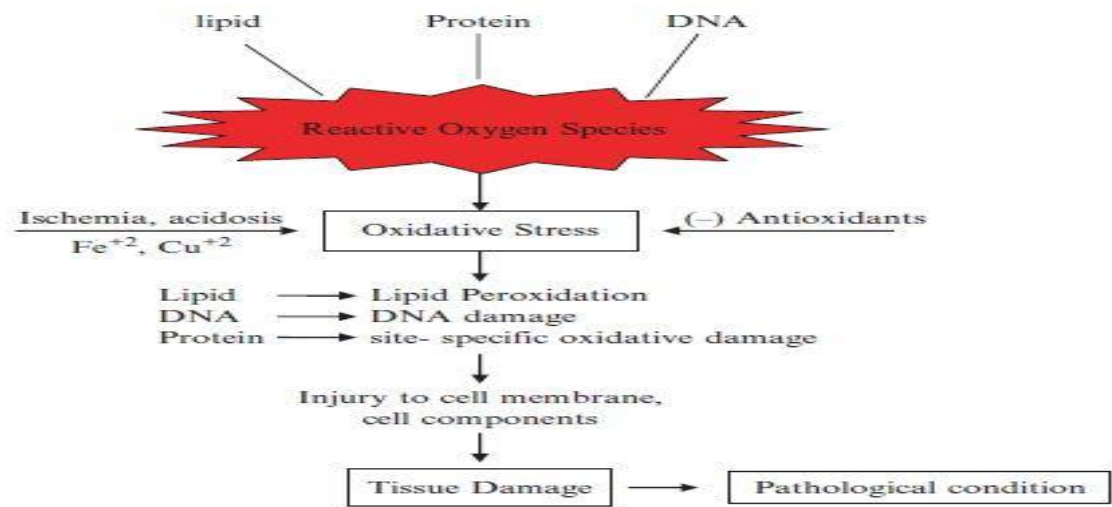


Figure 3 : Les dommages causés par le stress oxydatif (Rao *et al.*, 2011).

II.4. Systèmes antioxydants

II.4.1. Les antioxydants

Pour se protéger des effets délétères des radicaux libres, l'organisme est équipé d'un ensemble complexe de défense antioxydant. Donc un antioxydant est toute molécule capable de réduire les dommages causés par ces radicaux en inhibant leur production, limitant leur propagation ou retardant l'oxydation des biomolécules par ceci (Favier, 2003 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006 ; Berger, 2006 ; Birben *et al.*, 2012). On peut distinguer deux groupes d'antioxydants, les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques qui sont regroupés dans le tableau 2.

Tableau 2. les types d'antioxydants (enzymatiques et non enzymatiques) (Berger, 2006 ; Birben *et al.*, 2012).

Les antioxydants enzymatiques	Les antioxydants non enzymatiques
Superoxyde dismutase (SOD)	La vitamine (A, C, E)
Glutathion peroxydase	Les caroténoïdes et l'acide urique
Glutathion réductase	Le glutathion (GSH)
Catalase	

II.4.1.1. Antioxydants enzymatiques

a. La superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase est une métalloprotéine douée d'une activité enzymatique antioxydante. Elle catalyse la dismutation de l'anion peroxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène selon l'équation suivante (Rees *et al.*, 2004 ; Haleng *et al.*, 2007 ; Sisein, 2014):



b. la catalase

La catalase (CAT) est une enzyme antioxydante puissante qui a comme cofacteur le fer et elle catabolise le peroxyde d'hydrogène en formant de l'eau et de l'oxygène selon la réaction (Rees *et al.*, 2004 ; Powers et Jackson, 2008) :



c. La glutathion peroxydase

La GPx est une enzyme importante dans le système de défense antioxydant, elle ne détruit pas uniquement le H_2O_2 mais également elle réduit les peroxydes organiques. Pour catalyser la réduction de H_2O_2 , cette enzyme utilise le glutathion réduit (GSH) comme donneur d' e^- en formant de l'eau et le glutathion oxydé (GSSG) selon la réaction ci-dessous (Favier, 2003 ; Powers et Jackson, 2008 ; Birben *et al.*, 2012) :



II.4.1.2. Antioxydants non enzymatiques

a. La vitamine E

La vitamine E autrement dit tocophérol est un antioxydant liposoluble important. Elle neutralise, *in vitro* qu'*in vivo*, les radicaux libres ; elle capte les radicaux peroxydes lipidiques mais aussi le H_2O_2 . En assurant sa fonction, la vitamine E devient un radical mais non toxique dont sa réduction est assurée par la vitamine C (Koechlin-Ramonatxo, 2006 ; Haleng *et al.*, 2007 ; Hidalgo-Cantabrano *et al.*, 2014).

b. La vitamine C

La vitamine C ou l'acide ascorbique est un antioxydant hydrosoluble. Elle provient de l'alimentation car l'organisme ne peut pas la synthétiser. Elle capte les anions superoxydes, hydroxyles et l'oxygène singulet et participe également à la régénération de la vitamine E à partir de sa forme radicalaire (Gaedès-Albert *et al.*, 2003 ; Haleng *et al.*, 2007).

c. Les caroténoïdes

Comme la vitamine E, les caroténoïdes sont des antioxydants liposolubles qui sont généralement représentés par le carotène qui est également nommé la provitamine A. Il est doué de la capacité de capter les radicaux hydroxyles et peroxydes ainsi, il empêche l'oxydation de plusieurs substrats (**Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Haleng *et al.*, 2007 ; Powers et Jackson, 2008**).

d. Le glutathion

C'est un tripeptide dont la fonction thiol lui confère son potentiel antioxydant. Son activité est de capter le peroxyde d'hydrogène ainsi que les radicaux hydroxyles. Il joue le rôle d'un cofacteur pour d'autres enzymes, un capteur de radicaux et il participe à la régénération de la vitamine E et C de leurs formes radicalaires (**Sisein, 2014**).

III. EPS des bactéries lactiques et l'activité antioxydante

III.1. Activité antioxydante des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques possèdent des propriétés antioxydantes puissantes qui peuvent maintenir un équilibre normalement dans le corps, ils protègent également le corps humain du vieillissement, de l'inflammation et même du cancer, réduisent le cholestérol sérique et plusieurs d'autres troubles de la santé (**Kim *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Ding *et al.*, 2017**).

Les systèmes antioxydants des probiotiques sont diversifiés comprenant la production et la sécrétion d'enzymes comme la SOD, la CAT, glutathion peroxydase (GSHPx), en favorisant également la production d'antioxydants non enzymatiques comme le glutathion (GSH) qui a un rôle principal dans la régulation du redox, tocophérol (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) ainsi que certaines biomolécules connues pour leur effets antioxydants telle que les EPS (**Coşkun *et al.*, 2010; Afify *et al.*, 2012**). Il existe différents mécanismes de réactions des antioxydants des bactéries lactiques, y compris la prévention de la formation des radicaux libres, piégeage des radicaux libres (radical scavenging activity), capacité réductrice, activité de chélation des ions métalliques (**Abubakr *et al.*, 2012 ; Ding *et al.*, 2017**).

Plusieurs études ont été menées pour étudier les propriétés antioxydantes des bactéries lactiques *in vivo* et *in vitro*. Des études ont montré que les maladies inflammatoires de l'intestin causent une diminution de GSH dont une supplémentation a donné des effets bénéfiques (**Coşkun *et al.*, 2010 ; Kullisaar *et al.*, 2012**). *Lactobacillus spp* est parmi les espèces les plus importantes du microbiote humain dont certains lactobacilles possèdent une activité antioxydante pouvant atténuer le risque d'accumulation

des ERO comme le peroxyde d'hydrogène, le radical superoxyde et les radicaux hydroxyles qui réduit le risque de mutations et de carcinomes (**Kullisaar et al., 2002**).

III.2. Exopolysaccharides des bactéries lactiques

III.2.1. Généralités

La surface des bactéries lactiques est recouverte par plusieurs molécules dont les polysaccharides font partie. Ils peuvent être associés avec certaines molécules de surface sous forme d'une capsule enrobant la cellule ou totalement dissociés de la paroi et sécrétés dans le milieu environnant donc on parle des exopolysaccharides (**Sutherlans, 1990 ; Mozzi et al., 2001 ; Fanning et al., 2012 ; Hidalgo-Cantabrana et al., 2014**).

Les exopolysaccharides ou les polysaccharides extracellulaires sont des biopolymères composés de plusieurs unités mono-saccharidiques reliées entre elles par des liaisons glycosidiques. Ils peuvent être linéaires ou dans certains cas cycliques ou ramifiés (**Zidani, 2015**). Selon la composition chimique des EPS, on distingue chez les bactéries lactiques les homopolysaccharides qui sont composés d'un seul type de monosaccharide et les hétéropolysaccharides qui se composent de plusieurs types de monomères (**Sutherland, 1990 ; Zidani, 2015 ; Tahoun et al., 2017**). Leurs propriétés biologiques reposent sur la taille des macromolécules, sur leur composition en oses et sur la nature des liaisons osidiques présentes (β/α , 1-2, 1-3,...) (**Benhadria et al., 2017**).

III.2.2. Fonctions et intérêt des EPS

Les EPS des bactéries lactiques présentent des critères intéressants qui leurs donnent un grand intérêt pour leur application dans divers secteurs tels que l'agro-alimentaire, la cosmétique, la biotechnologie ainsi que la médecine (**Hidalgo-Cantabrana et al., 2014 ; Kouassi, 2017**). En industrie agro-alimentaire, les EPS sont utilisés en raison de leurs aspects épaississants ou gélifiants, ils agissent aussi comme des stabilisants biologiques, émulsifiants et comme agent de viscosité (**Ruas-Madiedo, 2010 ; Lopez et al., 2012 ; Benhadria, 2017**).

En dehors de leurs aspects biotechnologiques, de nombreux EPS des bactéries lactiques présentent des activités biologiques importantes. Ils exercent une activité anti-inflammatoire, anti-tumorale, antibactérienne, antimutagènes et immunostimulante et ils peuvent contribuer également à la protection contre les facteurs du stress environnemental. Ces EPS peuvent moduler la microflore intestinale en agissant comme des substrats fermentescibles (**Ruas-Madiedo, 2010 ; Osinska-Jaroszuk, 2015 ; Kouassi, 2017 ; Benhadria, 2017 ; Duan et al., 2018**). La figure 4 représente les

principales activités des EPS des bactéries lactiques sur la muqueuse intestinale (**Hidalgo-Cantabrana et al., 2014**)

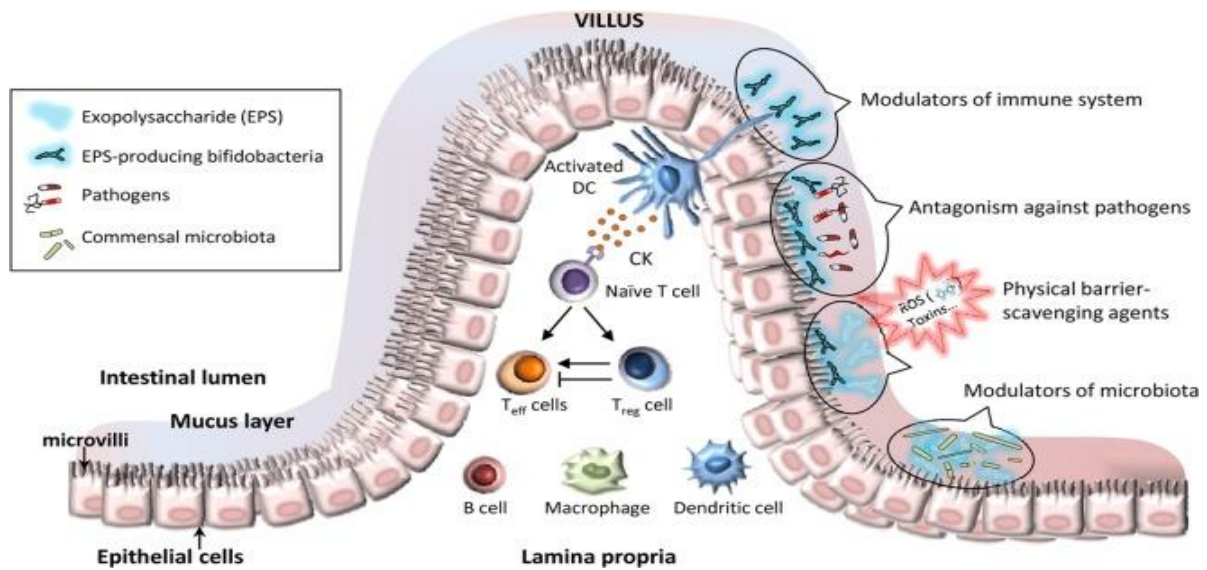


Figure 4 : Les principales activités des EPS des bactéries lactiques sur la muqueuse intestinale (**Hidalgo-Cantabrana et al., 2014**).

III.2.3. Le pouvoir antioxydant des EPS des bactéries lactiques

La production des EPS par les bactéries lactiques est suggérée comme étant l'un des mécanismes par lesquels ces bactéries exercent leurs activités bénéfiques y compris l'activité antioxydante (**Lopez et al., 2012 ; Hidalgo-Cantabrana et al., 2014 ; Tahoun et al., 2017**). Ces EPS jouent un rôle important contre le stress oxydatif en raison de leur capacité à éliminer les espèces réactives formées dans l'intestin en impliquant divers mécanismes. L'un de ces mécanismes est le piégeage des radicaux libres (**Kodali et Sen, 2008 ; Li et al., 2014**).

En tant qu'oxydant nocifs, les radicaux hydroxyles et peroxydes, peuvent induire des dommages oxydatifs aux biomolécules dont ils sont la cause de nombreuses maladies humaines. L'effet antioxydant des EPS peut être dû à sa capacité de piéger ces radicaux soit par la libération de l'hydrogène actif de la fonction hydroxyle de l'EPS ou par leur combinaison avec ce dernier ce qui donnera donc une forme stable (**Pan et al., 2010 ; Li et al., 2014**).

L'activité de chélation des métaux est ainsi envisagé comme propriété antioxydante par laquelle les EPS peuvent exercer leur pouvoir antioxydant (**Li et al., 2014 ; Trabelsi et al., 2017**). Le Fer (Fe^{+2}) et le Cuivre (Cu^{+2}) sont parmi les espèces métalliques les plus puissantes, connues comme pro-oxydants qui jouent un rôle important dans la réaction d'oxydation catalytique (**Wang et al., 2017**). Des travaux

ont démontré la capacité des EPS de quelques bactéries lactiques à piéger ces ions notamment les ions de Fer pour former un complexe (EPS/Fe⁺²) qui permet de réduire le potentiel redox, avec une stabilité de la forme oxydé de l'ion ferreux (Li *et al.*, 2014 ; Trabelsi *et al.*, 2017). De plus, les EPS peuvent empêcher la génération du radical hydroxyle qui est un oxydant très puissant catalysé par le Fer par réduction de la concentration des ions ferreux dans la réaction



Cependant, malgré toutes ces études qui ont montré le potentiel antioxydant des EPS microbiens, un nombre limité d'informations est disponible sur leurs mécanismes antioxydants au niveau moléculaire (Seo *et al.*, 2015).

Tableau 3. Exemples de bactéries lactiques productrices d'EPS à potentiel antioxydant.

Souches	Références
<i>Enterococcus faecium</i> BDU7	Abdhul <i>et al.</i>, 2014.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> E/N	Polak-Berecka <i>et al.</i>, 2013.
<i>Lactobacillus helveticus</i> SMN2-1	Bai <i>et al.</i>, 2016.
<i>Lactobacillus helveticus</i> MB2-1	Li <i>et al.</i>, 2014 ; Baruah <i>et al.</i>, 2016.
<i>Lactobacillus lactis</i> <i>supsb. lactis</i> 12	Pan <i>et al.</i>, 2010.
<i>Lactobacillus plantarum</i> RJF4	Baruah <i>et al.</i>, 2016.
<i>Lactobacillus plantarum</i> C88	Zhang <i>et al.</i>, 2013 ; Baruah <i>et al.</i>, 2016.
<i>Lactobacillus plantarum</i> YW32	Baruah <i>et al.</i>, 2016.
<i>Bifidobacterium animalis</i> RH	Xu <i>et al.</i>, 2011.

Partie II

Matériel et méthodes

II.1. Isolement et purification des souches bactériennes

Les souches utilisées dans ce travail sont isolées à partir de selles de nourrissons. Les échantillons fécaux sont prélevés chez trois nourrissons **E1**, **E2** et **E3** nourris uniquement au lait maternel, âgés d'au moins d'un an respectivement de 3 mois, 5 mois et 4 mois.

Brièvement, 1g de chaque échantillon est mis en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile et bien homogénéisé (solution mère); suivis d'une série de dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-6}). À partir des deux dilutions 10^{-3} et 10^{-4} , des aliquotes sont étalées sur des boîtes de Petri contenant de la gélose MRS (Annexe 1) puis incubées en aérobiose dans l'étuve et en anaérobiose dans une jarre à 37 °C pendant 48h. Des colonies bien distinctes sont choisies individuellement, repiquées par la méthode des stries sur de la gélose MRS et incubées à 37 °C pendant 48h. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention de colonies pures, homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme) (**Wang et al., 2010 ; Lai et al., 2014 ; Abdhul et al., 2014 ; Baia et al., 2016**).

II.2. Identification

Après purification, les isolats sont pré-identifiés en se basant sur différents caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques (**Mostefaoui et al., 2014; Badis et al., 2015; Zidani, 2015; Bai et al., 2016; Sandes et al., 2017**).

II.2.1. Examen macroscopique

Ce test est basé sur l'observation visuelle des colonies cultivées sur boîtes de Petri afin de déterminer leur taille, leur forme et leur couleur (aspect macroscopique).

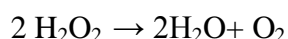
II.2.2. Examen microscopique

L'aspect microscopique est révélé par l'intermédiaire de la coloration de Gram (Annexe 3), elle permet de différencier les bactéries à Gram + de celles à Gram -, les bâtonnets des coques ainsi que la détermination du mode de regroupement.

II.2.3. Tests physiologiques et biochimiques

II.2.3.1. Recherche de la catalase

L'activité catalytique est mise en évidence en émulsionnant sur une lame la culture bactérienne à tester dans une solution d'eau oxygénée. La présence d'une catalase se manifeste par l'apparition de bulles abondantes d'oxygène.



Les bactéries à Gram + et à catalase négatif ont été considérées comme des bactéries lactiques présomptives (**Silva et al., 2017**).

II.2.3.2. Croissance à différentes températures

Ce test a pour but de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Il est réalisé en incubant les isolats à tester dans des tubes contenant du bouillon MRS à **15 °C, 25 °C, 30 °C et 44 °C** pendant 24h. La croissance est appréciée par un trouble du milieu après incubation.

II.2.3.3. Croissance à différentes concentrations de NaCl

Ensemencement des cultures bactériennes à tester dans des tubes contenant le bouillon MRS additionné de NaCl à **4%** et à **6,5%** puis incubés à 37 °C pendant 24h. La croissance bactérienne se manifeste par un trouble du milieu.

II.2.3.4. Type fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires en mettant en évidence la production de gaz CO₂. Des cultures jeunes de 18h préalablement préparées sont inoculées dans des tubes contenant le bouillon MRS avec une cloche de Durham. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24h à 48h.

II.2.3.5. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

C'est une enzyme intéressante qui caractérise les bactéries lactiques, son rôle est de libérer l'ammoniac à partir de l'arginine. Ce test est mis en évidence en ensemençant des tubes contenant le milieu Moeller à arginine par les souches à tester puis incubés à 37 °C pendant 24h.

S'il y a eu acidification, le milieu vire vers le jaune et l'arginine n'a pas été donc dégradé. Par ailleurs, une acidification du milieu puis une réalcalinisation indique la dégradation de l'arginine avec l'apparition d'une couleur violette.

II.3. Criblage des souches productrices d'EPS

La production d'EPS est étudiée sur milieu un hypersaccharosé préparé préalablement au laboratoire (Peptone (2.5g/l) , Extrait de levure (03g/l) , Extrait de viande (10g/l), Saccharose (150g/l) , Phosphate dipotassique (02g/l), Sulfate de magnésium (0.2g/l), Na Cl (01g/l), Agar (15g/l)), pH (6.8)). Les cultures bactériennes de 18h sontensemencées à la surface des boites par des stries et incubées à 37 °C pendant 48h. Les souches désignées productrices d'EPS présentent un aspect visqueux avec des colonies larges et gluantes testées par le toucher avec anse de platine stérile (**Mostefaoui *et al.*, 2014**).

II.4. Production d'EPS

Le screening primaire est poursuivi par la production sur milieu liquide. Pour cela, des erlenmeyers de 200 ml contenant 20 ml du bouillon MRS modifié (20g/L de glucose est remplacé par le lactose) estensemencés par 1% des cultures bactériennes jeunes qui sont par la suite incubés dans un incubateur à agitation à 37 °C pendant 24h (**Savado** *et al.*, 2004 ; **Li et al.**, 2014). La teneur totale en EPS est déterminée par la méthode au phénol-acide sulfurique en utilisant le glucose comme standard pour le traçage de la courbe d'étalonnage (Annexe 4) (**Mozzi et al.**, 2000).

II.5. Extraction d'EPS

L'extraction des EPS est faite par la méthode décrite par **Li et al.**, (2014). Après la récupération des cultures de l'incubateur, la suspension est centrifugée à 12000 g pendant 15 minutes afin de récupérer le surnageant qui est additionné du TCA pour donner une concentration finale de 4% (w/v). Une autre centrifugation de 12000 g pendant 30 minutes est faite pour précipiter et éliminer les protéines. Cette fois ci, on ajoute 2 volumes de l'éthanol au surnageant récupéré et laissé précipiter à 4 °C pendant une nuit. On est recueilli par une centrifugation de 15000 g pendant 12 minutes à 4 °C. Puis, le culot a été suspendu dans de l'eau distillée.

II.6. Quantification d'EPS

L'EPS est quantifié selon la méthode au phénol-acide sulfurique de **Dubois et al.**, (1956), qui repose sur le traçage d'une courbe standard par la préparation de différentes dilutions d'une solution de glucose 1mg/ml en suivant la même procédure que celle pour l'EPS. Dans des tubes contenant 800µl de l'échantillon (la solution d'EPS) on ajoute 40 µl du phénol (80%) suivi de 2 ml de l'acide sulfurique avec une agitation immédiate avec le vortex. Après leur incubation à l'obscurité pendant 30 minutes, l'absorbance est mesurée à 490 nm contre un blanc qui contient de l'eau distillée au lieu de l'échantillon. La teneur en EPS a été calculée en utilisant la courbe étalon du glucose (**Mozzi et al.**, 2000).

II.7. Evaluation de l'activité antioxydante

Les souches pures préalablement conservées sont retenues pour la suite de l'étude. Du bouillon MRS stérile est inoculé avec les neuf souches et incubé à 37 °C pendant 18h. Le surnageant de chaque souche bactérienne est obtenu par centrifugation de la culture à 6000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant ainsi que les EPS déjà extraits sont soumis à tous dosages ultérieurs y compris les dosages antioxydants. Dans ce travail, l'activité antioxydante est mesurée par dosage des radicaux libres DPPH, dosages des radicaux hydroxyles et aussi par chélation des ions ferreux (**Afify et al.**, 2012).

II.7.1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH

L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH est mesurée en utilisant la méthode décrite par **Qiao et al., (2009)**. Brièvement, on met 0.2 ml d'une solution de DPPH fraîchement préparée (0.2 mM) dans l'éthanol avec 0.8 ml de la solution d'échantillon (surnageant ou EPS). Le mélange réactionnel est bien agité et incubé par la suite à une température ambiante dans l'obscurité durant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc contenant de l'éthanol, tandis que la solution du DPPH dans l'éthanol exempt de l'échantillon est utilisée comme témoin positif. Plus l'absorbance du mélange réactionnel est plus faible plus l'activité de piégeage des radicaux libres est plus élevée (**Li et al., 2014**)

La capacité de piégeage est calculée comme suit :

Effet scavenger (%) = $[(A_{\text{Témoin}} - A_{\text{Echantillon}}) / A_{\text{Témoin}}]$ (**Marinova et Batchvarov, 2011**).

II.7.2. Capacité de piégeage des radicaux hydroxyles

L'effet piègeur des radicaux hydroxyles est mesuré par la méthode décrite par **Li et al., (2014)**. La génération du radical hydroxyle est réalisée dans une solution contenant 0.5 ml de phenanthroline (0.75 mM), 0.5 ml de FeSO₄ (0.75 mM), 0.5 ml de H₂O₂ (0.01%, v/v) et 0.75 ml de PBS (pH 7.4). Après on rajoute 0.5 ml d'échantillon, et on incube le tout à 37 °C pendant 30 minutes. L'absorbance du mélange a est mesuré à 536 nm contre un blanc contenant de l'eau distillée au lieu de H₂O₂.

L'activité de piégeage des radicaux hydroxyles est exprimé par :

Activité scavenger (%) = $(A_{\text{Echantillon}} - A_{\text{Blanc}}) / (A_0 - A_{\text{Blanc}}) \times 100$

Où A₀ était l'absorbance du témoin positif en absence de l'échantillon.

II.7.3. Activité de chélation des ions de fer

La capacité de chélation de l'ion ferrique est mesurée selon la méthode de **Zhang et al., (2002)**. Brièvement, un mélange réactionnel contenant 0.5 ml d'échantillon, 0.1 ml d'acide ascorbique (1%, p/v), 0.1 ml de FeSO₄ (0.4g/l) et 1 ml de NaOH (0.2M) est incubé à 37 °C pendant 20 minutes dans un bain marie. Après la période d'incubation, on ajoute 0.2 ml d'acide trichloracétique (TCA à 10%) au mélange. Le surnageant des cultures bactériennes est obtenu par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 minutes, par la suite, on rajoute 0.5 ml de la phenanthroline (1g/l) au mélange. Après 10 minutes de

minutes, par la suite, on rajoute 0.5 ml de la phenanthroline (1g/l) au mélange. Après 10 minutes de réaction à température ambiante, on mesure l'absorbance à 562 nm. La capacité de chélation des ions métalliques a été déterminée comme suit :

Capacité de chélation (%) = $[1 - (A_{\text{Echantillon}} / A_{\text{contrôle}})] \times 100$. Le contrôle contient le milieu réactionnel dont l'échantillon est remplacé par l'eau distillée.

II.8. Etude de quelques propriétés probiotiques

II.8.1. La tolérance à l'acidité

La capacité de résister à l'acidité est déterminée selon la méthode décrite par **Hydrominus et al., (2000)**. Les cultures de 18h sont centrifugées à 5000rpm pendant 10 minutes afin de récupérer le culot qui est par la suite lavé par le PBS. Après le lavage, les cellules sont suspendues dans 1 ml du tampon phosphate. 200 µl de la suspension bactérienne sont inoculé dans 5 ml du bouillon MRS ajusté à pH 2.0 et le MRS à pH 6.4 est utilisé comme témoin et par la suite, on incube à 37 °C. La résistance des souches a été estimée par dénombrement des cellules sous microscope optique à l'aide de la cellule de Malassez après 0, 2 et 4h d'incubation.

Le taux de survie est calculé comme suit (**N'tcha et al., 2016**) :

Le taux de survie% = $(\log \text{UFC } T_{nh} / \log \text{UFC } T_{0h}) \times 100$

T_{0h} : le temps initial (0h).

T_{nh} : le temps après 2h, 4h.

II.8.2. La tolérance à la bile

Pour la détermination de la tolérance des bactéries aux sels biliaires, on suit la méthode décrite par **Hydrominus et al., (2000)**. Les cellules bactériennes obtenues après centrifugation sont suspendues dans 1 ml du tampon phosphate (PBS). A partir de la suspension bactérienne, 0.5% sont inoculés dans le bouillon MRS à 0.1% et à 0.3% de sels biliaires. Le témoin pour cet essai est le bouillon MRS sans bile, on incube le tout à 37 °C et l'absorbance est mesurée à 620 nm chaque 2 heures (0h, 2h et 4h).

Le taux de croissance est obtenu selon l'équation suivante (**Wei et al., 2009**):

$$\mu = \frac{1}{DO_0} \times \frac{DO_t - DO_0}{T_t - T_0}$$

μ : le taux de croissance (min⁻¹).

DO₀ : la densité optique à un temps 0

DO_t : la densité optique à un temps t

T_t : temps après incubation

T₀ : temps initial

Partie III

Résultats et discussion

III.1. Isolement, purification et identification préliminaire

Neuf isolats ont été isolés à partir des trois échantillons de selles, purifiées et identifiées par les tests préliminaires.

Tableau 4. Code des souches de bactéries lactiques sélectionnées des trois échantillons E1, E2 et E3.

Les échantillons	Le code des souches
E1	Ro
E2	K
	K1
	S
	Sa
	R
E3	G
	G1
	H

E1 : Enfant 1

E2 : Enfant 2

E3 : Enfant 3

III.1.1. Aspect macroscopique

La caractérisation macroscopique des colonies obtenues a permis de décrire leur aspect qui est apparu typique et homogène. Les colonies sont apparues lisses, légèrement bombées de forme circulaire à pourtour régulier, de taille plus ou moins importante avec une couleur blanchâtre ou laiteuse (**figure 5**).

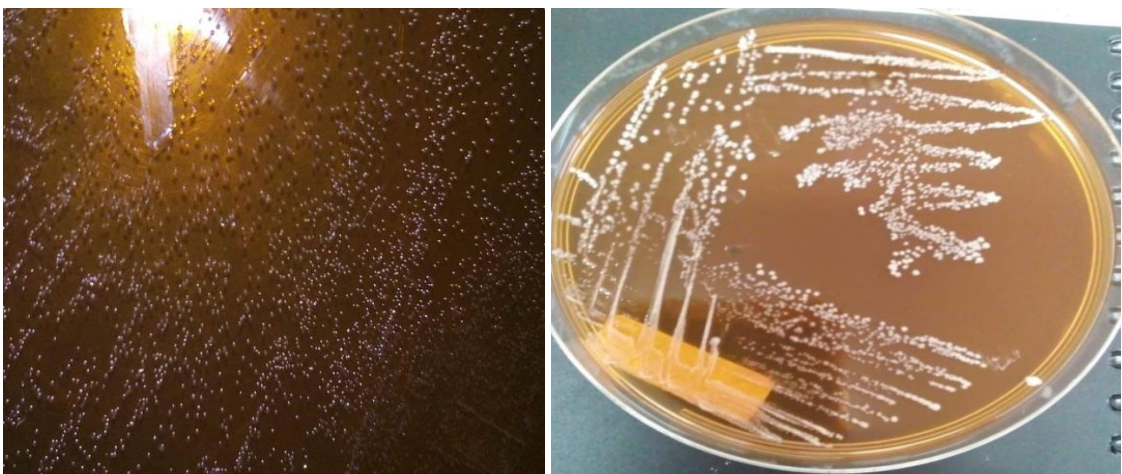


Figure 5. Colonies de bactéries lactiques sur milieu MRS

III.1.2. Aspect microscopique

Sous microscope optique et après la coloration de Gram, les cellules bactériennes sont apparues sous forme de bacilles ou de coccobacilles à Gram positif, isolées ou disposées en paires ou en petites chaînettes (**figure 6**).

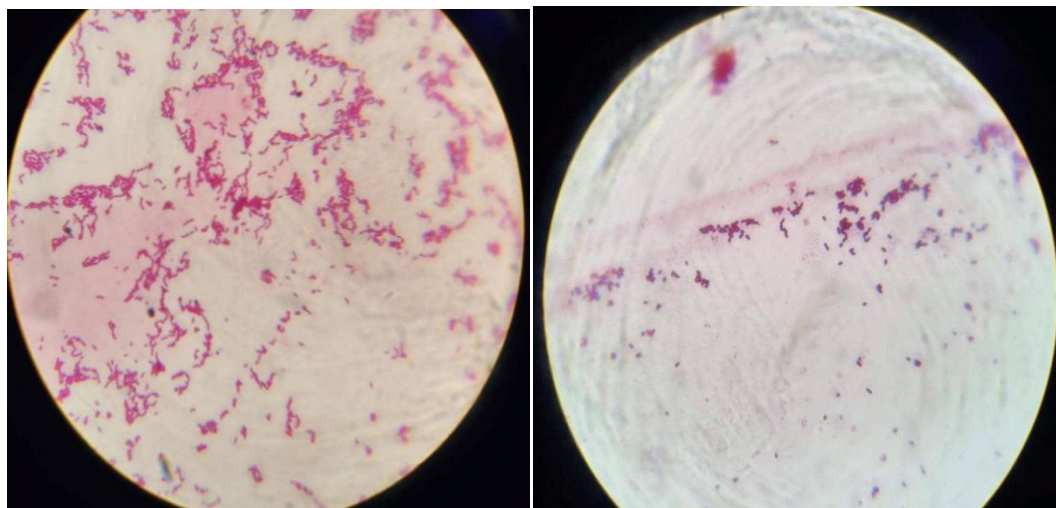


Figure 6. Observation microscopique des bactéries lactiques après coloration de Gram (G : 10x100).

III.2. Tests physiologiques et biochimiques

Après la mise en évidence des tests préliminaires, la recherche de la catalase et la coloration de Gram, les souches Gram positif et catalase négative ont été présumés comme des bactéries lactiques.

III.2.1. Test de la catalase

Toutes les souches lactiques isolées ont été incapables de décomposer l' H_2O_2 . Absence de dégagement gazeux (O_2). Donc elles ont été catalase négative (tableau 5).

III.2.2. Croissance à différentes températures

Les neuf souches ont eu la capacité de croître à température de 25 °C et 30 °C, et aussi à température de 15 °C à l'exception de la souche S (tableau 5). Cependant la plupart des souches ont été incapables de croître à une température de 44 °C. Cela veut dire que la plupart de ces souches ont été mésophiles.

III.2.3. Croissance à différentes concentrations de NaCl

Pour des concentrations différentes de NaCl (tableau 5), la pluparts des souches ont poussées à 4% à l'exception de la souche K, et la moitié ont été incapable de se multiplier à une concentration de 6%. La souche K1, G, Ro et H ont eu la capacité de pousser à 6% de NaCl.

III.2.4. type fermentaire

Parmi les neuf souches qui ont été testées, quatre souches ont été homofermentaires en ayant fermenté le sucre en lactate sans produire de gaz et les cinq autres souches ont été hétérofermentaires où il y a un eu dégagement de gaz qui a été observé dans la cloche de Durham.

III.2.5. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

Sur milieu Moeller à arginine, on a observé que quatre souches sont incapables d'hydrolyser l'arginine, donc ne possédant peut être pas l'ADH (arginine dihydrolase), ceci signifie que ces bactéries ont utilisé le glucose en acidifiant le milieu, les colonies donnant ainsi une coloration jaune. Tandis que les cinq autres souches ont été capables d'utiliser l'arginine et réalcaliniser le milieu. La couleur de l'indicateur de pH est demeurée inchangée (violette).

Les résultats concernant les tests d'identification des souches bactériennes testées ont été résumés dans **le tableau 5.**

Tableau 5. Profil physiologique et biochimique des souches isolées.

Souches	Caractères physiologiques et biochimiques										
	Gram	Forme	CAT	Type fermentaire	ADH	NaCl		Température			
						4%	6.5%	15°C	25°C	30°C	44°C
K	+	Bacilles : Isolés- chainettes	-	Hétéro	-	-	-	+	+	+	-
K1	+	Cocco : Isolés	-	Hétéro	+	+	+	+	+	+	+
G	+	Bacilles : Isolés	-	Homo	-	+	+	+	+	+	-
G1	+	Cocco : Isolés	-	Hétéro	-	+	-	+	+	+	+
R	+	Cocco : En paires	-	Homo	-	+	-	+	+	+	-
Ro	+	Cocco : En paires	-	Homo	+	+	+	+	+	+	-
S	+	Cocco : Isolés	-	Homo	-	+	-	+	+	+	-
Sa	+	Bacilles : Isolés	-	Homo	+	+	-	+	+	+	-
H	+	Bacilles : Chainettes	-	Hétéro	+	+	+	+	+	+	+

D'après les résultats de l'identification des bactéries par les techniques basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, les souches retenues ont appartenu au genre *Lactobacillus* (Savado *et al.*, 2004 ; Badis *et al.*, 2005 ; Guetouache et Guessas, 2015 ; Zidani, 2015 ; Ismaili *et al.*, 2016).

III.3. Criblage des souches productrices d'EPS

Le screening primaire a été réalisé sur la gélose hyper saccharosée. Toutes les souches testées ont montré une capacité à croître sur ce milieu avec un aspect visqueux. Parmi les neuf souches testées, cinq souches ont montré une bonne formation de colonies larges et visqueuses (**Figure 7**). Les résultats obtenus après la période d'incubation sont présentés dans le **tableau 6**.

N'tcha *et al.*, (2016) trouvent cinq souches de bactéries lactiques qui ont formées des colonies larges et visqueuses indiquant la production d'EPS. La production d'EPS par les bactéries lactiques isolées de fèces humaines a fait l'objet d'une attention croissante du fait de leurs effets bénéfiques notamment sur la santé de l'homme (Savado *et al.*, 2004 ; Mostefaoui *et al.*, 2014).



Figure 7. Exopolysaccharides produits par des souches de bactéries lactiques sur la gélose hyper saccharosée.

Tableau 6. Les résultats de la capacité de production d'EPS par les bactéries lactiques

Les souches	Les résultats du test
K	+
G	++
K1	++
G1	++
R	++
Ro	++
S	+
Sa	++
H	+

++ : Forte production

+ : Faible production

III.4. La quantification d'EPS

Le taux d'exopolysaccharides a été estimé en procédant la méthode au phénol-acide sulfurique par l'utilisation du glucose comme standard (Annexe 4). C'est une méthode colorimétrique simple et utile visant à détecter toutes les classes des glucides. Elle consiste à la mesure de l'absorbance de la couleur développée lors de la réaction du furfural résultant de la déshydratation des glucides et le phénol (Nielsen, 2010).

Dans notre étude, la quantité d'EPS produit a varié légèrement d'une souche à l'autre. Les différences de production d'EPS par les neuf souches n'ont pas été assez importantes (entre 19.5 et 23mg/l) (Figure 8). La souche R a été la meilleure souche productrice d'EPS avec une production maximale de (23mg/l), la souche K a été aussi parmi les meilleures avec (22mg/l) d'EPS produits. Les souches (G, H) et (G1, Sa) a situé juste après avec une production de (21.5 et 21 mg/l), respectivement. La production chez les deux souches K1 et S a été de (20mg/l) et celle de la souche Ro a été d'environ (19.5mg/l).

Mostefaoui *et al.*, (2014) ont obtenu un taux de production d'EPS par *Lactobacillus* de 160mg/l. Laws et Marshall, (2001) ont trouvé un taux de 175 mg/l produit par *Lb. delbrueckii* LY03 et un taux inférieur à 5mg/l chez *Lb. delbrueckii* LY58. N'tcha *et al.*, (2016) ont trouvé une forte production chez *Lb. casei* avec un taux de 1130 mg/l.

La quantité d'EPS produite par les neuf souches a été presque semblable malgré une différence qui a été négligeable. Les souches montrant une forte production sur milieu solide n'ont pas été celles ayant un taux important sur milieu liquide. La différence a été peut être due aux conditions de culture comme la température, le pH ou la composition du milieu ou au comportement des souches sur ces milieux (Seesuriyachan *et al.*, 2014). Les faibles taux d'EPS produit ont été peut être liés aux conditions de culture, d'extraction ou encore de la quantification qui n'a pas été assez idéales, mais cela a été peut être aussi dû aux souches qui ne sont pas hyper productrices (Mostefaoui *et al.*, 2014).

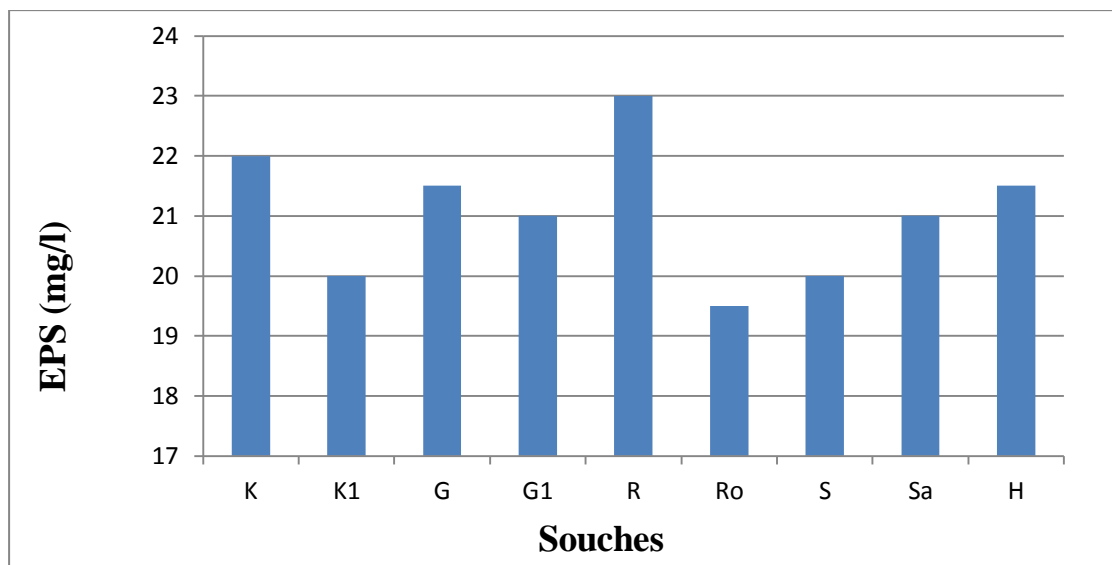


Figure 8. Quantité d'EPS produite par les neuf souches bactériennes testées.

III.5. Evaluation de l'activité antioxydante

III.5.1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH

Le radical libre DPPH est un radical stable avec un électron de valence non apparié à un atome de pont d'azote. Son caractère radicalaire est neutralisé par une molécule scavenger soit par leur acquisition d'électron ou d'atome d'hydrogène. Cette méthode a été largement utilisée du fait de sa rapidité et sa reproductibilité en comparaison avec d'autres méthodes (Zhang *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2014).

Les résultats du piégeage du radical DPPH pour l'EPS et le surnageant ont été résumés dans **la figure 9**. Le surnageant comme l'EPS a montré une activité de piégeage de ce radical dans une gamme de 12% à 96%. Pour certaines souches (K, K1, Ro, Sa et H), la capacité de piégeage trouvée dans les échantillons du surnageant bactérien a été était plus forte que celle pour l'EPS alors que d'autres (G, G1, R et S) a été le contraire. Pour le surnageant, la souche Ro a montré une forte capacité de piégeage

de ce radical avec 96% alors que la souche R a été la plus faible avec 12%. Cependant l'EPS a montré une importante capacité de piégeage avec 95% et 86% par les souches G1 et Ro respectivement, alors que la faible capacité a été remarquée chez la souche K avec 15%. L'activité significative au niveau des EPS bruts a été peut être due à la présence d'autres composants antioxydants qui ont été peut être des protéines, peptides et microéléments qui ont pu avoir des effets synergiques ou des interactions avec d'autres composés présents dans l'EPS brut (Li *et al.*, 2014 ; Seo *et al.*, 2015).

Li *et al.*, (2014) ont trouvé une activité de piégeage du DPPH de 33.53 à 41.92% chez *Lb. helveticus* MB2-1 pour un échantillon d'EPS. Il a été démontré par Osuntoki et Korie, (2010) que des souches de bactéries lactiques, *Lb. casei*, *Lb. brevis* et *Lb. plantarum*, ont eu une activité de piégeage du radical DPPH de 2.8 à 31.5%. Abubakr *et al.*, (2012) ont trouvé sept souches de bactéries lactiques qui ont eu une activité de piégeage du radical DPPH de 14.7 à 50.8%. Afify *et al.*, (2012) ont trouvé un maximum d'activité avec *Lb.reuteria* (ATCC 20016) avec 96.74% suivie par *Lb. rhamnosus* avec 91.72%. Cela a indiqué que d'autres composants de certaines souches ont pu présenter une activité antioxydante au niveau du surnageant qui a peut être due aux polysaccharides extracellulaires ou à des enzymes à activité antioxydante (Li *et al.*, 2012 ; Nyanzi *et al.*, 2015).

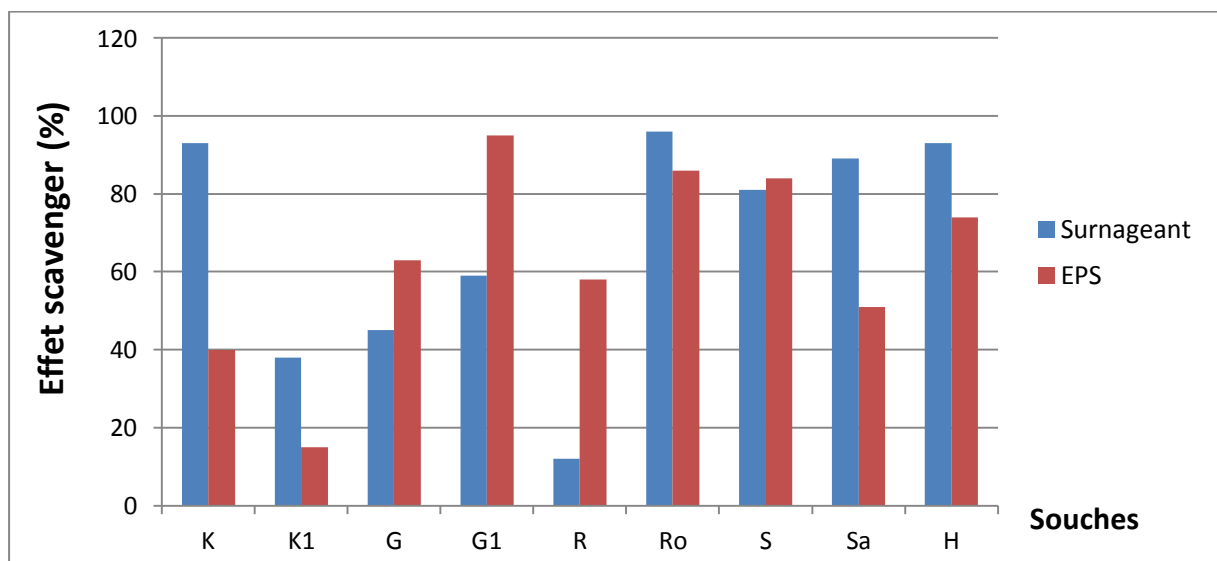


Figure 9. Capacité de piégeage des radicaux libres DPPH par les souches de bactéries lactiques

III.5.2. Capacité de piégeage des radicaux hydroxyles

Les radicaux hydroxyles sont considérés comme étant les radicaux les plus réactifs qui peuvent induire des graves dommages aux cellules en interagissant avec les biomolécules cellulaires. Ainsi, le piégeage de ce radical est important pour la défense antioxydante et la réduction des dommages oxydatifs (Pan et Mei, 2010 ; Zhang *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2014)

Dans la **figure 10**, les résultats de piégeage du radical hydroxyle ont montré une différenciation relativement marquée entre le surnageant et l'EPS. La capacité de l'EPS à piéger le radical hydroxyle a été de 29 à 82% dans laquelle la souche Ro a présenté le plus haut niveau, toute fois, le surnageant a démontré une forte capacité de piégeage avec 77 et 68% par les souches Ro et Sa respectivement.

Zhang et al., (2011) ont trouvé que les extraits extracellulaires des souches *Lb. casei* subsp. *casei* SY13 et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ ont eu une excellente élimination du radical hydroxyle avec 31.19 et 10.01%, respectivement. **Amanatidou et al., (2001)** ont montré que la souche *Lb. sake* possède une capacité d'élimination de ce radical pour un échantillon de surnageant. **Li et al., (2014)** ont démontré que les EPS de la souche *Lb. helveticus* MB2-1 ont eu une forte activité de piégeage du radical hydroxyle.

Le piégeage des radicaux libres a été considéré comme l'un des principaux mécanismes antioxydants des bactéries lactiques et plus particulièrement le piégeage des radicaux hydroxyles qui a été peut être dû à la capacité de donner l'hydrogène actif des substitutions de l'hydroxyle de l'EPS ou par la réduction de la concentration de l'ion de fer dans la réaction de Fenton (**Pan et al., 2010; Xu et al., 2011 ; Li et al., 2014**).

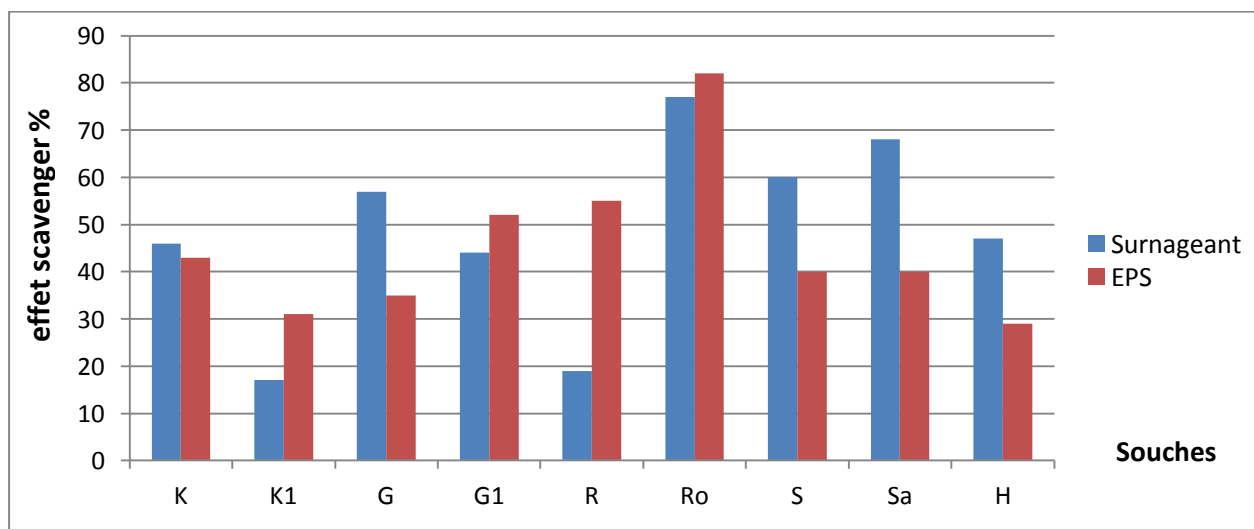


Figure 10. Capacité de piégeage des radicaux hydroxyles par les souches de bactéries lactiques.

III.5.3. Activité de chélation des ions de fer

L'activité de chélation des métaux est revendiquée comme l'un des mécanismes antioxydants. Parmi les ions métalliques impliqués dans les réactions d'oxydation, les ions de fer sont les plus importants du fait de leur haute réactivité. Les antioxydants chélateurs stabilisent la forme oxydée de l'ion ferreux en réduisant leur potentiel redox (Zhang *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2014).

La figure 11 a montré l'activité de chélation des ions ferreux des EPS et du surnageant pour les neuf souches qui a été varié de 20 à 97%. Pour les échantillons d'EPS, la souche H est demeurée la plus puissante avec une activité de 97% suivie de la souche Ro avec 82% alors que la souche G a présenté une faible activité avec 20%. Néanmoins, le surnageant a montré une forte activité de chélation avec 80% par la souche Ro.

Li *et al.*, (2014) ont trouvé que les EPS de la souche *Lb. helveticus* MB2-1 ont eu un pouvoir de chélation de 99.34%. Zhang *et al.*, (2011) ont prouvé que les souches testées *Lb. casei* subsp. *casei* SY13 et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ ont eu une activité de chélation des ions de fer avec 50.55%. Lee *et al.*, (2005) ont montré que les souches *Lb. casei* KCTC3260 et *Lb. rhamnosus* ont présenté une capacité importante de chélation des ions de fer. L'activité chélatante de ces souches a été peut être due aux chélateurs, qui ont pu capturer les ions de fer et bloquer la chaîne de réaction (Kim *et al.*, 2005). Il a été reporté qu'une activité élevée de chélation des ions de fer par les souches a été peut être probablement liée à leur capacité de supporter des niveaux élevés d'oxygène (Lee *et al.*, 2005).

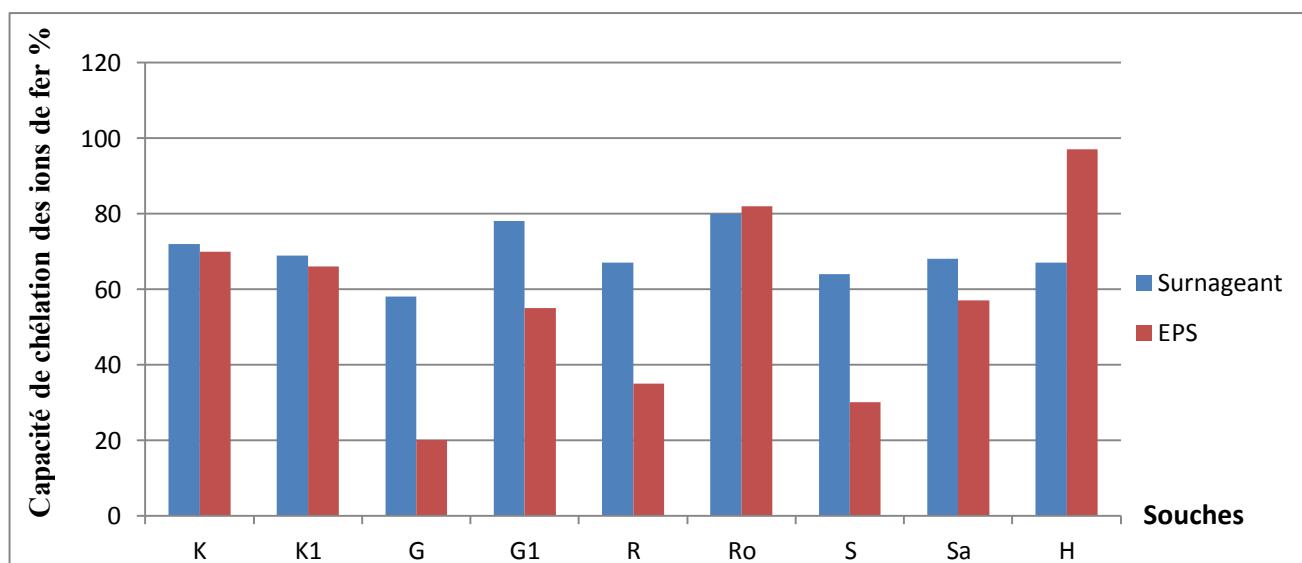


Figure 11. Capacité de chélation des ions de fer par les EPS et les surnageants des souches de Lactobacilles.

Après l'évaluation de l'activité antioxydante des neuf souches, on a observé que ces souches ont possédé une activité antioxydante considérable qui a été variée d'une souche à l'autre et pouvant ainsi réduire l'effet indésirable des radicaux libres par plusieurs méthodes (activité de piégeage des radicaux libre DPPH, radicaux hydroxyle et la chélation de ions de fer). Quant à la souche Ro qui a montré une forte capacité de piégeage des radicaux libres DPPH (96%) et les radicaux hydroxyles (82%) ainsi qu'une activité de chélation des ions ferreux avec des rendements très élevés (82%). L'efficacité antioxydante de cette dernière en a fait une souche de choix à servir d'agent antioxydant puissant.

L'activité de piégeage des radicaux libres par les EPS est apparait l'un des mécanismes responsable de l'activité antioxydante des bactéries lactiques dont les résultats se sont différenciés entre les différentes souches et cela a été peut être dû à leur concentration ainsi qu'à leur différence de caractéristique chimique. Il a été proposé que l'activité antioxydante des EPS a été peut être liée au poids moléculaire disant qu'au plus petit poids moléculaire l'activité antioxydante a été plus forte ainsi que différents facteurs tels que les méthodes d'extraction, d'isolement utilisées, la composition en monosaccharides et la liaison glycosidique ont pu affecter cette activité (Li *et al.*, 2014 ; Bai *et al.*, 2016).

III.6. Etude de quelques propriétés probiotiques (La tolérance à l'acidité et aux sels biliaries)

La tolérance aux sels biliaries et à l'acidité sont deux caractéristiques importantes de bactéries lactiques dites probiotiques. Ces caractéristiques leur permettent de survivre ainsi que d'exercer leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (Saavedra *et al.*, 2003).

La figure 12 a présenté les résultats du taux de survie de la souche Ro qui a été soumise dans un milieu acide (pH 2.0) en fonction du temps. Comme il a été montré dans la figure, la souche Ro a exprimé une forte tolérance au pH acide (pH 2.0) avec un taux de survie de 88% et 82% après 2h et 4h d'incubation respectivement.

D'autre part, **la figure 13** a représenté les résultats du taux de croissance de la même souche à 0.1% et 0.3% de sels biliaries. En comparaison avec le témoin, cette souche a montré une résistance avec un taux de croissance relativement modéré à 0.1% et un peu plus faible à 0.3%.

N'tcha *et al.*, (2016) ont énoncé que les souches *Leuconostoc mesenteroides* et *Streptococcus thermophilus* ont montré une forte résistance à pH 2.0 après 2h d'incubation avec un taux de survie de 99% et un taux de 98% par *Lb. casei* comme ainsi que pour une concentration de 0.3% de sels biliaries. Il a été démontré par **Burns *et al.*, (2008)** que les souches *Lb. delbruekii spp. Bulgaricus* et

Lb. delbruekii spp. Lactis ont été sensibles aux sels biliaries. En terme de probiotiques, les bactéries lactiques doivent avoir la capacité de survivre au passage de l'estomac et de l'intestin grêle. C'est pourquoi la résistance au pH acide du suc gastrique dans l'estomac ainsi qu'aux sels biliaries de l'intestin est l'un des critères majeur de sélection d'une souche probiotique (Sandes *et al.*, 2018).

Nos résultats ont suggéré que cette souche humaine ait pu passer avec succès dans l'estomac et survivre à l'environnement intestinal.

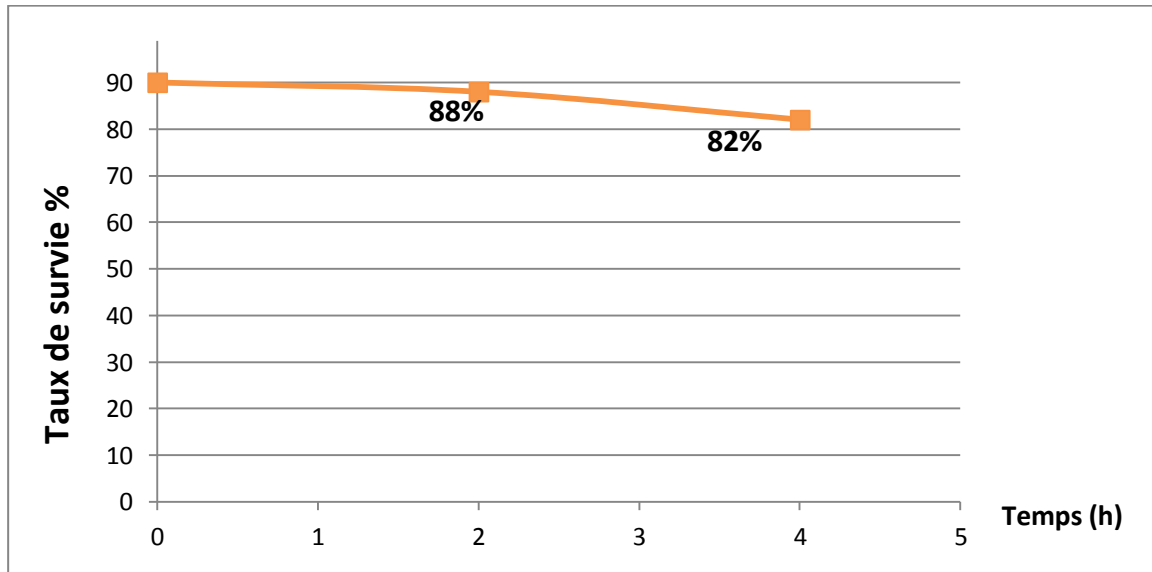


Figure 12. Taux de survie (%) de la souche Ro dans le milieu acide à pH 2.0 après 2h et 4h d'incubation.

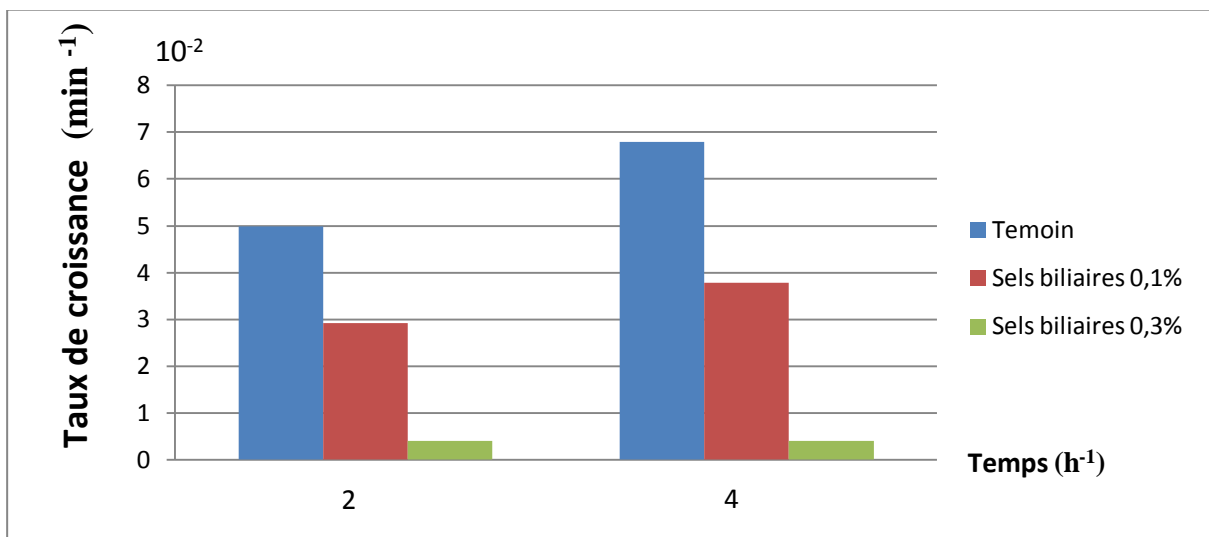


Figure 13. Taux de croissance (min⁻¹) de la souche Ro dans du bouillon MRS sans bile, avec 0.1% et 0.3% de sels biliaries après 2h et 4h d'incubation.

Conclusion

Notre présent travail a été consacré pour l'évaluation du pouvoir antioxydant de quelques souches de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides isolées principalement de la microflore intestinale des nourrissons. Grâce au screening mis en place dans ce travail, nous avons pu sélectionner 9 souches qui ont été purifiées, pré-identifiées par quelques tests classiques (caractérisation morphologique, tests biochimiques et physiologiques) révélant que ces isolats appartiennent au genre *Lactobacillus* destinés par la suite à des essais concernant la production d'EPS, l'activité antioxydante de ces derniers ainsi que l'étude de certaines propriétés probiotiques.

Les résultats obtenus dans cette étude sont résumés dans les points suivants :

- Les neuf souches obtenues sont aptes à produire l'EPS avec une différence négligeable au niveau de production. Le rendement maximal en EPS est obtenu par la souche R (23mg/l).
- En utilisant une variété de tests antioxydants : activité de piégeage des radicaux libres DPPH et des radicaux hydroxyles ainsi que l'activité de chélation des ions de fer, toutes les souches de bactéries lactiques sélectionnées ont montré une activité antioxydante qui diffère d'une souche à l'autre. La souche Ro a été estimée comme souche possédant un potentiel antioxydant important au niveau de l'EPS comme au niveau du surnageant avec des capacités élevées de piégeage des radicaux libres du DPPH (86% pour l'EPS, 96% pour le surnageant), des radicaux hydroxyles (82% pour l'EPS, 77% pour le surnageant), et une capacité de chélation des ions de fer relativement bonne (82% pour l'EPS, 80% pour le surnageant).
- Cette dernière a également exhibé une capacité à survivre dans des conditions extrêmes du tube digestif notamment le pH acide et les sels biliaires avec un taux de survie à un pH de 2.0 qui parvient à 84% et un taux de croissance en présence de 0.1% et 0.3% de sels biliaires de $3.78 \cdot 10^{-2}$ et $0.4 \cdot 10^{-2}$, respectivement.

Sur la base de ces résultats, on suggère que les EPS obtenus de ces souches de bactéries lactiques notamment la souche Ro, provenant d'espèces normalement présentes dans l'intestin humain établissent une possibilité d'être souches probiotiques et peuvent être des candidats excellents quant à leur puissance en tant qu'antioxydants potentiels.

À cet égard, des controverses et des travaux futurs pourraient soulevés pour mieux comprendre la structure et le mode d'action des EPS des bactéries lactiques *in vivo* afin de les pouvoir appliquer comme des antioxydants pour prévenir les pathologies et les dommages causés par les radicaux libres, ainsi compenser les baisses de la capacité des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

Références

A

- Abdhul, K.**, Ganesh, M., Shanmughapriya, S., Kanagavel, M., Anbarasu, K., & Natarajaseenivasan, K. (2014). Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain *Enterococcus faecium* (BDU7) from Ngari. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 450-454.
- Abdul-Abbas, S. J.**, Al-Badran, A. E., Al-bayyar, A. H. A., & Al-Sherifi, H. R. (2016). Isolation and identification of a local strain of probiotic bacterial *Lactobacillus plantarum* and studied the tolerance ability for different levels of pH. *Basrah Journal of Veterinary Research.*, 15(2), 329-345.
- Abubakr, M. A.**, Hassan, Z., & Imdakim, M. M. A. (2012). Antioxidant activity of lactic acid bacteria (LAB) fermented skim milk as determined by 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and ferrous chelating activity (FCA). *African Journal of Microbiology Research*, 6(34), 6358-6364.
- Afify, A. E. M. M.**, Romeilah, R. M., Sultan, S. I., & Hussein, M. M. (2012). Antioxidant activity and biological evaluations of probiotic bacteria strains. *International Journal of Academic Research*, 4(6), 131-139.
- Al-Dalaen, S. M.**, & Al-Qtaitat, A. I. (2014). Review article: Oxidative stress versus antioxidants. *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2(5), 60-71.
- Ali, H. B.**, Atig, F., Mehri, S., Saad, A., & Ajina, M. (2012). Analyse du statut oxydatif spermatique chez des patients infertiles. *Basic and Clinical Andrology*, 22(4), 233.
- Amanatidou, A.**, Smid, E. J., Bennik, M. H., & Gorris, L. G. (2001). Antioxidative properties of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen concentrations. *FEMS Microbiology Letters*, 203(1), 87-94.
- Atlan, D.** (1996). Les connaissances acquises chez les lactocoques sont-elles transposables aux autres bactéries lactiques?. *Le Lait*, 76(1-2), 129-137.

B

- Badis, A.**, Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales " arabia et kabyle". *Sciences & Technologie C*, (23), 30-37.
- Bai, L.**, Wang, L., Ji, S. (2016). Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* SMN2-1. *Chemical Engineering Transactions*. (55), 2283-9216.
- Benhadria, M. K.**, Touil, M. A. T., & Meddah, B. (2017). Optimization of production of Microbial Exopolysaccharides (EPS) with essential oils from two medicinal plants. *Journal of Applied Biosciences*, 111(1), 10925-10933.
- Berger, M. M.** (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant: état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20(1), 48-53.

Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S. E. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological Reviews*, 94(2), 329-354.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9.

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

C

Chakoosari, M. M. D., Ghasemi, M. F., & Masiha, A. (2014). Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria. *Bulltin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 3(2), 275-278.

Choudhari, S. K., Chaudhary, M., Gadmail, A. R., Sharma, A., & Tekade, S. (2014). Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: a review. *Oral oncology*, 50(1), 10-18.

Coşkun, Ş., Aslim, B., & Yuksekdag, Z. N. (2010). Effect of two strains of *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* on nitric oxide generation and antioxidant status of rat small intestine. *Medicinal Chemistry Research*, 19(9), 1082-1091.

D

De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: *Bacteriocins of lactic acid bacteria* (pp. 91-142). Springer, Boston, MA.

Defraigne, J. O., & Pincemail, J. (2008). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Revue Médicale de Liège*, 63, 10-19.

Denev, S. A. (2006). Role of Lactobacilli Gastrointestinal Ecosystem. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 12(1), 63-114.

Ding, W., Wang, L., Zhang, J., Ke, W., Zhou, J., Zhu, J., & Long, R. (2017). Characterization of antioxidant properties of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented yak milk in the Tibetan Plateau. *Journal of Functional Foods*, 35, 481-488.

Dortu, C., & Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires/Bacteriocins from lactic acid bacteria: interest for food products biopreservation. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 143.

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.

Drouault, S., & Corthier, G. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*, 32(2), 101-117.

Duan, C., Zhao, Y., Huang, C., Zhao, Z., Gao, L., Niu, C., ... & Li, S. (2018). Hepatoprotective effects of *Lactobacillus plantarum* C88 on LPS/D-GalN-induced acute liver injury in mice. *Journal of Functional Foods*, 43, 146-153.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.

Dupont, I. (1998). Identification moléculaire de souches de lactobacilles productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches. Thèse de maîtrise ès sciences. Université Laval.

F

Fanning, S., Hall, L. J., & van Sinderen, D. (2012). *Bifidobacterium breve* UCC2003 surface exopolysaccharide production is a beneficial trait mediating commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Gut Microbes*, 3(5), 420-425.

FAO/WHO, (2002), Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Canada. 1-11.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité Chimique*, 270, 108-115.

G

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité Chimique*, 270, 91-96.

Gheziel, C., Russo, P., Arena, M. P., Spano, G., Ouzari, H. I., Kheroua, O., ... & Capozzi, V. (2018). Evaluating the Probiotic Potential of *Lactobacillus plantarum* Strains from Algerian Infant Feces: Towards the Design of Probiotic Starter Cultures Tailored for Developing Countries. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(34),1-11.

Goudable, J., & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 11(2), 115-120.

Guetouache, M., & Guessas, B. (2015). Characterization and identification of lactic acid bacteria isolated from traditional cheese (Klila) prepared from cows milk. *African Journal of Microbiology Research*, 9(2), 71-77.

H

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62(10), 628-38.

Heyman, M., & Ménard, S. (2002). Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(7), 1151-1165.

Hidalgo-Cantabrana, C., Sánchez, B., Milani, C., Ventura, M., Margolles, A., & Ruas-Madiedo, P. (2014). Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1), 9-18.

Hyronimus, B., Le Marrec, C., Sassi, A. H., & Deschamps, A. (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 61(2-3), 193-197.

I

Ismaili, M. A., Guilal, J., Hamama, A., Saidi, B., & Zahar, M. (2016). Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *The International Journal of Multi-disciplinary Sciences*, 1(1), 81-94.

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. *Anaerobe*, 22, 6-13.

Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, 26(1), 1-13.

Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1(3), 1-13.

Kim, H. S., Chae, H. S., Jeong, S. G., Ham, J. S., Im, S. K., Ahn, C. N., & Lee, J. M. (2005). Antioxidant activity of some yogurt starter cultures. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 18(2), 255-258.

Kim, H. S., Chae, H. S., Jeong, S. G., Ham, J. S., Im, S. K., Ahn, C. N., & Lee, J. M. (2006). In vitro antioxidative properties of lactobacilli. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(2), 262.

Koehlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20(4), 165-177.

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

Kullisaar, T., Songisepp, E., & Zilmer, M. (2012). Probiotics and oxidative stress. In *Oxidative stress-Environmental induction and dietary antioxidants*. InTech. 203-222.

Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., & Kilk, A. (2002). Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 72(3), 215-224.

L

- Labioui, H.**, Elmoualdi, L., El Yachioui, M., & Ouhssine, M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin-Societe De Pharmacie De Bordeaux*, 144(3/4), 237.
- Lai, Y. J.**, Tsai, S. H., & Lee, M. Y. (2014). Isolation of exopolysaccharide producing *Lactobacillus* strains from sorghum distillery residues pickled cabbage and their antioxidant properties. *Food Science and Biotechnology*, 23(4), 1231-1236.
- Laws, A. P.**, & Marshall, V. M. (2001). The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 709-721.
- Lee, J.**, Hwang, K. T., Chung, M. Y., Cho, D. H., & Park, C. S. (2005). Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to reactive oxygen species (ROS): role for a metal ion chelating effect. *Journal of Food Science*, 70(8), 388-391.
- Li, S.**, Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., ... & Wang, Q. (2012). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry*, 135(3), 1914-1919.
- Li, W.**, Ji, J., Chen, X., Jiang, M., Rui, X., & Dong, M. (2014). Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers*, 102, 351-359.
- Lopez, P.**, Monteserin, D. C., Gueimonde, M., Clara, G., Margolles, A., Suarez, A., & Ruas-Madiedo, P. (2012). Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains elicit different in vitro responses upon interaction with human cells. *Food Research International*, 46(1), 99-107.

M

- Marinova, G.**, & Batchvarov, V. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(1), 11-24.
- 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.
- Mozzi, F.**, Torino, M. I., & de Valdez, G. F. (2001). Identification of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria. In *Food microbiology protocols* (pp. 183-190). Humana Press.

N

N'tcha, C., Haziz, S., Agbobatinkpo, P., Vieira-Dalodé, G., Boya, B., Codjia, J. T. C., ... & Baba-Moussa. L. (2016). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from a beninese traditional beer's ferment. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 7(2), 314-330.

Nielsen, S. S. (2010). Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. *In Food Analysis Laboratory Manual* (pp. 47-53). Springer, Boston, MA.

Nyanzi, R., Shuping, D. S., Jooste, P. J., & Eloff, J. N. (2015). Antibacterial and Antioxidant Activity of Extracts from Selected Probiotic Bacteria. *Journal of Food Research*, 4(5), 122.

O

Osińska-Jarozuk, M., Jarosz-Wilkolazka, A., Jarozuk-Ściseł, J., Szałapata, K., Nowak, A., Jaszek, M., ... & Majewska, M. (2015). Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 1823-1844.

Osuntoki, A., & Korie, I. (2010). Antioxidant activity of whey from milk fermented with *Lactobacillus* species isolated from Nigerian fermented foods. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 505-511.

Othman, M., Ariff, A. B., Wasoh, H., Kapri, M. R., & Halim, M. (2017). Strategies for improving production performance of probiotic *Pediococcus acidilactici* viable cell by overcoming lactic acid inhibition. *AMB Express*, 7(1), 215.

P

Pan, D., & Mei, X. (2010). Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis subsp. lactis* 12. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 908-914.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26.

Pieniz, S., Andrezza, R., Okeke, B. C., Camargo, F. A. O., & Brandelli, A. (2015). Antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus* species isolated from meat and dairy products. *Brazilian Journal of Biology*, 75(4), 923-931.

Polak-Berecka, M., Wasko, A., Szwajgier, D., & Choma, A. (2013). Bifidogenic and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* E/N cultivated on different carbon sources. *Polish Journal of Microbiology*, 62(2), 81-189

Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, 88(4), 1243-1276.

Powers, S. K., Nelson, W. B., & Hudson, M. B. (2011). Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 942-950.

Prabhurajeshwar, C., & Chandrakanth, R. K. (2017). Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical Journal*, 40(5), 270-283.

Q

Qiao, D., Ke, C., Hu, B., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., ... & Zeng, X. (2009). Antioxidant activities of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. *Carbohydrate Polymers*, 78(2), 199-204.

R

Rao, P. S., Kalva, S., Yerramilli, A., & Mamidi, S. (2011). Free radicals and tissue damage: role of antioxidants. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(4), 2-7.

Rees, J., Zal, F., & Thome, J. (2004). Enfer et paradis: la toxicite de l'oxygene chez les organismes abyssaux. *Océanis*, 30(3), 277.

Ruas-Madiedo, P., Medrano, M., Salazar, N., Los Reyes-Gavilán, D., Perez, P. F., & Abraham, A. G. (2010). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate in vitro the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 2079-2086.

S

Salminen, S., & Von Wright, A. (Eds.). (2004). Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Vol. 139). CRC Press.

Sandes, S., Alvim, L., Silva, B., Acurcio, L., Santos, C., Campos, M., ... & Nunes, Á. (2017). Selection of new lactic acid bacteria strains bearing probiotic features from mucosal microbiota of healthy calves: Looking for immunobiotics through in vitro and in vivo approaches for immunoprophylaxis applications. *Microbiological Research*, 200, 1-13.

Savado, A., Ouattara, C. A., Savadogo, P. W., Barro, N., Ouattara, A. S., & Traoré, A. S. (2004). Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African Journal of Biotechnology*, 3(3), 189-194.

Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Chaiyaso, T., Hanmoungjai, P., Leksawasdi, N., & Techapun, C. (2014). Enhancement and optimization of exopolysaccharide production by *Weissella confusa* TISTR

1498 in pH controlled submerged fermentation under high salinity stress. *Chiang Mai Journal of Sciences*, 41, 503-512.

Seo, B. J., Bajpai, V. K., Rather, I. A., & Park, Y. H. (2015). Partially purified exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 with total phenolic content, antioxidant and free radical scavenging efficacy. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 49(4), 282-292.

Shehata, M.G., El Sohaimy, S.A., El-Sahn, M.A., & Youssef, M.M., (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Science*, 61(1), 65–75.

Shori, A. B. (2013). Antioxidant activity and viability of lactic acid bacteria in soybean-yogurt made from cow and camel milk. *Journal of Taibah University for Science*, 7(4), 202-208.

Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S31-S38.

Silva, B. C., Sandes, S. H. C., Alvim, L. B., Bomfim, M. R. Q., Nicoli, J. R., Neumann, E., & Nunes, A. C. (2017). Selection of a candidate probiotic strain of *Pediococcus pentosaceus* from the faecal microbiota of horses by in vitro testing and health claims in a mouse model of Salmonella infection. *Journal of Applied Microbiology*, 122(1), 225-238.

Sisein, E. A. (2014). Biochemistry of free radicals and antioxidants. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 2(2), 110-118.

Spyropoulos, B. G., Misiakos, E. P., Fotiadis, C., & Stoidis, C. N. (2011). Antioxidant properties of probiotics and their protective effects in the pathogenesis of radiation-induced enteritis and colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 56(2), 285-294.

Su, J., Wang, T., Li, Y. Y., Li, J., Zhang, Y., Wang, Y., ... & Li, H. (2015). Antioxidant properties of wine lactic acid bacteria: *Oenococcus oeni*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(12), 5189-5202.

Sutherland, I. W. (1990). *Biotechnology of microbial exopolysaccharides* (Vol. 9). Cambridge University Press. 1-163.

T

Tahoun, A., Masutani, H., El-Sharkawy, H., Gillespie, T., Honda, R. P., Kuwata, K., ... & Suzuki, T. (2017). Capsular polysaccharide inhibits adhesion of *Bifidobacterium longum* 105-A to enterocyte-like Caco-2 cells and phagocytosis by macrophages. *Gut Pathogens*, 9(1), 27.

Trabelsi, I., Ktari, N., Slima, S. B., Triki, M., Bardaa, S., Mnif, H., & Salah, R. B. (2017). Evaluation of dermal wound healing activity and in vitro antibacterial and antioxidant activities of a new

exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 194-201.

Tserovska, L., Stefanova, S., & Yordanova, T. (2002). Identification of lactic acid bacteria isolated from kатыk, goat's milk and cheese. *Journal of Culture Collections*, 3, 48-52.

V

Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological Interactions*, 160(1), 1-40.

W

Wang, A. N., Yi, X. W., Yu, H. F., Dong, B., & Qiao, S. Y. (2009). Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* in vitro and its antioxidative effect on growing–finishing pigs. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1140-1148.

Wang, C. Y., Lin, P. R., Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, 16(6), 578-585.

Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., He, C., Yang, Y., & Yang, Z. (2015). Isolation and characterization of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 from Tibet Kefir. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 65(4), 269-280.

Wang, X., Shao, C., Liu, L., Guo, X., Xu, Y., & Lü, X. (2017). Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. *International journal of biological macromolecules*, 103, 1173-1184.

Wei, G., Fan, L., Zhu, W., Fu, Y., Yu, J., & Tang, M. (2009). Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR533-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of hazardous materials*, 162(1), 50-56.

X

Xiao, J., Zhang, Y., & Yang, Z. (2014). Lactic acid bacteria in health and disease. In: *Lactic Acid Bacteria*, 303-374. Springer Netherlands.

Xu, R., Shang, N., & Li, P. (2011). In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH. *Anaerobe*, 17(5), 226-231.

Y

Yang, F., Hou, C., Zeng, X., & Qiao, S. (2015). The use of lactic acid bacteria as a probiotic in swine diets. *Pathogens*, 4(1), 34-45.

Z

Zergoune, F. (2015). La sélection des souches des bactéries lactiques protéolytiques isolées à partir d'un produit laitier fermenté artisanale a basse de lait de vache « j'ben ». Thèse de Magistère : Université Kasdi Merbah Ouargla.

Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., ... & Li, S. (2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. International journal of Biological Macromolecules, 54, 270-275.

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 Research, 5(29), 5194-5201.

Zhang, Y., & Li, Y. (2013). Engineering the antioxidative properties of lactic acid bacteria for improving its robustness. Current Opinion in Biotechnology, 24(2), 142-147.

Zhao, Y., Wang, Y., Song, Z., Shan, C., Zhu, R., & Liu, F. (2016). Development of a simple, low-cost and eurytopic medium based on *Pleurotus eryngii* for lactic acid bacteria. AMB Express, 6(1),65.

Zidani, H. (2015) Les exopolysaccharides des bactéries lactiques. Thèse de Magistère : Université d'Oran.

Annexes

Annexe 1

Man-Rogosa Sharp (MRS bouillon et agar)

Peptone.....	10g/l
Extrait de levure.....	04g/l
Extrait de viande.....	08g/l
Glucose.....	20g/l
Phosphate Dipotassique	02g/l
Acétate de sodium.....	05g/l
Citrate d'ammonium.....	02g/l
Sulfate de manganèse	0.05g/l
Sulfate de magnésium	0.2g/l
Tween 80.....	1ml/l
Agar	15g/l

pH = 6.2 Autoclavage 120°C/ 20 min.

Gélose hypersaccharosée

Peptone.....	2.5g/l
Extrait de levure.....	03/l
Extrait de viande.....	10g/l
Saccharose.....	150g/l
Phosphate Dipotassique	02g/l
Sulfate de magnésium.....	0.2g/l
NaCl	01g/l
Agar	15g/l

pH = 6.8 Autoclavage 120°C/ 20 min.

Tampon de phosphate de sodium (PBS)

NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0.2g/l
Na ₂ HPO ₄	1.44g/l
K ₂ HPO ₄	0.24g/l

pH = 7.4

Annexe 2

I.1. Milieux et tampons

Man-Rogosa Sharp (MRS gélose et bouillon pH 6.4),

Gélose hyper saccharosée,

Phosphate Buffer saline (PBS pH 7.4),

Eau physiologique (9g NaCl/L).

I.2. Réactifs et produits chimiques

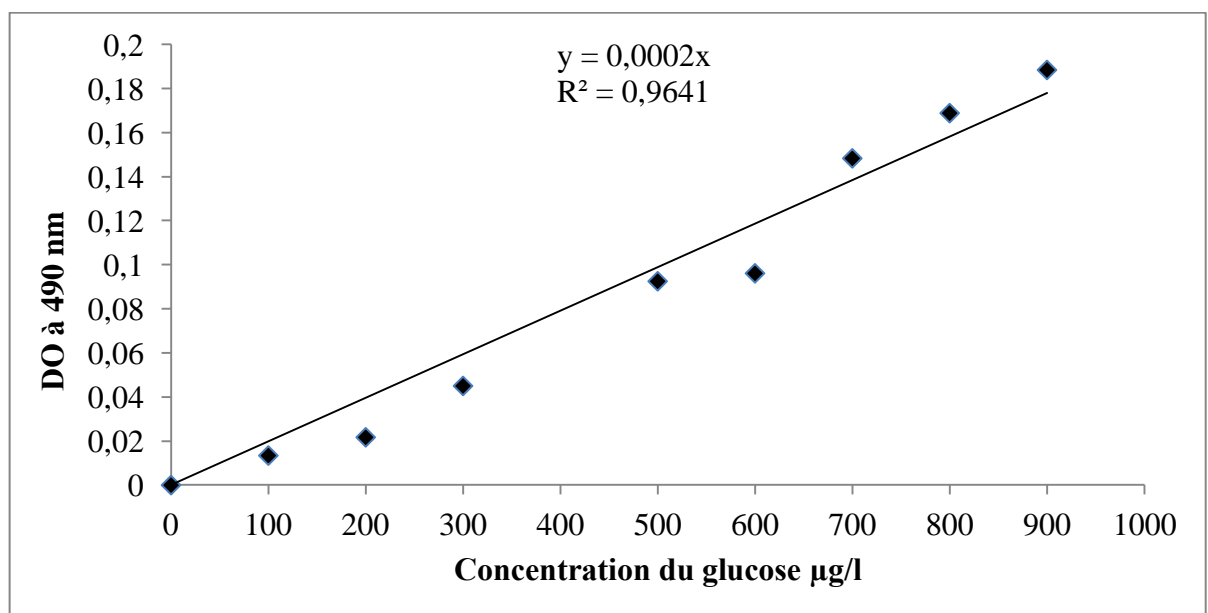
TCA (Trichloroacetic acid solution), DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl), Ethanol à 95%, acide ascorbique, acide sulfurique, phénol, FeSO₄, HCl, NaOH, Phenanthroline, peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), milieu Mollër à arginine.

I.3. Appareillage

- Spectrophotomètre (analytik jena),
- PH-mètre (HANNA),
- Balance (KERN),
- Bain Marie (Memmert),
- Vortex (VWR),
- Étuve (Memmert),
- Autoclave (pbi brand),
- Réfrigérateur (ENIEM),
- Centrifugeuse (SIGMA, Hetich EBA 20),
- Micropipette (BIOCONTROL),
- Incubateur à agitation (Ecotron),
- Plaque chauffante (BUNSEN)

Annexe 3**Coloration de Gram**

- Verser sur une lame une goutte d'eau physiologique et mélanger avec une colonie de l'échantillon puis fixer à la chaleur.
- Couvrir le frottis avec le violet de Gentiane, laisser agir pendant 1 minute. Rincer la lame avec l'eau de robinet.
- Recouvrir la lame avec de lugol et laisser agir 1 minute. Rincer la lame avec l'eau de robinet.
- Recouvrir la lame avec de l'alcool pendant 30 secondes. Rincer avec l'eau de robinet jusqu'à disparition de la couleur violette.
- Couvrir la lame avec un contre colorant la fushine et laisser agir pendant 1 minute. Rincer doucement avec l'eau de robinet et sécher avec du papier absorbant.
- Examiner sur microscope sous l'objectif x100 avec une goutte d'huile à immersion.

Annexe 4**Figure 1. La courbe étalon du glucose.****Tableau 1. Résultats de la quantification des EPS.**

Souches	K	K1	G	G1	R	Ro	S	Sa	H
DO	4.416	4.076	4.30	4.188	4.562	3.894	3.960	4.108	4.287
[EPS] mg/l	22	20	21.5	21	23	19.5	20	21	21.5

Présenté par :
SLIMOUNE Romaiassa
KINIOUAR Sabrina

Présidente : D^r. AIT MEDDOUR Amel
Examinateur : M^r. KHENNOUF Tarek
Encadreur : P^r. SIFOUR Mohamed

Thème

Evaluation du pouvoir antioxydant des exopolysaccharides de quelques bactéries lactiques de la microflore intestinale des nourrissons

Résumé

Les bactéries lactiques font parties de la microflore intestinale humaine et elles exercent des effets bénéfiques entraînant l'amélioration de la santé de l'homme. Les EPS produits par ces bactéries suscitent des activités biologiques privilégiées y compris l'activité antioxydante. Neuf souches ont été isolées à partir de fèces de nourrissons, identifiées comme des souches de *Lactobacillus* sp. et testées pour leur capacité de production d'EPS. Toutes les souches ont exhibé une production d'EPS qui est extrait et quantifié dont la souche R est la plus productrice avec 23mg/l. L'activité antioxydante des EPS ainsi que du surnageant a été évaluée via les capacités de piégeage du DPPH, du radical hydroxyle et la chélation des ions de fer. Une forte capacité de piégeage du DPPH par l'EPS a été trouvée par la souche G1 avec 95%, aussi, la haute activité scavenger du radical hydroxyle a été marquée dans l'EPS de la souche Ro avec 82%, alors que la plus grande activité de chélation a été obtenue par l'EPS de la souche H. En outre, la souche Ro a été évaluée pour ses propriétés probiotiques (la tolérance à l'acidité et aux sels biliaries), dont elle a présenté un taux de survie au pH 2 de 88% et 82% après 2h et 4h, respectivement. Cependant, pour les sels biliaries une diminution du taux de croissance a été observée à 0.3% et une résistance à 0.1%.

Mots-clés : Bactéries lactiques, Exopolysaccharides, Activité antioxydante, Probiotiques.

Abstract

Lactic acid bacteria are part of the human intestinal microflora and they have beneficial effects leading to the improvement of human health. EPS produced by these bacteria elicit privileged biological activities including antioxidant activity. Nine strains were isolated from feces of infants, identified as *Lactobacillus* sp. strains and tested for their ability to produce EPS. All the strains exhibited a production of EPS which is extracted and quantified of which the strain R is the most efficient producing strain with 23mg/l. The antioxidant activity of the EPS as well as the supernatant was evaluated through the DPPH free radical scavenging activities, the hydroxyl radical and iron ion chelation. A high DPPH scavenging capacity by EPS was found by the strain G1 with 95%. Furthermore, the high scavenger activity of the hydroxyl radical was marked with the EPS of the Ro strain with 82%, whereas the most High chelation activity was obtained by the EPS of the strain H. In addition, the strain Ro was evaluated for its probiotic properties (tolerance to acidity and bile salts); it has presented a survival rate at pH 2 of 88% and 82% after 2h and 4h, respectively. However, for bile salts a decrease in the growth rate was observed at 0.3% and a resistance at 0.1%.

Key words: Lactic acid bacteria, Exopolysaccharides, Antioxydant activity, Probiotics.

الملخص

تعتبر بكتيريا حمض اللبن جزء من البكتيريا المعوية ولها آثار مفيدة تؤدي إلى تحسين صحة الإنسان. لمتعدد السكريات المنتجة من طرف هذه البكتيريا أنشطة حيوية مميزة بما في ذلك النشاط المضاد للأكسدة. تم عزل تسع سلالات من براز الرضع وتم تصنيفها على أنها تنتمي إلى الجنس *Lactobacillus* sp. واختبار قدرتها على إنتاج متعدد السكريات. أظهرت جميع السلالات قدرة على إنتاج متعدد السكريات الذي تم استخلاصه وتحديد كميته حيث ان السلالة R هي الأكثر إنتاجا ب 23ملغ/ل. تم مراقبة النشاط المضاد للأكسدة لمتعدد السكريات بالإضافة إلى الرائق وذلك من خلال مقاومة الجذور الحرة لل DPPH و مقاومة جذور الهيدروكسيل و إزالة ايونات الحديد. تم تسجيل اكبر قدرة لمقاومة الجذور الحرة لل DPPH بواسطة متعدد السكريات للسلالة G1 ب 95%، كذلك تم ملاحظة نشاط عالي لمقاومة جذور الهيدروكسيل في متعدد السكريات للسلالة Ro ب 82% في حين أن اكبر نشاط لإزالة الايونات تم الحصول عليه من خلال متعدد السكريات للسلالة H. بالإضافة إلى ذلك تم تقييم الخصائص البروبيوتكية للسلالة Ro (مقاومة الحموضة و الأملاح الصفراوية) والتي أظهرت مقاومة عالية في درجة حموضة 2 ب 88% و 82% بعد ساعتين وأربع ساعات على التوالي. في حين بالنسبة للأملاح الصفراوية تم ملاحظه انخفاض في معدل النمو في 0.3% و مقاومة في 0.1%.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللبن ، متعدد السكريات ، النشاط المضاد للأكسدة، البروبيوتيك.