

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل -

Université Mohammed Seddik Ben Yahia -Jijel-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Microbiologie Appliquée et
Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية و علوم التغذية

Mémoire de Fin d'Etudes

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

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Survie et activité antioxydante de souches probiotiques
dans un système simulé au tube digestif**

Membres de Jury :

Présidente : D^f. Souad ALIOUA

Examinatrice : D^f. Samia AMIRA

Encadreur : P^f. Tayeb IDOUI

Présenté par :

M^{elle} : Amel BOUMELTA

M^{elle} : Nouraima BENFRIDJA

Année Universitaire 2020-2021

Numéro d'ordre (bibliothèque) :/.....

Remerciements

Tout d'abord, nous exprimons nos remerciements à Allah, le tout puissant, de nous avoir donné de la force, la patience, le courage et la volonté à surmonter toutes les difficultés afin d'accomplir ce modeste travail.

*Notre première pensée va tout naturellement à notre encadreur, **Pr. Tayeb IDOUI** non seulement d'accepté l'encadrement de ce travail, mais aussi pour sa confiance, ses conseils et sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

On tient particulièrement à remercier les membres du jury Dr. Souad ALIOUA et Dr. Samia AMIRA d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous exprimons aussi notre gratitude à tous les enseignants rencontrés lors de notre cycle universitaire.

A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Amel et Nouraima

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

*A la mémoire de mon **cher grand-père** qui aurait été fier de ma réussite. Tu as été et tu seras toujours un exemple à suivre pour tes qualités humaines, et ton perfectionnisme.*

Toutes les lettres ne saurait trouver les mots qu'il faut, tous les mots ne saurait exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance. Que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.

*A **mes chers parents** qui m'ont apportés tout ce dont j'avais besoin pour réaliser ce travail, ils n'ont jamais cessé de me soutenir toute au long de mes études et surtout être la meilleure. Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour, que dieu vos protège.*

*A **ma sœur** Kaoutar et mon frère, présent dans tous mes moments pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.*

A ma grande mère, ma tante et ma cousine pour leurs présences constantes dans ma vie, et leurs affections.

*À **toutes mes amies**, en particulier mon binôme **Amel**, qui a partagé avec moi tous les moments difficiles pour réaliser ce travail.*

Je remercie toutes les personnes que je n'ai pas pu citer leurs noms ici, qui m'ont encouragé et soutenu dans les moments difficiles.

A ma famille et toutes les personnes que j'aime.

Benfridja Nouraima

Dédicace

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour ;

A ceux qui m'ont aidé, encouragé et soutenu dans les moments les plus difficiles.

*A mes chers parents, je les remercie du fond du cœur pour leurs soutiens continus, leurs tendresses.
Je vous dédie ce mémoire en témoignage de ma profonde reconnaissance.*

*A ma chère sœur Hanane, qui a été toujours présente à mes côtés. Je t'exprime à travers ce travail
mes sentiments de fraternité et d'amour.*

*A mes copines Meryem et Selma, merci de m'avoir remonté le moral, encouragé et soutenu pendant
plusieurs années, j'ai vraiment des copines en or.*

*A mon binôme Nouraima qui a partagé avec moi tous les merveilleux moments pendant la
réalisation de ce travail.*

Un énorme merci à toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

Boumelta Amel



Sommaire

Liste d'abréviations.....	i
Liste de figures.....	iv
Liste de tableaux.....	vii
Introduction.....	1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I. Les probiotiques

I.1. Historique des probiotiques.....	3
I.2. Définition.....	3
I.3. Critères de sélection des souches probiotiques.....	4
I.3.1. Critères de sécurité.....	4
I.3.2. Critères fonctionnelles.....	5
I.3.3. Critères technologiques.....	6
I.4. Principaux microorganismes probiotiques.....	7
I.5. Mécanisme d'action des probiotiques.....	8
I.6. Probiotiques commercialisées.....	8
I.7. Généralités <i>sur Lactiplantibacillus plantarum</i>	10
I.7.1. Potentiel probiotique de <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	11

Chapitre II : Activité biologique des probiotiques

II.1. Introduction.....	13
II.2. Stress oxydatif et antioxydants.....	13
II.3. Activité antioxydante des souches probiotiques.....	13
II.3.1. Système d'enzymes antioxydants.....	14
II.3.1.1. Inhibiteurs enzymatiques.....	14
II.3.1.2. Inhibiteurs non enzymatiques.....	15
II.3.2. Capacité de chélation des ions métalliques.....	16
II.3.3. Métabolites antioxydants.....	16
II.3.4. Régulation du microbiote intestinal.....	16
II.4. Aliments transmetteurs et protecteurs des probiotiques.....	16
II.5. Polyphénols de la fraise comme antioxydants.....	18
II.6. Interaction entre les bactéries et les polyphénols.....	19
II.6.1. Métabolisme des polyphénols par la microflore intestinale.....	19
II.6.2. Modulation du microbiote intestinale.....	20

Partie II : Etude expérimentale

II.1. Matériel.....	22
II.1.1. Matériel biologique.....	22
II.1.2. Appareillages et produits.....	22
II.2. Méthodes.....	23
II.2.1. Revivification de la souche et standardisation de l'inoculum.....	23
II.2.2. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques des souches <i>in vitro</i>	24
II.2.2.1. Résistance au pH gastrique.....	24
II.2.2.2. Résistance aux sels biliaires.....	24
II.2.2.3. Test d'hydrophobicité des surfaces cellulaires.....	25
II.2.2.4. Test d'auto- agrégation et co-agrégation.....	25
II.2.2.5. Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales.....	26

II.2.3. Détermination de l'activité antioxydante des souches <i>in vitro</i>	27
II.2.3.1. Résistance à la toxicité du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂ Scavenging Activity)	27
II.2.3.2. Activité de piégeage des radicaux libres de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)	27
II.2.3.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles	28
II.2.4. Préparation de l'extrait à partir de pulpe de fraise, dosages de deux principes actifs et activité antioxydante	28
II.2.4.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	29
II.2.4.2. Dosage des flavonoïdes	29
II.2.4.3. Détermination de l'activité antioxydant de l'extrait.....	29
II.2.5. Préparation de jus de fraise lactofermenté et suivie de quelques paramètres de fermentation ..	30
II.2.5.1. Préparation de jus de fraise lactofermenté	30
II.2.5.2. Evaluation de quelques paramètres de fermentation	31
II.6. Mesure des activités antioxydantes de la bactérie après 24 heures de fermentation.....	32
II.7.Effet de la digestion bucco-gastro-intestinale sur la viabilité de <i>L. plantarum in vitro</i>	32
II.7.1.Préparation des solutions mères des liquides simulés de la digestion.....	32
II.7.2. Protocole expérimental de la digestion bucco -gastro-intestinale <i>in vitro</i>	33
II.8. Effet de la digestion sur la survie, l'activité antioxydante et les aptitudes probiotiques des souches <i>in vitro</i>	36
II.9. Effet de la digestion sur la biodisponibilité des polyphénols et des flavonoïdes <i>in vitro</i>	36
II.10. Effet de la digestion sur la survie, l'activité antioxydante et les aptitudes probiotiques de <i>L. plantarum</i> S10 et BCX1 en présence de l'extrait et de jus de fraise <i>in vitro</i>	36
II.11. Montage expérimental de la digestion <i>in vitro</i>	37
II. 12. Analyse statistique	37

Partie III : Résultats et discussions

III.1. Vérification de la pureté des souches	38
III.2. Evaluation de quelques aptitudes probiotique de <i>L. plantarum in vitro</i>	38
III.2.1. Résistance au pH gastrique	38
III.2.2. Résistance aux sels biliaires	39
III.2.3. Hydrophobicité des surfaces cellulaires.....	40
III.2.4. Capacité d'auto-agrégation /co-agrégation	41
III.2.5. Adhésion aux cellules épithéliales	43
III.3. Détermination <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante des souches probiotiques	44
III.3.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂ Scavenging Activity)	44
III.3.2. Activité de piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	45
III.3.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles	46
III.4. Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes de l'extrait et du jus de fraise	47
III.4.1. Teneur en polyphénols totaux	47
III.4.2. Teneur en flavonoïdes	48
III.5. Détermination de l'activité antioxydante de l'extrait et du jus de fraise	49
III.5.1. Activité de piégeage de radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	49
III.5.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power)	50
III.6. Préparation du jus de fraise fermenté et évaluation de quelques paramètres de fermentation	51
III.6.1. Evolution du pH et d'acidité	51
III.6.2. Evolution du nombre de cellules viables	52
III.7. Activités antioxydantes de la bactérie après 24heures de fermentation du jus de fraise	53

III.7.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂ Scavenging Activity).....	53
III.7.2. Activité de piégeage des radicaux libres de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	54
III.7.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles	54
III.8. Effet de la digestion sur la viabilité des souches de <i>L. plantarum in vitro</i>	55
III.8.1. Nombre de cellules viables	55
III.8.2. Aptitudes probiotiques des souches après la digestion bucco-gastro-intestinale.....	56
III.8.2.1. Résistance au pH gastrique	56
III.8.2.2. Résistance aux sels biliaires	57
III.8.2.3. Hydrophobicité des surfaces cellulaires.....	58
III.8.2.4. Auto-agrégation et co-agrégation	59
III.8.3. Activité antioxydante des souches après digestion bucco-gastro-intestinale.....	61
III.8.3.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂ Scavenging Activity).....	61
III.8.3.2. Activité de piégeage des radicaux libres de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	62
III.8.3.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles	63
III.9. Digestion bucco-gastro-intestinale de jus et de l'extrait	63
III.9.1. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes	64
III.9.2. Effet de la digestion sur l'activité antioxydante de jus brut et de l'extrait de fraise <i>in vitro</i>	65
III.10. Digestion <i>in-vitro</i> des deux combinaisons « bactéries /extraits », « bactéries/ jus »	67
III.10.1. Aptitudes probiotiques des <i>L. plantarum</i> dans la matrice.....	67
III.10.1.1. Survie et viabilité des <i>L. plantarum</i>	67
III.10.1.2. Résistance au pH gastrique	68
III.10.1.3. Résistance aux sels biliaires	70
III.10.1.4. Hydrophobicité des surfaces cellulaires.....	71
III.10.1.5. Capacité d'auto-agrégation	72
III.10.1.6. Capacité de la co-agrégation	73
III.10.2. Activité antioxydante des souches de <i>L. plantarum</i> en combinaison avec la matrice végétale	74
III.10.2.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂ Scavenging Activity).....	74
III.10.2.2. Activité de piégeage de radical libre de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	75
III.10.2.3. Activité de piégeage du radical hydroxyle.....	76
III.10.2.4. Pouvoir réducteur du fer (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power).....	77
III.11. Biodisponibilité des polyphénols et flavonoïdes après la combinaison des souches de <i>L. plantarum</i> avec la matrice végétale (extrait / jus) lors de la digestion	79
III.12. Montage d'un circuit pour une simulation d'une digestion bucco-gastro-intestinale	80
Conclusion générale.....	82
Liste bibliographique	83
Annexes.....	102

Abs : absorbance

ADI : arginine désaminase

ADN : acide désoxyribonucléique

AG : acide gallique

AlCl₃ : chlorure d'aluminium

ANOVA : Analyse de la variance

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine triphosphate

ATR : Acid tolerance response

BSH : Bile salt hydrolase

C : Cytosine

CAT : Catalase

CO₂ : Dioxyde de carbone

Cu⁺² : Cuivre

DO : Densité Optique

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle

EAA : Equivalent Acide Ascorpique

EAG : Equivalent d'Acide Galique

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EPS : Exopolysaccharides

EQ : Equivalent Quercétine

ERO : Espèces Réactives d'Oxygène

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

Fe²⁺ : Fer ferrique

FRAP: Ferric ion Reducing Antioxidant Power

g: gramme

G: Guanine

GP_x: Glutathion peroxydase

GRAS: Generally Recognized As Safe

GSH : Glutathione réduit

GSSG : Glutathion oxydé

h: heure

H : hydrogène

HCl: acide chlorhydrique

HDL: High Density Lipoprotein

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

L : Litre

LDL : Low Density Lipoprotein

LG : Liquide gastrique

LI : Liquide intestinale

LS : Liquide salivaire

M : Molaire

MDR: MultiDrug Resistance

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

mM : millimolaire

MRS: Man Rogosa et Sharpe

N : Normalité

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NaOH : Hydroxyde de sodium

nm : nanomètre

O₂ : Oxygène

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : Phosphate Buffered Saline

pH : potentiel d'Hydrogène

PPT : Composés Phénoliques totaux

RL : Radicaux Libres

rpm : Rotation par minute

S : Seconde

SOD : Superoxyde dismutase

T : Température

TCA : Acide trichloro-acétique

TGI : Tractus gastro-intestinale

Trolox : 6-hydroxy-2, 5, 7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

UFC: Unité formant colonie

µl : microlitre

UV : Ultraviolet

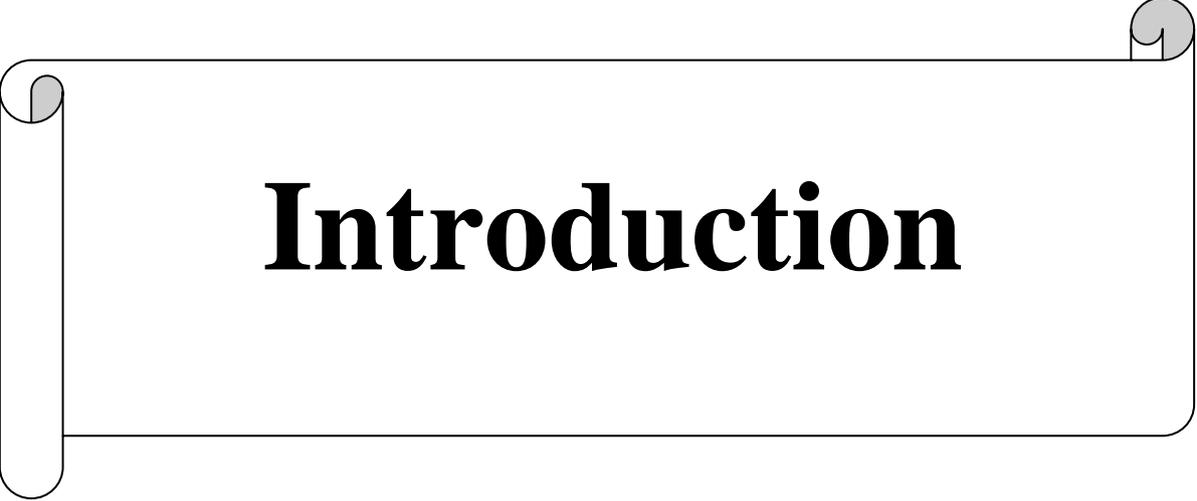
v/v : volume /volume

Figure 1. Mécanismes de réponse biliaire identifiés et caractérisés chez les lactobacilles.....	6
Figure 2. Classification des « aliments santé » et place des probiotiques.....	9
Figure 3. Modulation de l'activité antioxydante par les probiotiques	14
Figure 4. Classification et types d'aliments probiotiques	17
Figure 5. Différentes classes de composés polyphénoliques	18
Figure 6. Métabolisme microbien des composés phénoliques dans le système gastro-intestinal	20
Figure 7. Diagramme de la préparation de jus de fraise lactofermenté	31
Figure 8. Montage expérimental de la digestion bucco-gastro-intestinale <i>in vitro</i>	35
Figure 9. Schéma de la digestion bucco-gastro-intestinale <i>in vitro</i>	37
Figure 10. Photographie de l'aspect macroscopique de <i>L.plantarum</i>	38
Figure 11. Taux de survie des souches de <i>L.plantarum</i> sur des milieux aux différents pH	39
Figure 12. Survie des souches de <i>L.plantarum</i> en présence de 0.3% des sels biliaires	39
Figure 13. Pourcentage d'hydrophobicité des souches de <i>L.plantarum</i>	41
Figure 14. Photomicrographie de l'auto-agrégation des souches de <i>L. plantarum</i> (Gx100).....	42
Figure 15. Pourcentage de co-agrégation des souches de <i>L. plantarum</i> avec les trois souches pathogènes.....	42
Figure 16. Photomicrographie de la co-agrégation de <i>L. plantarum</i> S10 (Gx100).....	43
Figure 17. Photomicrographie de la co-agrégation de <i>L. plantarum</i> BCX1 (Gx100).....	43
Figure 18. Photomicrographie de l'adhésion des souches de <i>L. plantarum</i> aux cellules épithéliales (Gx100).....	44
Figure 19. Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité des souches de <i>L.plantarum</i>	45
Figure 20. Capacité des souches <i>L. plantarum</i> de leurs surnageants à piéger les radicaux libres de DPPH	46
Figure 21. Pourcentage de piégeage des radicaux hydroxyles par les souches de <i>L plantarum</i> et leurs surnageants.....	47
Figure 22. Teneur en polyphénols de jus de fraise et leur extrait	48
Figure 23. Teneur en flavonoïdes de jus de fraise et leur extrait	49
Figure 24. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'extrait et le jus	50
Figure 25. Pouvoir réducteur de jus de fraise et leur extrait	51
Figure 26. Nombre des cellules viables dans le jus de fraise et de persil après 24h de fermentation...	52
Figure 27. Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité des souches de <i>L. plantarum</i> après 24h de fermentation	53
Figure 28. Pourcentage de piégeage de radicaux libre de DPPH après 24h de fermentation	54
Figure 29. Pourcentage de piégeage de radical hydroxyle après 24h de fermentation	55

Figure 30. Effet de la digestion sur la viabilité et la survie des cellules des souches de <i>L. plantarum</i> (UFC/ml).....	56
Figure 31. Taux de survie des souches de <i>L. plantarum</i> aux différents pH après la digestion bucco-gastro-intestinale	57
Figure 32. Taux de survie des souches de <i>L. plantarum</i> aux sels biliaires au niveau intestinale.	58
Figure 33. Pourcentage d'hydrophobicité intestinale des souches de <i>L. plantarum</i>	59
Figure 34. Pourcentage d'autoagrégation des souches de <i>L. plantarum</i> après la digestion bucco-gastro-intestinale.	60
Figure 35. Pourcentage de la co-agrégation des souches de <i>L. plantarum</i> après la digestion intestinale.	60
Figure 36. Résistance des souches de <i>L. plantarum</i> au peroxyde d'hydrogène après la digestion bucco-gastro-intestinale.	61
Figure 37. Pourcentage de piégeage des radicaux DPPH par les souches de <i>L. plantarum</i> après digestion bucco-gastro-intestinale.....	62
Figure 38. Pourcentage de piégeage des radicaux hydroxyles par <i>L. plantarum</i> après digestion bucco-gastro-intestinale.	63
Figure 39. Teneur en polyphénols après la digestion bucco-gastro-intestinale	64
Figure 40. Teneur en flavonoïdes après la digestion bucco-gastro-intestinale	65
Figure 41. Pouvoir de piégeage des radicaux DPPH d'extrait et de jus après la digestion bucco-gastro-intestinale	65
Figure 42. Pouvoir réducteur après la digestion bucco-gastro-intestinale	66
Figure 43. Nombre de cellules viables de <i>L. plantarum</i> après la digestion	68
Figure 44. Survie aux bas pH des souches de <i>L. plantarum</i> après la digestion (phase intestinale).....	69
Figure 45. Survie en présence de 0.3% de sels biliaires des souches de <i>L. plantarum</i> combinée aux matrices après la digestion (phase intestinale).....	70
Figure 46. Pourcentage d'hydrophobicité intestinale des souches de <i>L. plantarum</i>	71
Figure 47. Capacité d'auto-agrégation des souches de <i>L. plantarum</i> en présence de matrice végétale (Niveau intestinal).....	72
Figure 48. Pourcentage de la co-agrégation des souches de <i>L. plantarum</i> après la digestion intestinale	73
Figure 49. Capacité des souches de <i>L. plantarum</i> à résister au peroxyde d'hydrogène au niveau intestinale	75
Figure 50. Piégeage de radicaux DPPH par <i>L. plantarum</i> lors de digestion.....	76

Figure 51. Piégeage des radicaux hydroxyles par les souches de <i>L. plantarum</i> combinée avec la matrice végétale lors de la digestion	77
Figure 52. Pouvoir réducteur des souches de <i>L. plantarum</i> véhicules avec la matrice végétale après digestion bucco-gastro-intestinale.....	78
Figure 53. Effet de la digestion <i>in vitro</i> sur la teneur en polyphénols en présence des souches de <i>L. plantarum</i>	79
Figure 54. Effet de la digestion <i>in vitro</i> sur la teneur en flavonoïdes en présence des souches de <i>L.plantarum</i>	80

Tableau 1. Liste des principales souches microbiennes considérées comme probiotiques	7
Tableau 2. Les produits probiotiques commerciaux en France	10
Tableau 3. Composition des solutions simulées de la digestion	33
Tableau 4. Evolution de pH et de l'acidité dans le jus de fraise au cours de la fermentation	51
Tableau 5. Les différents tests réalisés après le montage digestif	81

A decorative scroll-like frame with a black outline and rounded corners. The frame is oriented horizontally and has a vertical strip on the left side, suggesting a scroll. The word "Introduction" is centered within the frame in a bold, black, serif font. The background of the page is white.

Introduction

De nombreux microorganismes colonisent notre tractus gastro-intestinal et constituent un deuxième cerveau de l'organisme vivant. Cet écosystème en particulier, le plus important en termes de diversification, prend de plus en plus d'ampleur dans les recherches scientifiques grâce aux multiples activités qu'il exerce (**Galdeano et al., 2019 ; Lin et al., 2020**). Cependant, l'évolution de ces recherches a conduit à l'administration des microorganismes exogènes afin de moduler de façon positive l'équilibre du microbiote, ce qui empêche le développement de nombreuses pathologies qui pourraient trouver leur origine dans le microbiote intestinale. C'est à partir de ce moment que le concept des probiotiques a vu le jour (**Ashaolu, 2020 ; Abedfar et al., 2021**).

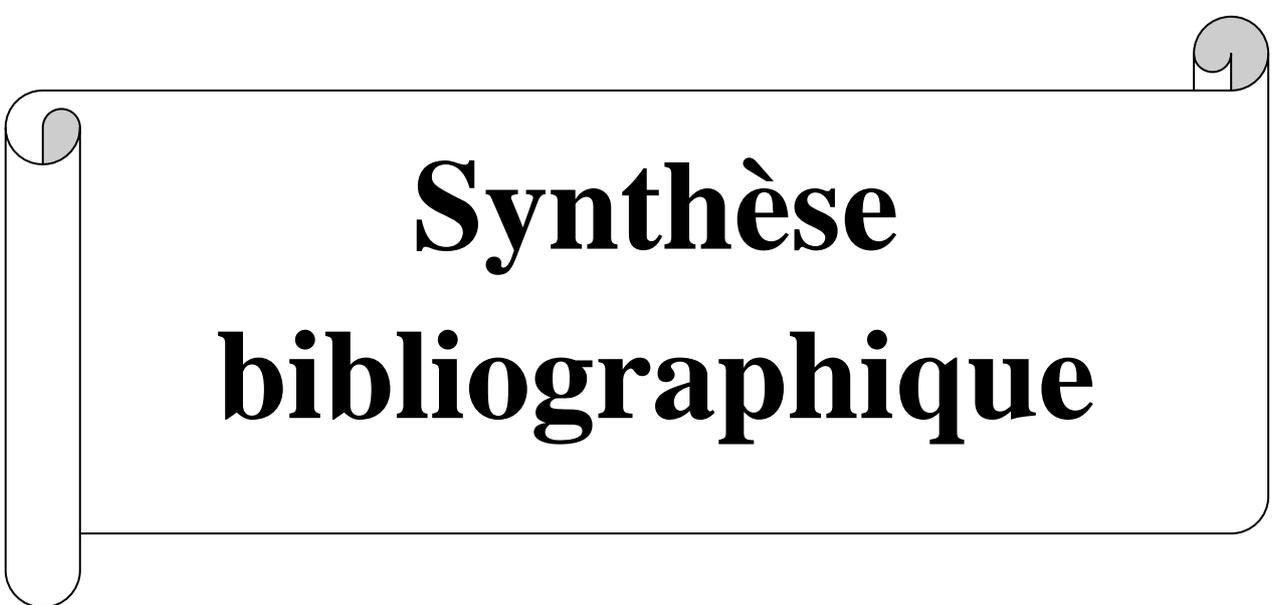
Ce concept a été étendu à l'utilisation des bactéries lactiques, plus particulièrement des bifidobactéries et des lactobacilles, ces derniers confèrent des activités bénéfiques pour la santé de l'hôte. En effet, ils doivent survivre aux conditions drastiques rencontrées dans le tractus gastro-intestinal et inhiber l'action des microorganismes pathogènes (**Ahire et al., 2021 ; Sağlam et Karahan, 2021**).

En générale, les aliments végétaux représentent une source importante doués de multiples vertus thérapeutiques, du fait qu'ils contiennent de nombreuses substances antioxydants qui jouent un rôle majeur dans la prévention des maladies liés au stress oxydative. Néanmoins, l'idée de l'incorporation des probiotiques avec une matrice végétale est considérée comme étant un paramètre clé pour renforcer la fonctionnalité des souches probiotiques et de protéger ces bactéries de l'effet délétère de l'oxygène et de ces dérivés actifs (**Spacova et al., 2020 ; Güney et al., 2021**).

Le présent travail s'articule autour de l'étude en premier lieu, de la survie *in vitro* de *Lactiplantibacillus plantarum* S10 et *Lactiplantibacillus plantarum* BCX1 dans des conditions similaires à celles du tractus bucco-gastro-intestinale avec une évaluation des aptitudes probiotiques et leurs activité antioxydante avant et après le passage à travers les étages digestifs, en deuxième lieu, d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait, de jus brut, de jus fermenté de fraise et tester leurs effets sur la viabilité et l'activité antioxydante de nos souches dans les trois compartiments digestif.

Ce manuscrit se compose de trois parties dont la première est consacrée à une synthèse bibliographique dans laquelle, nous traitons les éléments clés de la problématique, à savoir, la survie, et l'activité antioxydante des souches probiotiques. En outre, on s'intéresse aussi à un aperçu sur les matrices végétales véhiculant les probiotiques (extrait et jus de fruit). La deuxième partie englobe la méthodologie mise en œuvre pour la réalisation de ce travail, et la dernière partie présentera les différents résultats obtenus ainsi que leur discussion. Enfin, une conclusion générale,

récapitulera les principaux axes de cette étude avec les perspectives envisagées, afin de poursuivre et d'améliorer cette thématique de recherche.



Synthèse bibliographique

I.1. Historique

La découverte de la relation symbiotique entre l'homme et les bactéries a conduit à une nouvelle façon de voir les bactéries comme potentiellement bénéfiques, plutôt que pathogènes. Cette conception a été développée principalement grâce aux constatations de chercheur et prix Nobel **Elie Metchnikoff** en 1907, qu'ayant suggéré que l'ingestion des bactéries lactiques vivantes influençait positivement la microflore intestinale en réduisant dans le tube digestif la population des bactéries putréfiantes et les activités toxiques microbiennes, par conséquent, elle induit une réduction des désordres intestinaux, une amélioration d'hygiène digestive, et donc une augmentation de l'espérance de vie (**Anukam et Reid, 2007 ; Ranadheera et al., 2010 ; Gogineni et al., 2013 ; Gharib, 2020**).

Le terme probiotique a été introduit pour la première fois par Lilly et Stillwell en 1965 comme des facteurs dérivés des microorganismes et stimulant la croissance des autres microorganismes (**Kim et al., 2019**). Entre temps, plusieurs travaux se sont développés selon le concept que l'ingestion de microorganismes peut améliorer la santé de l'hôte (**Ringø et al., 2020**). En 1991, Fuller a redéfini les probiotiques comme étant des préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additifs alimentaires, ayant une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale et depuis, plusieurs définitions des probiotiques ont succédé sur la base des nouvelles connaissances de leurs modes d'actions et de leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (**Gautam et Sharma, 2015 ; Mbye et al., 2020**).

I.2. Définition

La notion probiotique a connu une évolution dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. Il provient de deux mots grecs « pros » et « bios » qui signifient littéralement « pour la vie » (**Vasiljevic et Shah, 2008**).

En 2002, lors de la consultation mixte entre l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), une définition officielle des probiotiques a été établie, et ils sont présentés comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisante, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère » (**Gómez et al., 2016 ; Markowiak et Śliżewska, 2017 ; Silva et al., 2019**).

Ces microorganismes généralement sont des cultures mono ou mixtes qui améliorent les propriétés de la microflore indigène, participent en premier lieu à la digestion et influencent le système immunitaire. L'histoire souligne donc, que la définition actuelle pourrait encore évoluer, car les

champs de recherche sont nombreux ce qui permet une meilleure compréhension des actions de ces probiotiques (Zheng *et al.*, 2017 ; Kim *et al.*, 2019 ; Yan et Goldman, 2020).

I.3. Critères de sélection des souches probiotiques

Diverses espèces bactériennes sont utilisées depuis des décennies autant que probiotiques, qui doivent être capables d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte. Pour la sélection d'un microorganisme comme étant un probiotique, une évaluation basée sur plusieurs critères doit être effectuée et conçue par les experts de l'organisation des nations unies pour l'agriculture et l'alimentation (FAO) et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), ses critères sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne (Gómez *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2019). Elles sont classées dans trois grands groupes :

I.3.1. Critères de sécurité

La première étape dans la sélection des souches probiotiques est la détermination de la classification taxonomique par des méthodes phénotypiques et génotypiques, qui peuvent donner une indication sur :

- **Origine** : L'origine des souches à potentiel probiotique a fait l'objet de nombreuses discussions parmi les scientifiques jusqu'à l'heure actuelle. En effet, les souches probiotiques d'origine humaine sont plus compatibles à coloniser le tractus gastro-intestinal de l'homme, elles peuvent cependant être d'une origine autre qu'humaine (animale, alimentaire, ou végétale), du fait qu'elles ne présentent aucun risque sur la santé (Saarela *et al.*, 2000 ; Kosin et Rakshit, 2006).
- **Identification phénotypique et génotypique** : La consultation des experts du FAO et de l'OMS (2002) a recommandé une identification pour la validation des souches probiotiques en se basant sur la combinaison entre des méthodes moléculaires fiables phénotypiques et génotypiques. Il est nécessaire que ces souches doivent être déposées dans une collection de cultures reconnue à l'échelle internationale (Vasiljevic et Shah, 2008 ; Huys *et al.*, 2013 ; Jayashree *et al.*, 2014).
- **Innocuité** : C'est un critère incontournable pour le choix d'un probiotique, en respectant le statut GRAS (Generally Regarded As Safe). Il est important d'évaluer précisément pour chaque souche à potentiel probiotique sa sécurité, en étudiant tout effet indésirable possible comme la résistance aux antibiotiques, activités métaboliques nocives, cytotoxicité, activité hémolytique et l'absence de transfert de gènes entre les probiotiques et les bactéries du microbiote...etc (Burgain *et al.*, 2011; Dalli *et al.*, 2017).

I.3.2. Critères fonctionnelles

Afin d'être conformes à la définition établie par la FAO/OMS, les probiotiques doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif grâce aux caractéristiques suivantes :

- **Survie au cours du transit digestif**

Pour assurer l'efficacité jusqu'au site d'action, les probiotiques doivent d'abord surmonter un certain nombre de barrières physiques et chimiques dans le tractus gastro-intestinal (**Vasiljevic et Shah, 2008 ; Huckle et Zhang, 2011**). Cette capacité de survie varie considérablement d'une souche à l'autre selon leur résistance intrinsèque, mais aussi en fonction de la dose (**Morelli, 2007**).

Au niveau de l'estomac, la survie des probiotiques dépend de leur capacité à tolérer le pH faible du suc gastrique (entre 1 et 2.5/ temps de vidange gastrique 2h). Par conséquent, tout microorganisme probiotique doit avoir une tolérance élevée à l'acidité stomacale qui peut être améliorée par l'ingestion de nourriture en même temps que celle du probiotique (**Kaur et al., 2002 ; Shehata et al., 2016**). Cette résistance pourrait être expliquée par un mécanisme inductible appelé Acid Tolerance Response (ATR) qui met en jeu la transcription de certains gènes, avec synthèse d'enzymes et de protéines protectrices pour les microorganismes. Cette propriété serait notamment due à la capacité des enzymes à éliminer les protons de son cytoplasme grâce à des pompes à ATP spécifiques ou de produire des ions ammoniac qui tamponnent le milieu cellulaire et y maintiennent un pH alcalin (**Cotter et Hill, 2003 ; Sanchez et al., 2007**).

Ensuite, au niveau de l'intestin grêle, le pourcentage de survie des probiotiques est influencé par la sécrétion des acides biliaires qui sont sécrétés au niveau du duodénum sous forme conjuguée à la glycine ou à la taurine (500-700ml/jour). Plusieurs bactéries probiotiques d'origine intestinale ont développé des mécanismes pour résister à l'action détergente des sels biliaires :

- Une activité enzymatique qui est la déconjugaison des sels biliaires, grâce à la présence d'une enzyme appelée « Bile Salt Hydrolase » (BSH EC 3 .5.1.24) (Cholyglycine hydrolase) (**Figure 1**). Cette enzyme coupe la liaison peptidique des acides biliaires, ce qui entraîne l'élimination du groupe des acides aminés du noyau stéroïde (**Sivamaruthi et al., 2020**) ;
- Un autre mécanisme, c'est l'extrusion active des acides biliaires et les sels qui s'accumulent dans le cytoplasme par l'intermédiaire de pompes d'efflux, un mode d'action commun bactérien contre la toxicité de la bile. Ce mécanisme est réalisé grâce aux systèmes multidrug résistance (MDR) (**Lubelski et al., 2007; Sivamaruthi et al., 2020**).

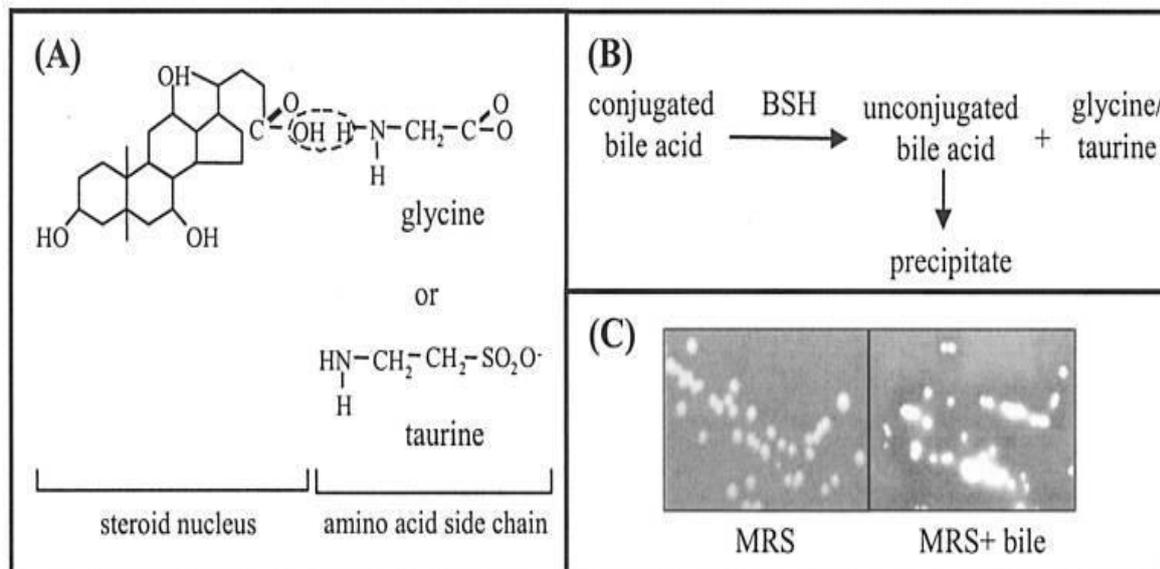


Figure 1. Mécanismes de réponse biliaire identifiés et caractérisés chez les lactobacilles (Begley *et al.*, 2006).

(A) Structure chimique des acides biliaires. (B) Réaction catalysée par les enzymes BSH. (C) Détection de l'activité de BSH. *L. plantarum*, qui a été cultivé toute la nuit dans du bouillon MRS, a été ensemencé sur de la gélose MRS (Difco) (A) ou MRS additionnée de 0,2% (poids / volume) d'acide glycodésoxycholique (dérivé de la bile) et incubé en anaérobie pendant 48 heures. Le blanc précipite autour des colonies et la clarification du milieu indiquent l'activité de la BSH (Begley *et al.*, 2006).

- **Adhésion aux cellules intestinales et/ou au mucus**

La capacité des souches à adhérer aux cellules intestinales est l'un des critères de sélection les plus importants des bactéries probiotiques parce qu'elle est considérée comme une condition préalable à la colonisation de l'intestin de l'hôte d'une façon transitoire, et permettra la stimulation du système immunitaire, en prévenant l'implantation de pathogènes via des mécanismes de compétition (Burgain *et al.*, 2014 ; Nantavisai *et al.*, 2018 ; Gharbi *et al.*, 2019 ; Li et So, 2021).

Plusieurs modèles *in vitro* ont été développés pour évaluer cette propriété en se basant sur des lignes cellulaires isolés d'adénocarcinomes du colon humain principalement les HT-29 et les Caco-2 (Dunne *et al.*, 2001 ; Bengoa *et al.*, 2018), ces dernières se différencient spontanément dans des conditions de culture standards en exprimant les mêmes caractéristiques des entérocytes matures, y compris la polarisation, les bordures en brosse fonctionnelles et les hydrolases intestinales apicales (Servin et Coconnier, 2003 ; Nantavisai *et al.*, 2018 ; Monteagudo-Mera *et al.*, 2019).

I.3.3. Critères technologiques

En plus de deux critères précédents (sécuritaire et fonctionnels), de nombreux aspects provenant d'un point de vue technologique doivent être pris en compte dans la sélection des souches

probiotiques, telles que (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002 ; Harzallah et Belhadj, 2013 ; Bahri *et al.*, 2014 ; Amira *et al.*, 2020) :

- Facilité de la production de quantités élevées de biomasse et productivité élevée des cultures ;
- Viabilité et stabilité des microorganismes au cours des procédés de la préparation (congélation, lyophilisation), de stockage, et de la distribution des produits finis ;
- Stabilité génétique ;
- Résistance aux phages.

I.4. Principaux microorganismes probiotiques

De nombreux genres de probiotiques existent à ce jour, le plus souvent sont des microorganismes qui proviennent de la microflore intestinale humaine, constitués d'espèces que l'on retrouve parmi la flore résidente, ce qui explique que seulement quelque dizaines de souches sont actuellement utilisées (Holzapfel *et al.*, 2001).

Seule une petite partie de ces microorganismes qui ont fait l'objet de nombreuses études approfondies apportant des preuves de leurs effets bénéfiques. Les bactéries lactiques dont les *Lactobacillus* ainsi que le genre *Bifidobacterium*, avec d'autres espèces non pathogènes *E. coli*, et les levures du genre *Saccharomyces* semblent être les trois grands groupes les plus fréquemment utilisées comme probiotiques (Sui *et al.*, 2021).

Tableau 1. Liste des principales souches microbiennes considérées comme probiotiques (Holzapfel *et al.*, 2001).

Lactobacilles	Bifidobactéries	Autres bactéries lactiques	Autre micro-organismes non lactiques
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>boulandii</i>
	<i>B. bifidum</i>		<i>Saccharomyces</i>
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	<i>B. infantis</i>		<i>cerevisiae</i>
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>B.lactis</i>		

I.5. Mécanismes d'action des probiotiques

Les probiotiques font actuellement l'objet de nombreuses recherches dans la communauté scientifique grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. D'une manière générale, ils sont capables d'exercer ces effets selon trois mécanismes principaux :

- Effet barrière, qui présente un mécanisme de défense majeur impliqué dans le maintien de l'intégrité épithéliale et à la résistance de la colonisation des bactéries pathogènes par la synthèse de molécules antimicrobiennes telles que le peroxyde d'hydrogène, les bactériocines qui agissent au niveau de la membrane cellulaire par un mécanisme commun qui comprend la destruction des cellules cibles par la formation des pores et / ou l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (**Servin, 2004 ; Bermudez-Brito *et al.*, 2012**), et les acides organiques (acide lactique, acétique) qui induisent la diminution du pH de manière à créer un environnement défavorable aux pathogènes (**Monteagudo-Mera *et al.*, 2019**) ;
- Amélioration de la fonction barrière de la muqueuse intestinale par le renforcement des jonctions serrées, l'augmentation du renouvellement entérocytaire, la stimulation de la synthèse de la mucine, par la diminution de la perméabilité intestinale, la sécrétion de peptides antimicrobiens comme les β -défensines, lysozyme et la synthèse des vitamines (**Gogineni *et al.*, 2013**) ;
- La modulation du système immunitaire repose sur l'interaction des probiotiques avec le système immunitaire inné ou adaptatif pour accroître la réponse immune de l'hôte contre certaines pathologies (**Fong *et al.*, 2016**). Elle se fait par différents mécanismes comme le renforcement de la réponse immunitaire non spécifique contre les infections, la stimulation de l'activité des cellules phagocytaires avec l'amélioration de la production des immunoglobulines intestinale IgA et l'induction de la synthèse des cytokines (**Holzappel *et al.*, 2006 ; Vanderpool, Yan et Polk, 2008 ; Sandres *et al.*, 2010**).

I.6. Probiotiques commercialisés

Au cours des dernières années, le marché mondial des probiotiques a connu une forte croissance, particulièrement en Europe (**Figure 2**). Il existe deux catégories de produits qui sont concernées par l'usage de ces probiotiques : les médicaments et les compléments alimentaires, qui doivent reposer sur des preuves scientifiques afin d'être mise sur le marché (**Ninane *et al.*, 2009**).

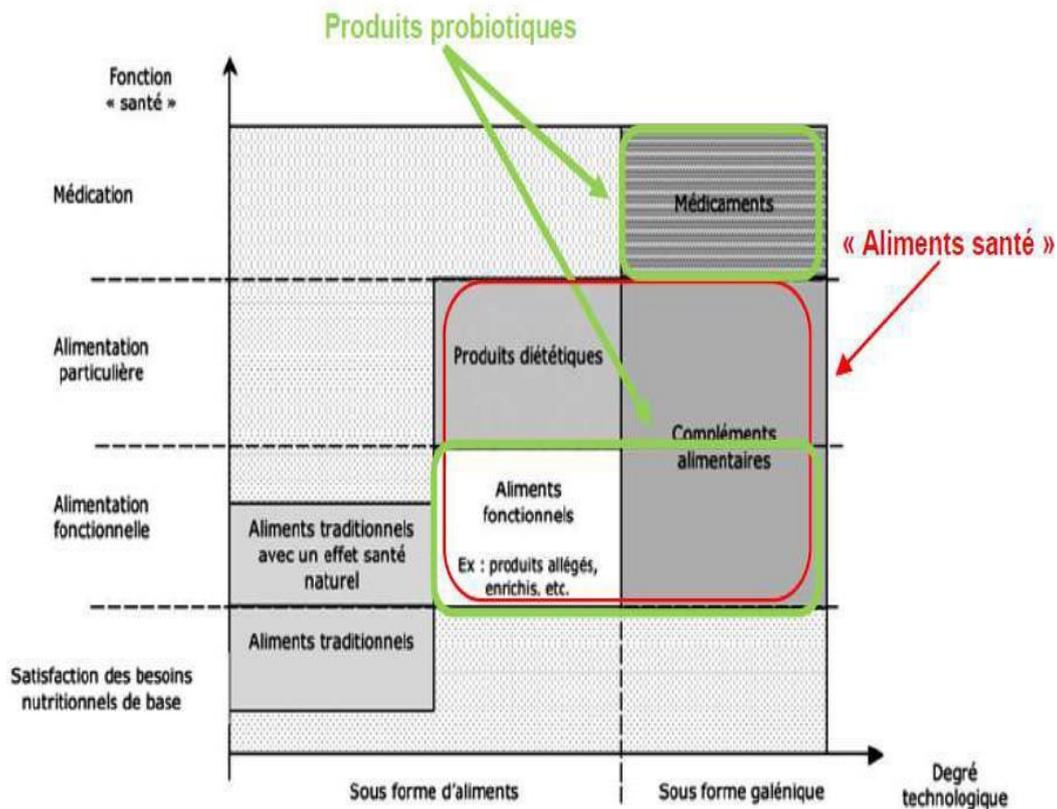


Figure 2. Classification des « aliments santé » et place des probiotiques (Boudouhi *et al.*, 2005).

En effet, les probiotiques se situent à la frontière entre les médicaments et les aliments traditionnels ; ils sont adaptés par la législation alimentaire, se différencient des aliments diététiques qui sont destinés à une alimentation particulière et doivent faire l'objet d'un procédé de fabrication spécifique. D'autre part, les aliments fonctionnels sont destinés à être consommés dans le cadre d'une alimentation à une particularité qui réside dans le fait qu'elle contient des composés biologiquement actifs exerçant un effet bénéfique au-delà des effets nutritionnels de base pour l'amélioration de la santé et/ou à réduire le risque de maladies chroniques (AL-Nabulsi *et al.*, 2014).

Récemment, de nouvelles directives sont venues durcir la réglementation au tour de ces alimentent probiotiques car leurs bénéfices sur la santé ont du mal à être reconnus.

Le tableau 02 montre certains produits commerciaux contenant des souches probiotiques vendues en France et les indications pour lesquelles ils sont conseillés.

Tableau 2. Les produits probiotiques commerciaux en France (Izquierdo, 2009).

Produits	Souches	Effet revendiqué
Ultrababy®/BIOCODEX	<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745	Antidiarrhéique
Ultra-levure poudre®/BIOCODEX	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Traitement symptomatique d'appoint de la diarrhée, en complément de la réhydratation
BION® (Merck) Transit	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 299V	Evite l'inconfort intestinal et les ballonnements
Lactibiane Défenses®/ PiLeJe	<i>L. acidophilus</i> LA201 <i>Bifidobacterium longum</i> LA 101	Contribue au fonctionnement du système immunitaire
Lactibiane H-Py®/ PiLeJe	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LA301 <i>Ligilactobacillus salivarius</i> LA302	Favorise le maintien des fonctions des muqueuses de l'estomac et de l'intestin.
Activia® (Danone)	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN-173 010	Aide à réguler le transit
BION® Flore intime (Merck)	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GR 1 <i>Limosilactobacillus reuteri</i> RC14	Restaure et protège l'équilibre de votre flore vaginale
VSL#3®	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Traite le syndrome de l'intestin irritable, la colite ulcéraire et de la pouchite

I.7. Généralités sur *Lactiplantibacillus plantarum*

Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles constituent un genre important, comprenant actuellement, plus de 261 d'espèces (Mars 2020) qui présentent une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême. Ils appartiennent au groupe des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae* (Zheng et al., 2020).

Lactiplantibacillus plantarum est l'une des espèces les plus largement réparties dans une large gamme de niches écologiques notamment la cavité buccale, le tractus gastro-intestinal et les cavités

vaginales. Cette bactérie est utilisée dans la fermentation des produits laitiers, des produits végétaux, ainsi que dans les formulations probiotiques (**De Vries et al., 2006 ; Siezen et Van Hylckama Vlieg, 2011 ; Al-Tawaha et Meng, 2018 ; De Montijo-Prieto et al., 2019**).

En effet, *Lactiplantibacillus plantarum* est une Gram positive, non sporulée, aéro-anaérobie facultative, mésophile, appartient au groupe B des lactobacilles « *Streptobacterium* » (**Al-Tawaha et Meng, 2018**). Elle se caractérise par un métabolisme hétérofermentaire facultatif (**Isa et Razavi, 2017**). De plus, cette souche produit des protéines extracellulaires, des exopolysaccharides, des bactériocines et des acides lipotechoïques qui influencent la santé et la physiologie de l'hôte en interagissant avec les cellules épithéliales et renforce le système immunitaire (**Arasu et al., 2016 ; De Montijo-Prieto et al., 2019**).

Cette espèce diffère des autres espèces du même genre par :

- Un génome qui est constitué d'un chromosome circulaire de 3.45 Mo avec un pourcentage de G+C d'environ 44.2% (**Zheng et al., 2020**) ;
- Capacité de fermenter une large gamme des glucides selon la source de carbone, de fait qu'elles peuvent établir le métabolisme par une hétérofermentation ou homofermentation (**Al-Tawaha et Meng, 2018**) ;
- Une activité tannase ce qui permet à ces espèces de métaboliser les acides phénoliques (**Al-Tawaha et Meng, 2018**) ;
- Une capacité d'accumulation de forte concentration de manganèse, qui assure une protection pour *Lactiplantibacillus plantarum* contre la toxicité de l'oxygène en réduisant les radicaux libres de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Al-Tawaha et Meng, 2018**).

I.8. Potentiel probiotiques de *Lactiplantibacillus plantarum*

De nos jours, *Lactiplantibacillus plantarum* occupe une place primordiale dans le domaine médicale grâce à ces propriétés probiotiques. En effet, toute souche bactérienne considérée comme probiotique devrait résister aux conditions de l'environnement simulés à ceux du tube digestif, de plus, cette souche est capable de synthétiser des métabolites antimicrobiens qui ont des effets inhibiteurs sur la croissance des bactéries pathogènes (**Cao et al., 2019**). Parmi ces métabolites antimicrobiens, nous citons ce qui suit (**Ammor et al., 2006 ; Al-Tawaha et Meng, 2018 ; Dinev et al., 2018 w ; De Montijo-Prieto et al., 2019 ; Ekblad et Kristiansen, 2019**):

- Les bactériocines appelées « plantracines » appartenant à des bactériocines de classe II (bactériocines à deux peptides), qui peuvent avoir un effet bactériostatique, ou bactéricide ;

- Les acides organiques, tels que l'acide lactique, l'acide acétique et l'acide propionique. Ces derniers provoquant un abaissement du pH local et une inhibition de la croissance de plusieurs bactéries sensibles aux conditions acides ;
- Le peroxyde d'hydrogène qui est produit en présence d'oxygène, sous l'effet de la flavoprotéine oxydase ou de la NADH peroxydase ; son activité antimicrobienne pourrait résulter de l'oxydation de groupes sulfhydriques, entraînant la dénaturation d'un certains nombres d'enzymes et la peroxydation des lipides membranaires, conduisant à une augmentation de la perméabilité membranaire ;
- Le dioxyde de carbone produit par *Lactiplantibacillus plantarum* peut jouer un rôle dans la création d'un environnement anaérobie qui inhibe les décarboxylations enzymatiques, son accumulation dans la bicouche lipidique de la membrane entraînant un dysfonctionnement de la perméabilité et inhibent efficacement la croissance de nombreux micro-organismes ;
- L'un des plus importants composés bioactifs produits par *Lactiplantibacillus plantarum* est les exopolysaccharides, qui lui fournissent une résistance élevée dans des conditions extrêmes d'acidité et de bile ; ces EPS permettent aussi une bonne adhésion de *L. plantarum* à la muqueuse intestinale en interagissant de manière dynamique sur des périodes prolongées avec la muqueuse intestinale; ce qui lui permettra d'entrer en compétition avec les bactéries pathogènes pour l'occupation des sites, et ainsi pour les nutriments.

II.1. Introduction

À l'exception des organismes anaérobies, le processus de l'oxydation est indispensable dans le métabolisme des cellules aérobies de l'organisme. Il met en jeu la molécule d'oxygène pour la production des molécules à haut potentiel énergétique engendrant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) particulièrement réactionnelles. L'accumulation de ces derniers a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique (ADN) (**Smirnoff, 2008**). Ces biomolécules peuvent être endommagés par le processus du stress oxydatif (**Li et al., 2012**).

En effet, un bon probiotique doit être capable de démontrer des activités antioxydants de différentes manières, ce qui permet de dire que les probiotiques pourraient avoir un rôle majeur dans l'élimination des ERO et dans la lutte contre les troubles gastro-intestinaux (**Spyropoulos et al., 2011 ; Kesen et Aiyegoro, 2018**).

II.2. Stress oxydatif et antioxydants

C'est une condition dans laquelle la balance métabolique cellulaire subit une perturbation durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydants, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes (**Mishra et al., 2015**).

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, métaux toxiques perturbée) (**Wang et al., 2017**).

Les antioxydants sont des molécules qui interagissent avec les radicaux libres générés et terminent la réaction en chaîne, réduisent ainsi les dommages cellulaires principalement par leur propriété d'élimination des radicaux libres (**Lobo et al., 2010 ; Mishra et al., 2015**). Ces molécules se trouvent à l'état naturel (vitamine E, polyphénols, flavonoïdes) dans un grand nombre d'aliments, par contre, ils sont pour la plupart synthétiques comme le pyrogallol, l'acide gallique et le gallate qui sont rajoutés dans l'industrie alimentaire (**Mishra et al., 2015**).

II.3. Activité antioxydante des souches probiotiques

Au cours de dernières années, l'activité antioxydante des souches probiotiques est devenue un front de science très actif. En effet, plusieurs études ont démontré que différentes souches de bactéries

probiotiques pouvaient exercer une capacité antioxydante de différentes manières (Tang *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017).

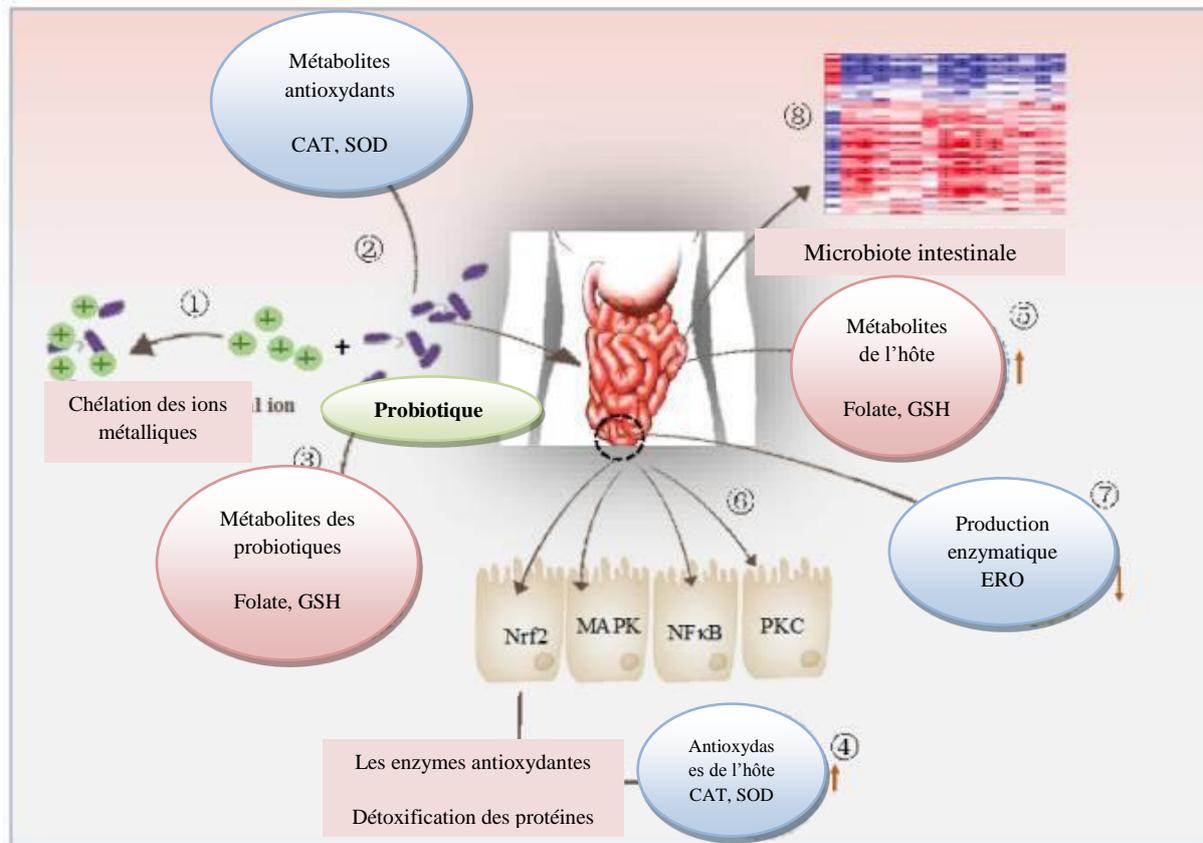


Figure 3. Modulation de l'activité antioxydante par les probiotiques (Wang *et al.*, 2017)

1. Les probiotiques chélatent les ions métalliques. 2. Les probiotiques possèdent leurs propres antioxydases. 3. Les probiotiques produisent des métabolites antioxydants. 4. Les probiotiques régulent positivement les activités antioxydases de l'hôte. 5. Les probiotiques augmentent les niveaux de métabolites antioxydants de l'hôte. 6. Les probiotiques régulent les voies de signalisation. 7. Les probiotiques régulent négativement les activités des enzymes produisant des ERO. 8. Les probiotiques régulent le microbiote intestinal (Wang *et al.*, 2017).

La figure 3 montre les mécanismes de résistance des probiotiques à des agents oxydants (espèces réactives d'oxygène). Parmi les mécanismes, nous citons ce qui suit :

II.3.1. Système d'enzymes antioxydants

Les probiotiques ont également leurs propres systèmes enzymatiques antioxydants de résistance contre le stress des ERO, notamment :

II.3.1.1. Inhibiteurs enzymatiques

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes, qui jouent un rôle non seulement fondamental mais indispensable dans la capacité de la protection antioxydante des systèmes biologiques contre

les attaques des radicaux libres (**Ighodaro et Akinloye, 2018**). Parmi ces niveaux d'antioxydants enzymatiques on trouve :

- ✓ **Superoxyde dismutase (SOD)** : il s'agit d'une enzyme antioxydante qui constitue un régulateur central des niveaux des ERO, elle agit comme un composant du système de défense de la première ligne contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Chez les bactéries lactiques, cette enzyme catalyse la décomposition du superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et en eau (H_2O) (**Bruno-Barcena et al., 2005 ; Ighodaro et Akinloye, 2018**).
- ✓ **Catalase** : c'est une enzyme présente dans presque tous les organismes vivants, en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD en décomposant le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en molécules d'oxygène gazeux O_2 et d'eau H_2O moins réactives et empêchant ainsi la génération de radicaux hydroxyles (**Lobo et al., 2010 ; Spyropoulos et al., 2011**).
- ✓ **NADH peroxydase** : contrairement aux catalases, ces enzymes sont dépendantes du pouvoir réducteur de la bactérie car la catalyse enzymatique nécessite l'oxydation du Co-facteur NADHs, ce qui permet de compenser l'absence de catalase en éliminant l' H_2O_2 produit en aérobiose par le métabolisme cellulaire (**Ighodaro et Akinloye, 2018**).
- ✓ **Glutathion peroxydase** : il joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, de l'hydroperoxyde résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH) (**Lobo et al., 2010 ; Spyropoulos et al., 2011**).

II.3.1.2. Inhibiteurs non enzymatiques

Ce type des antioxydants est constitué des micronutriments alimentaires comprenant la vitamine A, la vitamine C (acide ascorbique) et la vitamine E (tocophérol et tocotriénol). Ils agissent comme une barrière contre les radicaux libres et les oxydants non radicaux et empêchent l'agression de l'ADN, des protéines, des lipides et d'autres molécules induites par les oxydants (**Ali et al., 2020**).

Le glutathion ou γ -glutamylcystéinyglycine est le principal antioxydant non enzymatique, impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires. C'est un tripeptide omniprésent qui régule l'homéostasie redox intracellulaire, il est présent sous forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG) (**Ali et al., 2020**).

II.3.2. Capacité de chélation des ions métalliques

Des chélateurs, en particulier l'acide éthylène diamine tétra- acétique (EDTA), l'acide batho-phénanthroline disulfonique (BPS), la pénicillamine et la desferrioxamine, ont été rapportés pour capturer les ions métalliques principalement les ions ferriques (Fe^{+2}) et cuivriques (Cu^{+2}) et donc, d'empêcher la catalysation de l'oxydation (**Wang et al., 2017**).

II.3.3. Métabolites antioxydants

Les preuves scientifiques ont démontré que les probiotiques sont capable de produire divers métabolites ayant une activité antioxydante, tels que le glutathion (GSH), le butyrate (acide gras à chaîne courte), et le folate qui est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques (l'efficacité de la réplication, de la réparation et de la méthylation de l'ADN est affectée par la disponibilité de folate) (**Endo et al., 2013 ; Wang et al., 2017**).

II.3.4. Régulation du microbiote intestinal

Les espèces probiotiques (*Lactobacillus* et *Bifidobacterium*), peuvent réguler la composition du microbiote du tractus gastro-intestinale des humains et des animaux, par la production des acides organiques en particulier l'acide lactique, l'acide acétique et l'acide propionique. Cette production peut également provoquer un abaissement du pH intestinal, ce qui peut contribuer à diminuer le stress oxydatif, et la prolifération des bactéries pathogènes afin de maintenir l'équilibre de la flore intestinale (**Wang et al., 2017**).

II.4. Aliments transmetteurs et protecteurs des probiotiques

Les matrices alimentaires qui véhiculent les probiotiques au corps humain, fournissent une protection au cours de leur passage dans le tractus gastro-intestinale. Ils constituent une large gamme, dont les principales véhicules sont illustrés dans la **figure 4** (**Bove et al., 2013 ; Perricone et al., 2015**).

En effet, les produits d'origines végétales sont des matrices idéales pour les probiotiques en raison de la présence de minéraux, de vitamines, de sucres, d'antioxydants ainsi que des fibres alimentaires, ce qui favorise la croissance et l'activité des souches. De plus, ils permettent aussi d'éviter des problèmes de santé croissants (intolérance au lactose, allergie aux protéines du lait... etc) liés à la consommation des véhicules alimentaires laitiers (**Karassu et al., 2010 ; Soccol et al., 2010 ; Kumar et al., 2015**).

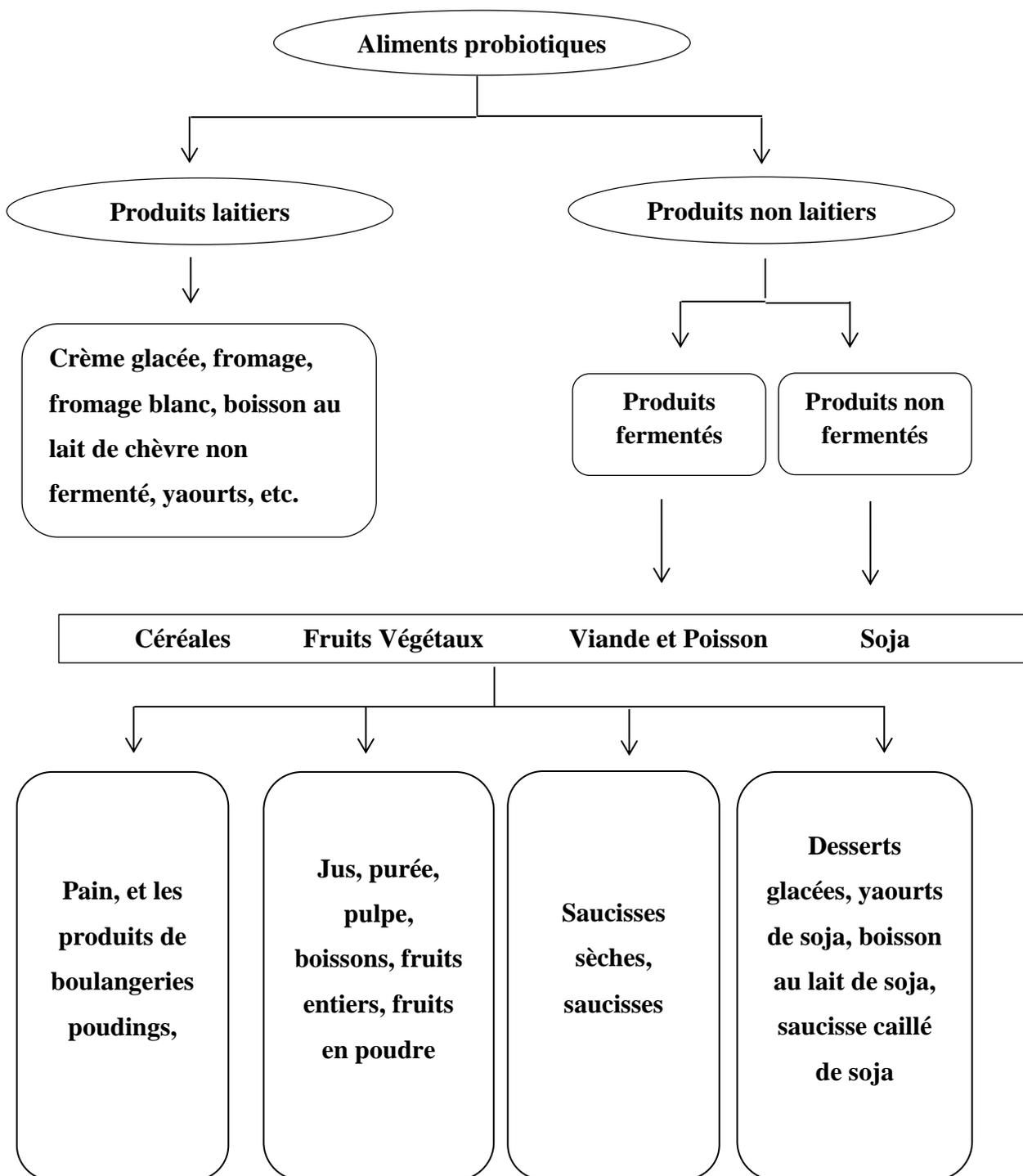


Figure 4. Classification et types d'aliments probiotiques (Kumar *et al.*, 2015).

Les produits probiotiques à base de fruits sont fabriqués à partir d'ananas, de fraise, de citron vert, de mangue, et d'orange, etc (Panghal *et al.*, 2018). En outre, les jus (de fruits/légumes) restent très peu de temps dans l'estomac et donc, les souches peuvent être utilisées comme probiotique dans ces matrices, du fait qu'elles passent moins de temps dans l'environnement acide, ce qui maximise les chances de viabilité de ces derniers (Kumar *et al.*, 2015 ; Ranadheera *et al.*, 2017).

II.5. Polyphénols de la fraise comme antioxydants

Dans le règne des végétaux, la fraise (*Fragaria × ananassa* Duch) représente une source pertinente de composés bioactifs en raison de sa teneur élevée en vitamine C, A et E, folate, caroténoïdes ainsi que, des flavonoïdes (les anthocyanines) et en flavonols tels que la fisétine, la quercétine et les glucosides (Henning *et al.*, 2010 ; Basu *et al.*, 2014).

En général, ce fruit contient également divers acides phénoliques qui sont définis comme un groupe complexe et très varié de substances naturelles, qui résultent des métabolites secondaires des plantes, ces composés peuvent être divisés en de nombreuses classes (Figure 5) en fonction du nombre et la présence d'anneaux phénoliques (Marin *et al.*, 2015 ; Adriouch *et al.*, 2017; Pathak *et al.*, 2018).

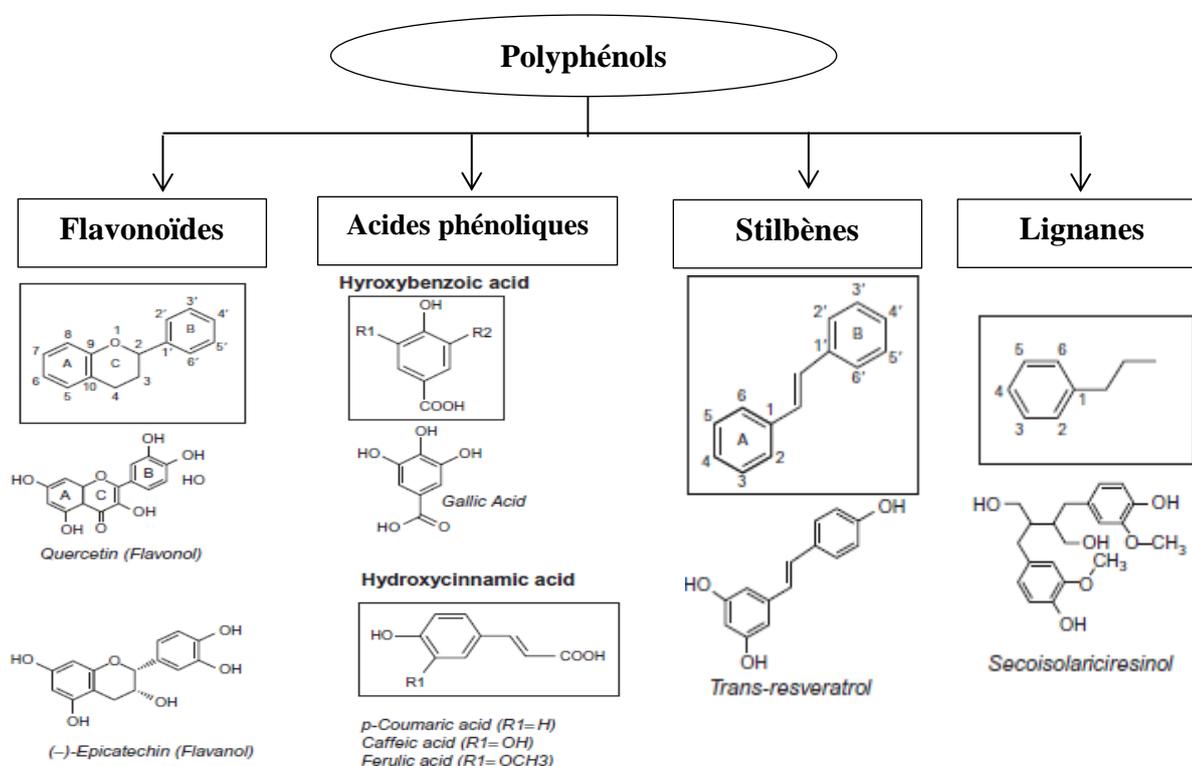


Figure 5. Différentes classes de composés polyphénoliques (Aravind *et al.*, 2021).

De nos jours, les polyphénols possèdent de nombreuses propriétés sur l'organisme humain, notamment, des activités antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anticancéreuses. L'une des premières propriétés reconnue est l'activité antioxydante qui joue un rôle important dans la prévention des dommages cellulaires liés au stress oxydatif, parmi les mécanismes d'action des composés phénoliques impliqués, on peut citer (Kaur *et al.*, 2001 ; Tripoli *et al.*, 2007 ; Erlank *et al.*, 2011 ; Marin *et al.*, 2015 ; Kawabata *et al.*, 2019) :

- ✓ Piégeage directe de divers radicaux libres et chélation des cofacteurs d'oxydation des acides gras comme certains métaux grâce à leur structure chimique afin de former des chélates avec les ions métalliques comme le fer ou le cuivre en remplaçant un ou deux protons du polyphénol par ces ions ;
- ✓ Inhibition de la lipopéroxidation qui pourrait jouer un rôle dans la prévention de l'athérosclérose ainsi que les maladies cardiovasculaires, grâce à la diminution de l'oxydation de taux des lipoprotéines sanguins (HDL ou LDL) ;
- ✓ Activation de gènes antioxydants tels que Nrf 2, qui génèrent une expression accrue d'enzymes antioxydantes telles que la GPx, SOD et la CAT ;
- ✓ Absorption des rayons ultra-violet (UV) : la naringénine et la rutine ont un effet protecteur contre les UV, en empêchant ainsi la surproduction des RL.

II.6. Interaction entre les bactéries et les polyphénols

L'attention des chercheurs a été attirée par le fait que, par leur nature même, les composés à fonction phénolique présentent un certain nombre des interactions réciproques principalement avec le microbiote intestinal :

II.6.1. Métabolisme des polyphénols par la microflore intestinale :

Bien qu'ils soient ingérés, les composés phénoliques subissent à un métabolisme complexe, en interagissent avec divers enzymes humaines et microbiennes (**Figure 6**). En effet, cette métabolisation pourrait être accomplie par différentes réactions, telles que la déconjugaison, la déshydroxylation, déshydrogénation, décarboxylation, dépolymérisation, déglycosylation, déméthylation, ce qui conduit à la production d'un grand nombre de métabolites de polyphénols et de produits cataboliques circulants et excrétés (**Hervert-Hernandez et Goñi, 2011 ; Gowd et al., 2019 ; Aravind et al., 2021**).

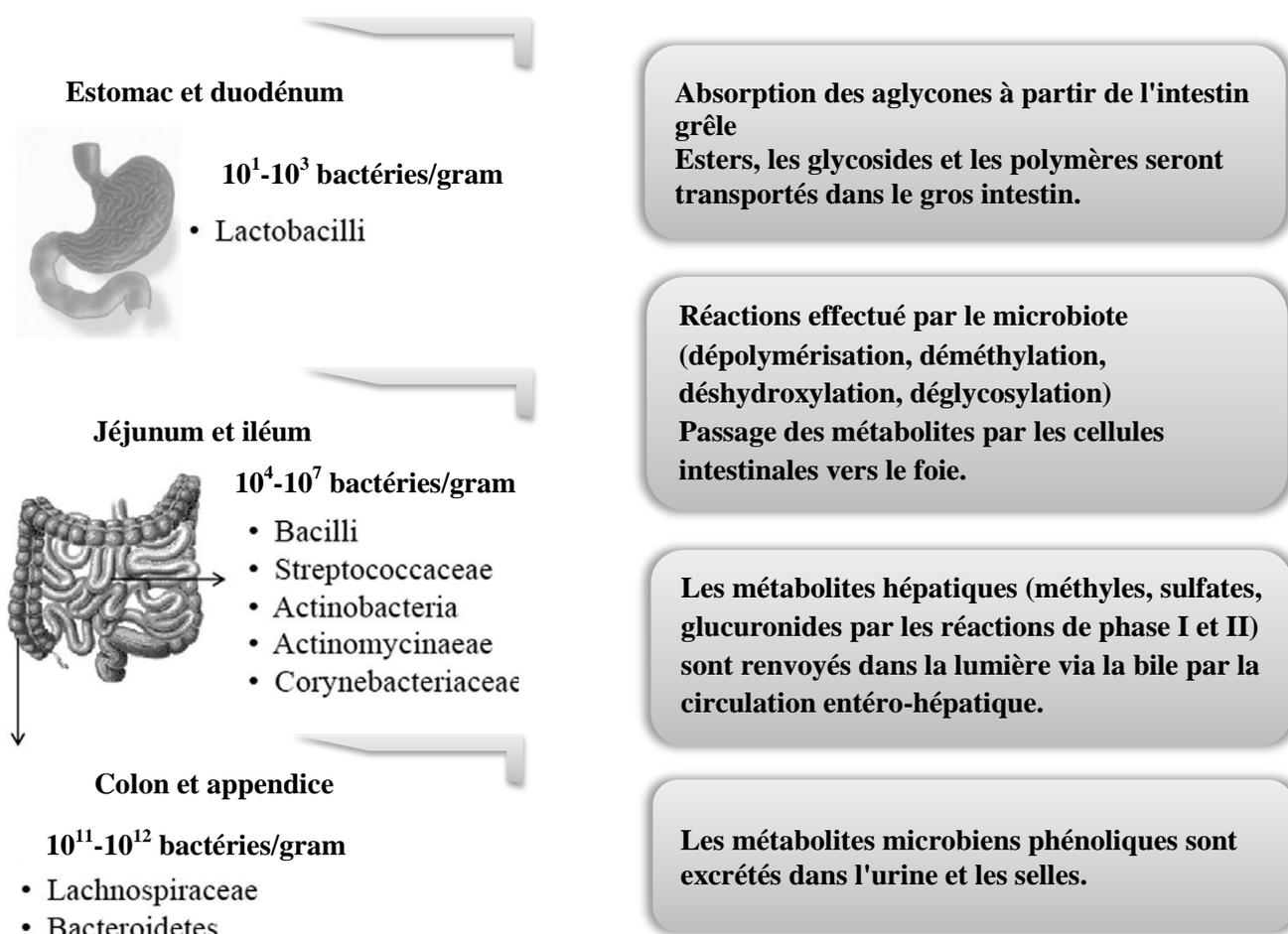
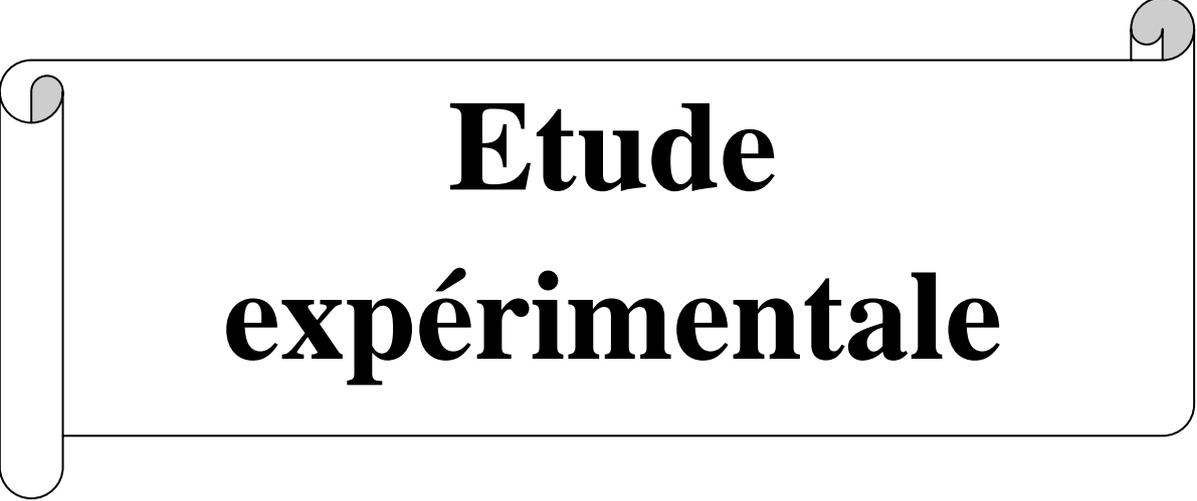


Figure 6. Métabolisme microbien des composés phénoliques dans le système gastro-intestinal (Pathak *et al.*, 2018).

II.6.2. Modulation du microbiote intestinale

La biodisponibilité des polyphénols et leurs métabolites peuvent influencer et induire une modulation de la composition du microbiote intestinal. A cet égard, les polyphénols peuvent exercer des effets positifs d'une part en inhibant les bactéries pathogènes, d'autre part un nombre croissant de preuves scientifiques suggèrent que les polyphénols peuvent agir en tant que prébiotiques et donc, stimulant les bactéries bénéfiques plus particulièrement les lactobacilles, et améliorant les interactions entre l'hôte et les microorganismes (Aravind *et al.*, 2021). Récemment, des études de Sun et ses collaborateurs (2018) ont démontré que les polyphénols influencent le microbiote intestinal via l'augmentation de la croissance des *Bifidobacterium* et *Lactobacillus. spp*, en revanche, ces chercheurs ont trouvé aussi que la catéchine inhibe significativement la croissance de *Clostridium histolyticum*, alors qu'elle stimule de manière significative la croissance de *Clostridium coccoides* et *Eubacteriumrectale*.

En outre, l'effet stimulant des composés phénoliques est démontré dans la capacité de certains microorganismes à utiliser les polyphénols comme substrats tels que les souches de *L. plantarum* qui sont capables de dégrader l'acide tannique et obtenir de l'énergie. Le mécanisme proposé est que ce dernier est hydrolysé en acide gallique et en glucose et l'acide gallique formé est ensuite décarboxylé en pyrogallol par l'action d'enzymes tannase et décarboxylase gallate (**Hervert-Hernandez et al., 2018 ; Rastmanesh, 2011 ; Wang et al., 2017 ; Gowd et al., 2019 ; Aravind et al., 2021**).



**Etude
expérimentale**

L'ensemble de notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, durant la période Avril- juin 2021.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique : Le matériel biologique utilisé pour effectuer ce travail est le suivant :

✓ **Souches bactériennes :** il s'agit de deux bactéries lactiques fournies par M^r. Khennouf, *Lactiplantibacillus plantarum* codée S10 isolée du rumen de chèvre de race locale et *Lactiplantibacillus plantarum* codée BCX1, cette dernière a été isolé du beurre de chèvre. De mêmes, trois souches à Gram⁺ et à Gram⁻ à savoir *Staphylococcus aureus* ATCC 29522(A), *Escherichia coli* ATCC 3569, et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2753 ont été utilisées au cours de cette étude pour effectuer le test de la co-agrégation avec les souches lactiques *in vitro*.

✓ **Matrice végétale :** Un fruit, la fraise a été achetée du marché. Elle a servi pour la préparation de l'extrait et du jus.

✓ **Les cellules épithéliales intestinales :** Les cellules épithéliales du poulet (*Gallus gallus*) ont été préparées au niveau du laboratoire et elles ont servi pour étudier la capacité d'adhésion *in vitro* de nos souches lactiques.

✓ **Les enzymes :** Les enzymes suivantes ont été utilisées au cours de cette étude, il s'agit de la pepsine (2000U/ml), d' α -amylase (75U/ml) et de la pancréatine (100U/ml).

II.1.2. Appareillage et produits

L'ensemble du matériel utilisé lors de notre étude est le suivant :

- ❖ Centrifugeuse ;
- ❖ Spectrophotomètre UV ;
- ❖ Vortex Genius 3 – IKA ;
- ❖ Bec Bunsen ;
- ❖ Autoclave (Slli AVX électrique), Four pasteur (Mettler), Etuve (Mettler) ;
- ❖ pH mètre (HANNA) ;
- ❖ Balance électronique (Kern EMB 600-2), Balance analytique ;
- ❖ Agitateur magnétique chauffant (Heidolph MR 3002), Vortex (VWR) ;
- ❖ Microscope à caméra, microscope optique.

Les produits chimiques et réactifs utilisés lors de notre étude se résument en :

- ❖ Ethanol ;

- ❖ Carbonate de sodium (Na_2CO_3) ;
- ❖ Folin-Ciocalteu ;
- ❖ Chlorure d'aluminium (AlCl_3) ;
- ❖ Tampon phosphate ;
- ❖ Acide trichloro-acétique (TCA) ;
- ❖ Eau distillée ;
- ❖ DPPH ;
- ❖ Acide ascorbique, acide gallique ;
- ❖ Peroxyde d'hydrogène ;
- ❖ Phénanthroline.

II.2.Méthodes

II.2.1. Revivification des souches et standardisation de l'inoculum

Cette étape consiste à relancer et cultiver les deux souches lactiques de *Lactiplantibacillus plantarum* (S10 et BCX1) dans le bouillon Man- Rogosa et Sharp (MRS), puis les incubées à 37°C pendant 24h.

La revivification sera suivie par une vérification de la pureté des souches par la réalisation d'un ensemencement par strie sur la gélose MRS à partir des tubes ou la pastille blanche et le trouble ont été apparus. En vue de confirmer cette pureté, une observation macroscopique (aspect des colonies) et microscopique (coloration de Gram) ont été faites après une incubation à 37°C pendant 24h (**Wang et al., 2021**).

Pour la fiabilité de chaque test, la connaissance de la charge de l'inoculum reste primordiale, pour cela, nous avons appliqué la même technique, avec les mêmes conditions et le même milieu de culture pour la standardisation de l'inoculum de chaque souche : un volume de 1ml de la culture bactérienne a été inoculé dans 10 ml de bouillon MRS, puis incubé à 37°C pendant 24 h ; au terme d'incubation, la DO de la culture a été ajustée à 0.7 (620 nm) puis des dilutions décimales ont été réalisées dans l'eau physiologique stérile jusqu'à 10^{-9} . La gélose MRS a été ensemencée à partir des dilutions 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} et le dénombrement a été effectué après une incubation à 37°C pendant 24/48h. Le nombre de cellules vivantes par ml de culture est exprimé en UFC/ml selon la formule suivante (**Wang et al., 2021**) :

$$\text{Nombre UFC/ml} = \Sigma C / V (n_1 + 0.1n_2) d$$

C : Nombre de colonies sur boîtes de chaque dilution retenue ;
V : Volume de la suspension bactérienne déposée sur boîte (ml) ;
 n_1 : Nombre de boîtes correspondant à la plus faible dilution ;
 n_2 : Nombre de boîtes correspondant à la plus forte dilution ;
d : Correspond à la plus faible dilution.

II.2.2. Evaluation de quelques aptitudes probiotique des souches *in vitro*

Cette partie consiste à évaluer la pharmacocinétique de *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 *in vitro* dans des conditions similaires à celles du transit digestif (acidité, sels biliaires) et d'étudier quelques propriétés probiotiques (capacité d'adhésion, capacité d'auto-agrégation et co-agrégation).

II.2.2.1. Résistance aux pH gastrique

Afin d'évaluer la capacité de chaque souche à survivre dans un milieu acide, nous avons opté pour le protocole modifié décrit par **Riane et al. (2019)**. En bref, 0.5ml d'une culture jeune de *L. plantarum* S10 et BCX1 a été introduit séparément dans 5 ml de bouillon MRS déjà ajusté à pH 2, pH 3 et pH 4. Ensuite, la densité optique a été mesurée à 620 nm après 2h d'incubation à 37°C.

Le pourcentage de survie a été calculé par la comparaison des valeurs de la DO de la culture dans le bouillon MRS aux différents pH :

$$\% \text{ de survie} = (\text{DO}_{\text{MRS pH acide}^*} / \text{DO}_{\text{MRS pH 5.8}}) \times 100$$

Avec : pH acide*: pH2, pH3 et pH4

II.2.2.2. Résistance aux sels biliaires

Pour connaître la capacité des deux souches *Lactiplantibacillus plantarum* S10 et *Lactiplantibacillus plantarum* BCX1 à croître en présence des sels biliaires, nous avons utilisé la méthode décrite par **Riane et al. (2019)** avec des modifications mineures. Avant la réalisation de ce test, une étape de récupération de culot bactérien a été effectuée par une centrifugation à 5000 rpm/10min de la culture jeune, suivie de deux lavages par le PBS, le culot bactérien final est suspendu dans un volume du même tampon (PBS), puis un volume de 1 ml des cellules bactériennes préparées est mis dans deux tubes à essais contenant 6 ml du PBS, le premier additionné de 0.3 % de sels biliaires, et le deuxième sans sels (témoin), le tout est incubé à 37°C pendant 4h.

La résistance de la souche aux sels biliaires a été estimée par une mesure de la densité optique à 620 nm, et le taux de la survie a été déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ de survie} = [\text{DO}_{\text{sels biliaires}} / \text{DO}_{\text{Témoin}}] \times 100$$

II.2.2.3. Hydrophobicité des surfaces cellulaires

L'évaluation de l'hydrophobicité de chaque souche a été faite selon la méthode décrite par **Bouridane et al. (2016)**. Le culot bactérien d'une culture de 18h a été récupéré par centrifugation à 12000 rpm /15min suivi par deux lavages successifs puis remis en suspension dans 1.2 ml de tampon phosphate magnésium (pH 7.0). Les cellules sont ensuite ajustées à une densité optique approximativement à 0.7 (DO_{initiale}).

Ensuite 0.6 ml du xylène, chloroforme, toluène et éthyle d'acétate a été ajouté doucement à 3 ml de la suspension bactérienne. Ce mélange a été incubé 10 min à 37°C après agité en utilisant un vortex pendant 2 min, après 15 min d'incubation à température ambiante, la densité optique de la phase aqueuse a été mesurée à 450 nm.

L'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) est calculé par l'équation suivante :

$$\text{H}\% = [(\text{DO}_{\text{initiale}} - \text{DO}_{\text{finale}}) / \text{DO}_{\text{initiale}}] \times 100$$

II.2.2.4. Test d'auto-agrégation et de co-agrégation

L'auto-agrégation a été évaluée selon la technique utilisée par **Beldarrain-Iznaga et al. (2021)** avec des modifications mineures. Brièvement, *Lactiplantibacillus plantarum* S10 et *Lactiplantibacillus plantarum* BCX1 ont été cultivées dans un bouillon MRS. Après une période d'incubation à 37 °C pendant 18h, le culot bactérien a été récupéré par une centrifugation (5000 rpm/ 15 min), lavées deux fois avec du tampon PBS (pH 7.2) et remis en suspension dans 4 ml du même tampon ; une agitation de 10 secondes a été procédée et l'absorbance de la suspension initiale a été mesuré (A₀). Après une incubation à 37°C pendant 3h, l'absorbance a été déterminée à une longueur d'onde de 620nm.

Le pourcentage d'auto-agrégation a été exprimé en fonction du temps, en utilisant la formule suivante :

$$\text{Auto-aggrégation (\%)} = (\text{Abs}_0 - \text{Abs}_t / \text{Abs}_0)$$

Avec :

Abs_t : DO à t heure d'incubation ; Abs₀ : DO à t₀.

Pour la co-agrégation, la suspension cellulaire des souches a été préparée de la même manière que le test d'auto-agrégation. Un volume égal de *L. plantarum* (S10 ou BCX1) et de la souche test (2 ml) a été mélangé pendant 10 secondes par un vortex suivi d'une incubation à 37°C sous agitation pendant 3h. L'absorbance du mélange (A_{mix}) a été mesurée à 620 nm après 3h d'incubation.

La préparation des cultures pathogènes (*Escherichia coli* ATCC 3569, de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC2753(C) et de *Staphylococcus aureus* ATCC29522 (A)) a été effectuée comme suite : un tube du bouillon nutritif a étéensemencé par une colonie de chaque espèce et le tout a été incubé à 37°C pendant 24h (pour chaque souche). Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 5000rpm/15min, lavées deux fois avec PBS et leurs absorbance à 620 nm a été ajustée à 0.7 (Sui *et al.* 2021). Le pourcentage de co-agrégation a été déterminé comme suit :

$$\text{Co-agrégation \%} = [(A_{Lactobacillus} + A_{pathogène}) - A_{mix}] / [(A_{Lactobacillus} + A_{pathogène})] \times 100$$

II.2.2.5. Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales

Ce test a été réalisé dans le but d'évaluer la capacité de la souche d'adhérer aux cellules épithéliales. La méthode décrite par Lin *et al.* (2007) avec des modifications, a été appliquée selon les étapes suivantes :

- **Préparation de cellules épithéliales** : Un segment de l'ilium du poulet a été bien lavé par le PBS (pH7.2), placé dans un bain du même tampon et soumis à une réfrigération à 4°C pendant 30 min. Les cellules sont par la suite récupérées en grattant la surface tapissant l'intestin par une lame stérile, des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10^{-4} , cette suspension cellulaire a été examinée sous microscope pour s'assurer qu'elle n'est pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales est approximativement de 5×10^4 cellules/ml.
- **Préparation des cellules bactériennes** : Le culot bactérien d'une culture de 18h a été récolté par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 min ; suivi par deux lavages par le PBS, le culot a été repris dans 2ml de même tampon suivis d'une observation microscopique (Gx100) pour confirmer que le nombre est approximativement de 10^8 cellules/ml.
- **Réalisation de test** : 1 ml de la culture bactérienne a été mélangé avec 1 ml de la dilution 10^{-4} de la suspension des cellules épithéliales déjà préparées. Suivie par une incubation à 37°C pendant 45 min ; un frottis coloré avec le cristal violet 0.1% pendant 5 min a été réalisé. L'adhésion est évaluée par examen au microscope optique à caméra (Gx100). Le test est considéré positif si le nombre de cellules adhérentes est supérieur à 15.

II.2.3. Détermination de l'activité antioxydante des souches *in vitro*

L'activité antioxydante des souches probiotiques est évaluée par le test du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), du radical libre 2, 2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) et l'estimation de pouvoir réducteur.

II.2.3.1. Résistance à la toxicité du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ Scavenging Activity)

La technique décrite par **Li et al. (2012)** a été appliquée avec des modifications mineures. Une culture d'une nuit (*Lactiplantibacillus plantarum* S10 et *Lactiplantibacillus plantarum* BCX1) a étéensemencé à raison de 1% (V/V), dans le bouillon MRS contenant 0.4, 0.7 et 1.0 mM de peroxyde d'hydrogène, un témoin a été préparé dans les mêmes conditions. L'ensemble des tubes a été incubé à 37°C pendant 6 h. La croissance cellulaire a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 620 nm.

II.2.3.2. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre utilisé expérimentalement pour remplacer les radicaux libres produits par les cellules en réponse à des stress internes ou externes. En effet, les antioxydants sont responsables de la réduction de ce radical qui se traduit par l'apparition d'une couleur jaune (forme réduite). Ce virage et leur intensité découle, de la nature, de la concentration et de la puissance des principes actifs présents (**Zheng et al., 2017**).

La technique commence par la préparation de la suspension bactérienne et son surnageant. Cette étape consiste à faire une centrifugation (6000rpm, 10min, culture de 18h) pour la récupération des cellules bactériennes et leurs surnageants. Pour cela, le culot cellulaire a été lavé deux fois et repris en suspension dans le Tampon Phosphate Salin (PBS), avec un ajustement de l'absorbance à 0,8 (environ 10⁸ UFC/ml) (**Das et Goyal et al., 2015**).

Pour la réalisation de test : La capacité de piégeage des radicaux libres des souches *L. plantarum* S10 et BCX1 a été étudiée selon la méthode proposée en **2021** par **Wang** et ses collaborateurs avec des modifications mineures. Pour chaque 500µl de chaque préparation bactérienne (ou surnageant), 3 ml d'une solution fraîchement préparée de 2,2-diphényl-2-picrylehydrate de hydrazyl (DPPH) (0.05 mM) a été ajouté et incubé en obscurité pendant 30 min.

L'absorbance a été mesurée à 517nm, et le pourcentage d'activité de piégeage des radicaux a été calculé selon l'équation :

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [1 - (A_E - A_B) / A_C] \times 100$$

Avec :

A_E : Absorbance de l'échantillon ;

A_B : Absorbance du blanc ;

A_C : Absorbance du contrôle.

II.2.3.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles

La suspension bactérienne et son surnageant ont été préparés selon la méthode déjà décrite en **II.2.3.2.** L'essai de piégeage des radicaux hydroxyles des souches testées a été évalué par la méthode décrite par **Mu et al. (2018)**. Brièvement, à un mélange de réaction contenant 1 ml de phénanthroline (0.75mM), 1 ml de $FeSO_4$ (0.75 mM), 1ml d' H_2O_2 (0.01%) et 1.5 ml du PBS (0.15M), 1ml de chaque préparation (suspension bactérienne, surnageant) a été ajouté et l'absorbance a été mesurée à 536 nm après 30min d'incubation à 37°C.

L'activité de piégeage des radicaux hydroxyles est exprimée par la formule suivante :

$$\text{Hydroxyl radical scavenging ability (\%)} = [(A_s - A_0) / (A - A_0)] \times 100$$

Avec :

A_s : Absorbance d'échantillon ;

A_0 : Absorbance du témoin ;

A : Absorbance du blanc.

II.2.4. Préparation de l'extrait à partir de pulpe de fraise, dosage de deux principes actifs et activité antioxydante

Pour extraire les composés bioactifs de la fraise, nous avons opté pour le protocole décrit par **Zlotek et al. (2016)**. Un volume de 15 ml de méthanol est additionné à 5 g de la pulpe dans un Erlenmeyer (extraction par macération). Ensuite, l'ensemble est placé sur un agitateur magnétique multipostes avec agitation à l'obscurité pendant 1h ; ce qui empêche l'oxydation des polyphénols. Après une centrifugation (5000rpm, 20min), le surnageant contenant les composés est récupéré. Nous procédons à une deuxième extraction identique sur le culot pour extraire 30% de composés (polyphénols) supplémentaires et donc obtenir un dosage plus exhaustif. Les surnageants sont mélangés avec 5ml de méthanol et stockés à 4°C jusqu'à utilisation.

Une fois avoir l'extrait, nous avons dosé les polyphénols totaux et les flavonoïdes.

II.2.4.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

La teneur des polyphénols totaux a été déterminée en suivant le protocole appliqué en 2016 par **Jablonska-Rys** et ses collaborateurs. Brièvement, dans des tubes à hémolyse en verre contenant un volume de 200 µl d'extrait de la fraise, 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois a été ajouté. Après 5 min de repos, chaque tube reçoit 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (7.5%). Les tubes sont agités et incubés à température ambiante à l'obscurité pendant 1h et l'absorbance est lue à 765 nm.

La teneur en composés phénoliques de l'extrait a été déterminée graphiquement par régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Annexe 7**).

II.2.4.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été réalisée par un dosage colorimétrique basé sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (**Ali-Rachedi et al., 2018**).

La teneur en flavonoïdes de l'extrait a été déterminée selon la méthode décrite par **Benhamada et Idoui (2020)**, qui consiste à mélanger 1 ml d'extrait et 1 ml de chlorure d'aluminium à 2%, le tout a été incubé pendant 10 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Après cette période d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 430nm. Cette teneur a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage établie avec de la quercétine (**Annexe 8**).

II.2.4.3. Détermination de l'activité antioxydante de l'extrait

a. Piégeage du radical libre DPPH

L'activité anti-radicalaire de l'extrait de fraise a été déterminée en utilisant la méthode décrite par **Prabha et Vasantha (2011)**. Pour se faire, un volume de 500 µl d'extrait a été ajouté à 5ml d'une solution éthanolique fraîchement préparée du 2,2-diphényl-2-picryle hydrate de hydrazyl (DPPH) (0.02mM), le mélange a subi une incubation pendant 30 min à l'obscurité à température ambiante, et l'absorbance a été mesurée en triples à 517 nm, contre un blanc contenant uniquement le DPPH et l'éthanol et un contrôle qui a été réalisé en remplaçant l'extrait par le trolox comme un antioxydant de référence.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre de DPPH est calculé selon l'équation :

$$I\% = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}] \times 100$$

b. Réduction de fer (FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power)

Le protocole expérimental suivi est celui décrit par **Bentabet *et al.* (2014)**. Dans des tubes à essai, un volume de 1ml de l'extrait a été mélangé avec 2.5 ml d'une solution tampon phosphate à 0.2mol/L (pH 6.6) et 2.5 ml de Ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1%. L'ensemble a été incubé au bain marie à 50°C pendant 30 min, ensuite, 2.5 ml de l'acide trichloracétique ($C_2HCl_3O_2$) à 10% ont été additionnés pour stopper la réaction. Le tout a été centrifugé à 3000rpm/min pendant 10 min. A la fin, 2.5 ml du surnageant a été combiné avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de chlorure ferrique ($FeCl_3, 6H_2O$) à 0.1%.

La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 700 nm contre un blanc contenant les mêmes quantités de réactifs en remplaçant l'extrait par le méthanol et en utilisant l'acide ascorbique comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires (**Annexe 9**).

II.2.5. Préparation de jus de fraise lactofermenté et suivi de quelques paramètres de fermentation

II.2.5. 1. Préparation de jus de fraise lactofermenté

Un poids de 500g de fraise a été soigneusement lavé avec l'eau distillée et coupé en petite morceaux, puis broyé et mixé (Mixeur Moulinex). Ensuite un volume de 500 ml d'eau stérile a été additionné, suivi d'une centrifugation (3000 rpm /15 min) afin de clarifier le jus. Ce dernier a été récupéré dans des flacons stériles et l'ensemble a subi une stérilisation dans un bain Marie à 95°C pendant 20 min (**Güney et Güngörmüşler, 2021**).

Pour la fermentation de ce jus, la méthode utilisée dans notre expérience est celle décrite par **Breidt et Caldwell (2011)**. Chaque flacon de jus de fraise déjà préparé a subi un ensemencement à raison de 5% par les deux souches *L. plantarum* S10 et BCX1, et la fermentation a été lancée dans l'agitateur incubateur (**Memmert**) à 37°C pendant 24h (**Figure 7**).

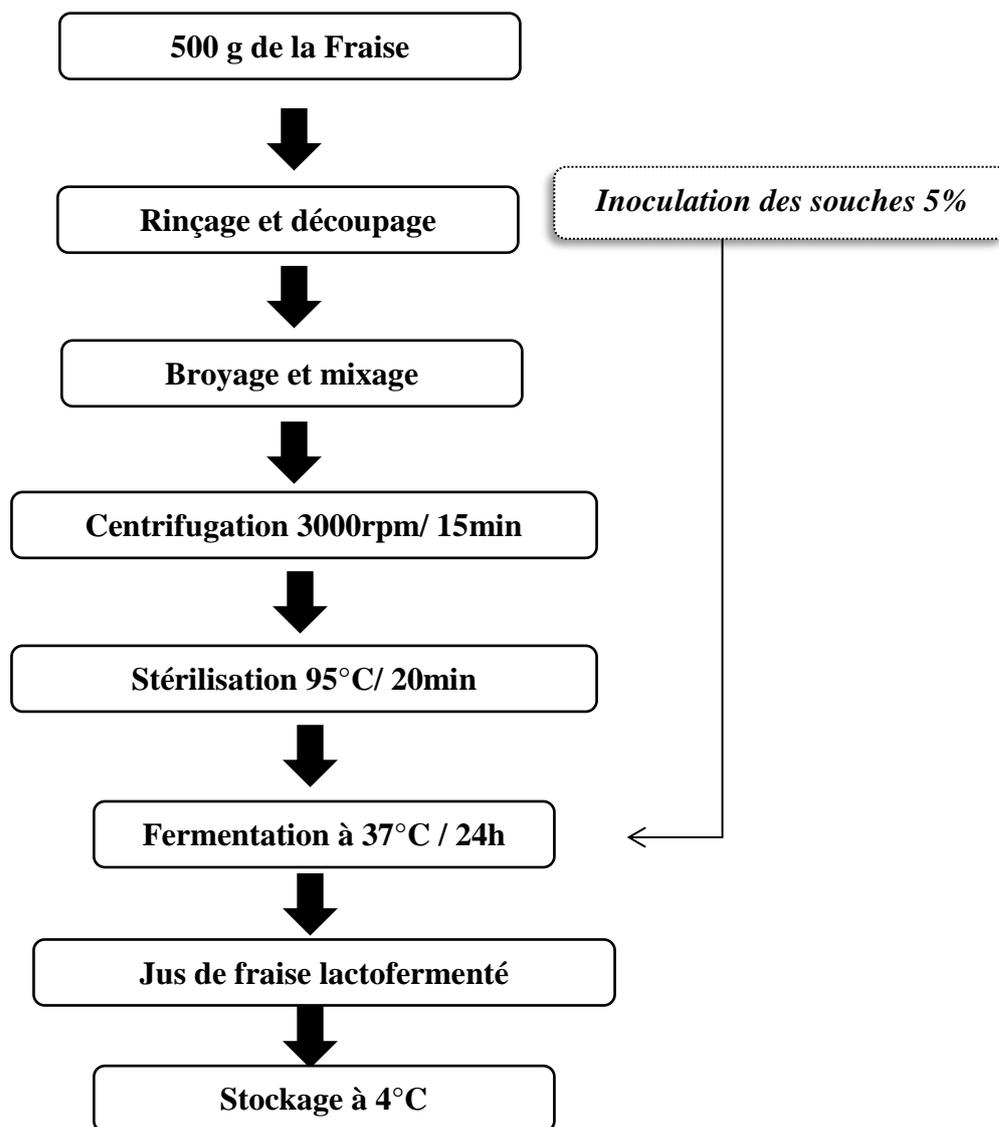


Figure 7. Diagramme de la préparation de jus de fraise lactofermenté (Breidt et Caldwell, 2011).

II.2.5. 2. Evaluation de quelques paramètres de fermentation

Pour but d'avoir une idée générale sur l'évolution de la fermentation de notre jus, nous avons suivis trois paramètres principaux, cela lors de l'ensemencement à T_0 et après 24h de fermentation à 37°C .

Le pH a été mesuré en immergent directement l'électrode d'un pH mètre (HANNA) préalablement étalonné par l'eau distillée (pH 7) dans 20 ml des échantillons de jus, et la valeur affichée sur l'écran a été notée (Reddy *et al.*, 2015 ; Nadeem *et al.*, 2018).

L'acidité titrable totale a été déterminée par un titrage d'un volume de jus de 10 ml avec une solution du NaOH (0.1N), en présence de phénolphaléine, jusqu'à attendre un pH finale de 8.1 ± 0.1 . Les résultats de l'acidité ont été exprimés en équivalents d'acide citrique en appliquant la formule suivante (Kim, 2017) :

$$\text{Acide citrique \%} = \frac{[V_{\text{NaOH}} \times 0.1 \times 0.064]}{[V_{\text{échantillon}}]} \times 100$$

Pour le comptage des cellules viables, la méthode de numération sur milieu solide (gélose MRS) a été appliquée lors de la fermentation de jus de la fraise. Pour se faire, des dilutions décimales (jusqu'à 10^{-9}) ont été effectuées à partir d'un volume (1 ml) de jus lactofermenté. Une fois les dilutions prêtes, un ensemencement par étalement à partir des trois dilutions (10^{-7} , 10^{-8} et 10^{-9}) a été faite. Par la suite, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24/48h, et le dénombrement a été obtenu par application de l'équation suivante :

$$\text{Nombre UFC/ml} = \Sigma C / V (n_1 + 0.1n_2) d$$

C : Nombre de colonies sur boîtes de chaque dilution retenue ;

V : Volume de la suspension bactérienne déposée sur boîte (ml) ;

n_1 : Nombre de boîtes correspondant à la plus faible dilution ;

n_2 : Nombre de boîtes correspondant à la plus forte dilution ;

d : Correspond à la plus faible dilution.

II.2.6. Mesure des activités antioxydantes de la bactérie après 24heures de fermentation

Après 24 h de fermentation, l'activité antioxydante des cellules de *L. plantarum* S10 et BCX1 a été évaluée. Les mêmes tests de l'activité déjà décrits en **II.2.3.** ont été appliqués.

II.2.7. Effet de la digestion bucco-gastro-intestinale sur la viabilité de *L. plantarum in vitro*

II.2.7.1. Préparation des solutions mères des liquides simulés de la digestion

Cette étape consiste à préparer des solutions simulées à celles de la digestion (solution équivalente au liquide salivaire, liquide gastrique et solution du liquide intestinal). La composition des liquides est mentionnée dans le **tableau 3**. Les solutions préparées ont été autoclavées à 120°C pendant 15 min.

Tableau 3. Composition des solutions simulées de la digestion (**Minekus et al., 2014**).

	Solution mère ajouté pour préparer	Solution mère ajouté pour préparer	Solution mère ajouté pour préparer
	500 ml (LS)	500 ml (LG)	500 ml (LI)
KCl (0.5M)	15.1 ml	6.9 ml	6.8 ml
KH₂PO₄ (0.5M)	3.7 ml	0.9 ml	0.8 ml
NaHCO₃ (1M)	6.8 ml	12.5 ml	42.5 ml
NaCl (2M)	/	11,8 ml	9.6 ml
MgCl₂(H₂O)₆ (0.15M)	0.5 ml	0,4 ml	1.1 ml
NH₄ (CO₃)₂ (0.5M)	0.06 ml	0.5 ml	/
HCl (6M)	0.09 ml	1.3 ml	1.4 ml

LS : Liquide salivaire ; LG : Liquide gastrique ; LI : Liquide intestinal.

II.2.7.2. Protocole expérimental de la digestion bucco-gastro-intestinale *in vitro*

La réalisation de ce protocole porte sur l'application de la méthode préconisée par **Minekus et al. (2014)**, cette partie a pour objectif de tester ce qui est mentionné ci-dessous :

- La survie et la viabilité de la souche *L. plantarum* S10 seule ;
- La survie et la viabilité de la souche *L. plantarum* BCX1 seule ;
- L'effet de jus de fraise comme véhicule probiotique sur la survie et la viabilité des souches (S10 et BCX1) ;
- L'effet de combinaison de l'extrait de fraise avec la bactérie sur ses aptitudes de survie ;
- Bioaccecibilité des composés phénoliques des extraits et des jus bruts dans les mêmes conditions de digestion.

Le protocole de la digestion bucco-gastro-intestinale *in vitro* a été réalisé qui comporte trois parties clés :

❖ Digestion orale

Un volume de 10 ml de la suspension bactérienne a été mélangé avec 50 ml de liquide salivaire (α -amylase (75U/ml) / pH 7) et incubé 2 seconde à 37°C dans l'agitateur incubateur (**Memmert**). Après cette période, un aliquote de 25 ml a été récupéré afin de réaliser les tests (survie, aptitude probiotique, activité antioxydante).

❖ Digestion gastrique

Pour cette étape, 35 ml de la phase orale a été mélangé avec 35 ml de liquide gastrique (pepsine (2000U/ml)) dont le pH a été ajusté à 3 avec HCl (6M). Le mélange a été incubé sous agitation à 37°C pendant 2 heures. À la fin de la digestion gastrique, 25 ml a été prélevé pour la réalisation des différents tests cités ci-dessus.

❖ Digestion intestinale

Un volume de 45 ml de la phase gastrique a été dilué avec 45 ml de liquide intestinal où le pH a été ajusté à 7 avec NaOH (1M) et additionné de sels biliaires et de la pancréatine, suivi d'une incubation pendant 2 heures supplémentaires du mélange résultant. Après le temps de digestion, la phase intestinale a été récupérée afin de tester la survie et la viabilité des cellules ainsi que d'évaluer l'activité antioxydante (piégeage des radicaux hydroxyles, piégeage des radicaux libre de DPPH).

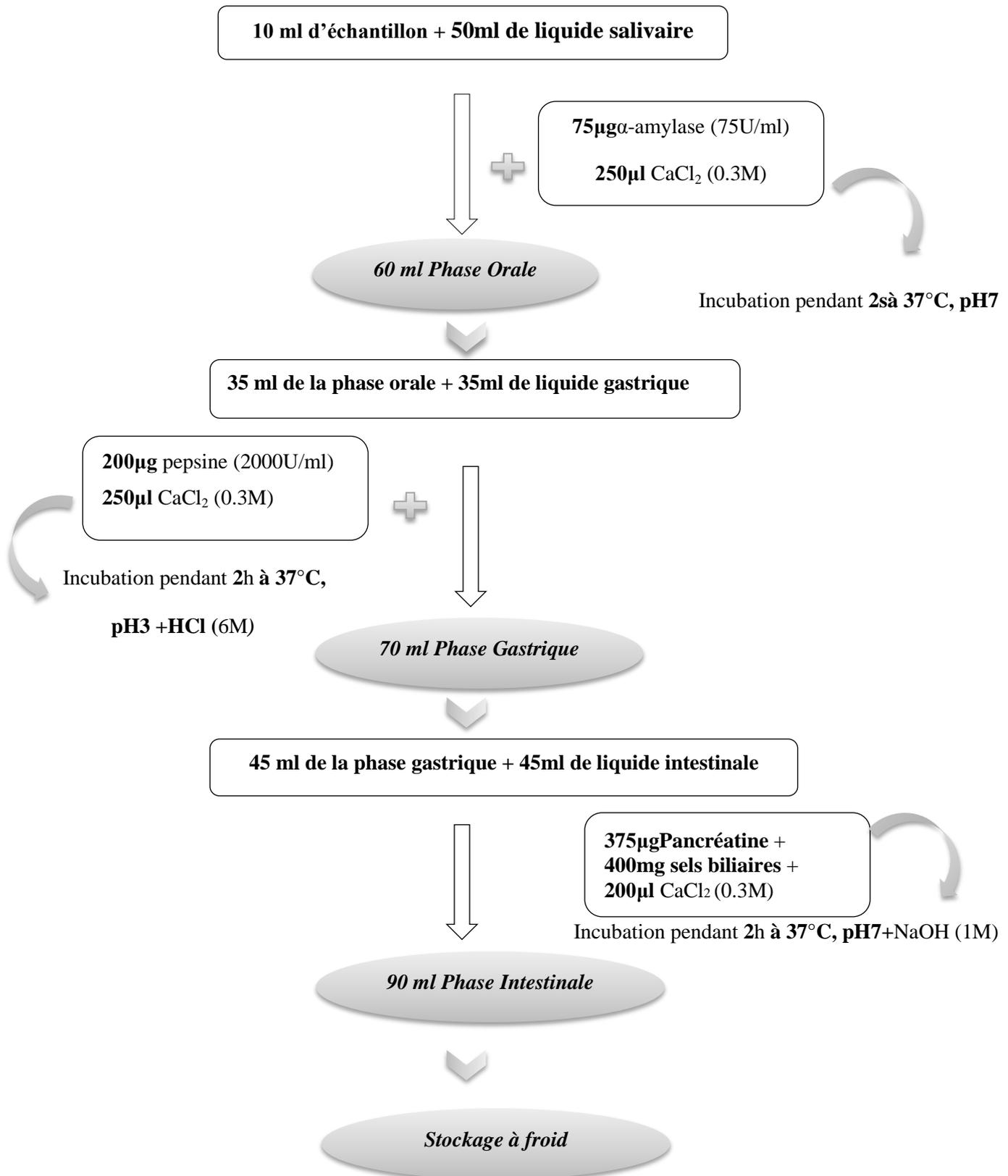


Figure 8. Schéma de la digestion bucco-gastro-intestinale *in vitro* (Minekus *et al.*, 2014).

II.2.8. Effet de la digestion sur la survie, l'activité antioxydante et les aptitudes probiotiques des souches *in vitro*

Nous avons appliqué les tests d'évaluation suivants selon les mêmes protocoles décrits-en **Partie II.2.2 ; II.2.3** :

- ✓ **Evaluation de la survie et la viabilité des cellules** : la détermination de la survie repose sur une comparaison du nombre de bactéries viables après chaque phase de digestion, avec le nombre initial. Cette étape a été effectuée par deux tests :
 - Mesure de la densité optique : chaque échantillon de chaque étage digestif a été soumis à une lecture spectrométrique à 620 nm ;
 - Comptage des cellules par dénombrement sur boîtes : l'échantillon prélevé de chaque étage (buccal, stomacal ou intestinal) a été bien homogénéisé et des dilutions en cascades ont été préparées. A partir de la dilution 10^{-9} de chaque étage digestif, un volume de 0.1 ml a été ensemencé par étalement sur des boîtes de pétri contenant la gélose MRS, suivi d'une incubation à 37°C pendant 24/48h.
- ✓ **Evaluation de l'activité antioxydante** : cette activité a été évaluée après la phase orale, gastrique et intestinale par l'application des mêmes tests déjà décrits en **II.2.3**.
- ✓ **Evaluation des aptitudes probiotiques des souches** : Après chaque phase digestif (buccale, gastrique, intestinale), les tests probiotiques déjà décrits précédemment (**partie II.2.2**) ont été appliqués.

II.2.9. Effet de la digestion sur la biodisponibilité des polyphénols et des flavonoïdes *in vitro*

Ce test a été réalisé sur les extraits et les jus bruts par le dosage des polyphénols et des flavonoïdes après chaque phase de digestion. Les mêmes méthodes décrites ont été appliquées (**Partie II.2.4.1 ; II.2.4.2.**)

II.2.10. Effet de la digestion sur la survie, l'activité antioxydante et les aptitudes probiotiques de *L. plantarum* S10 et BCX1 en présence de l'extrait et du jus de fraise *in vitro*

L'évaluation de l'effet d'une matrice alimentaire sur la survie, la viabilité, les aptitudes probiotiques ainsi que l'activité antioxydante de chaque bactérie après chaque phase de digestion, a été effectuée avec les mêmes protocoles déjà décrite en haut (**Partie II.2.2 ; II.2.3**).

Dans le même objectif, un dosage des polyphénols et des flavonoïdes après chaque phase de digestion a été réalisées avec usage des mêmes méthodes utilisés précédemment (**Partie II.2.4.1 ; II.2.4.2**).

II.2.11. Montage expérimental de la digestion *in vitro*

Un montage similaire à celui de tractus gastro-intestinal a été réalisé comprenant trois étage digestif chacun traduisant un compartiment (la bouche, l'estomac et l'intestin) (**Figure 9**). Chaque étage digestif reçoit le liquide préparé équivalent à celui trouvé naturellement dans les poches digestives (**Tableau 5**). Le protocole expérimental de la digestion *in vitro* déjà cité précédemment a été appliqué.

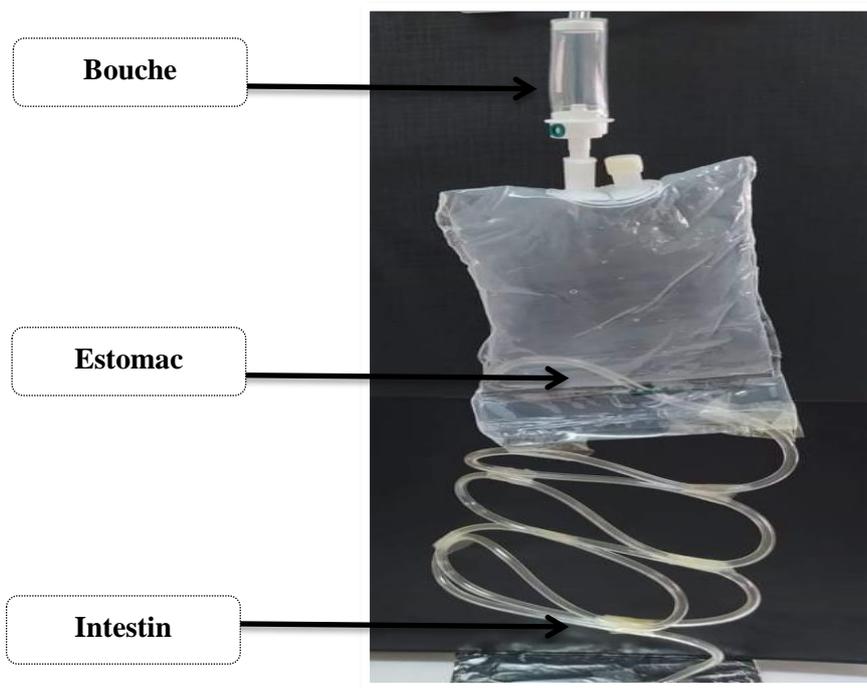


Figure 9. Montage expérimental de la digestion bucco-gastro-intestinale *in vitro*.

II.2.12. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats de différents paramètres (PPT, Flavonoïdes, DPPH et pouvoir réducteur) est faite pour des expériences réalisées au moins trois fois et de manière indépendante. Ces résultats sont présentés comme une moyenne \pm écart type, réalisés avec Microsoft Excel 2010.

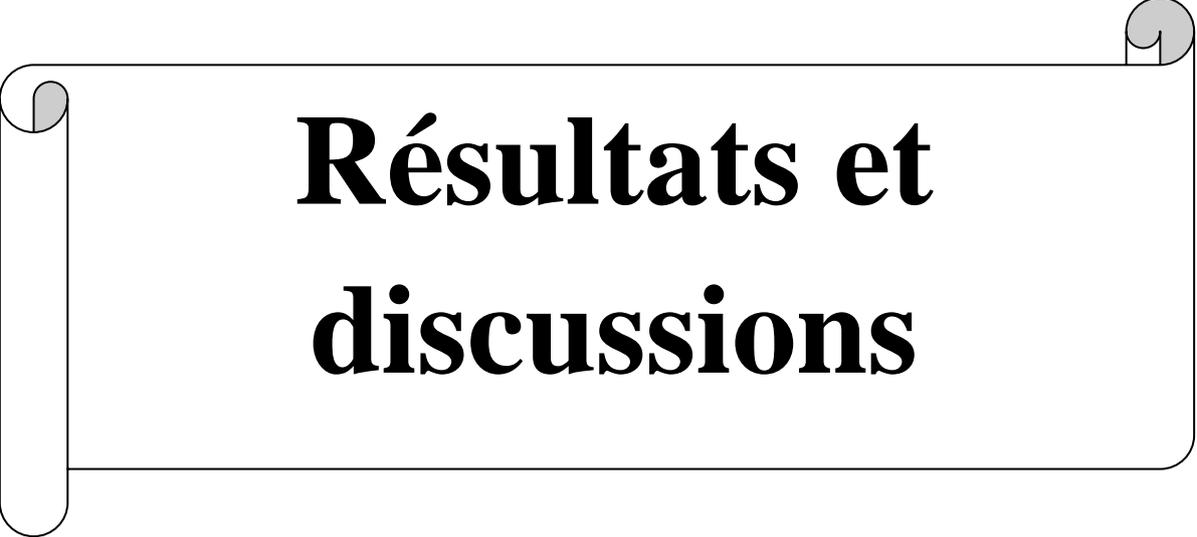
L'effet significatif a été évalué par le test de « Student » qui permet la comparaison des moyennes ; celui-ci a été effectué avec le logiciel « R.3.4.3 ». Les résultats sont jugés statistiquement différents avec un seuil de signification supérieur à 95% lorsque « $P < 0.05$ ».

($p > 0.05$) : effet non significatif (NS).

($p < 0.05$) : désigne effet significatif *.

($p < 0.01$) : désigne effet très significatif **.

($p < 0.001$) : désigne effet hautement significatif ***.



Résultats et discussions

III.1. Vérification de la pureté des souches

Les souches utilisées dans cette étude (*L. plantarum*) ont donné, sur gélose MRS, de petites colonies blanchâtres et crémeuses ayant le même aspect, la même couleur et la même forme (**Figure 10**). En ce qui concerne, l'observation microscopique des cellules à Gram⁺, de forme bâtonnet disposées en paires ont été observé.



Figure 10. Photographie de l'aspect macroscopique de *L. plantarum*.

Les résultats de la standardisation de l'inoculum ont montré qu'un ml de la culture de *L. plantarum* S10 obtenu après 24h d'incubation à 37°C, donne une moyenne de 2.5×10^9 UFC/ml, tandis que *L. plantarum* BCX1 a donné une moyenne de 3.3×10^9 UFC/ml.

III.2. Evaluation de quelques aptitudes probiotique de *L. plantarum in vitro*

III.2.1. Résistance au pH gastrique

L'acidité de l'estomac humain (pH 1 à 4.5) constitue l'un des principaux obstacles que la flore microbienne doit affronter pour assurer sa prolifération (**Kusharyati et al., 2020**). Les résultats de la résistance des souches de *L. plantarum* à l'acidité simulée à celle de l'estomac sur des milieux à pH allant de pH 2 à pH 4 après 2 heures d'incubation sont présentés sur la **Figure 11**.

D'après les résultats de cette figure, nous remarquons que la tolérance à l'acidité était variable entre les deux souches, avec une diminution du taux de survie en fonction de l'abaissement de pH jusqu'à atteindre un minimum respectif de $46.75 \pm 0.003\%$ et $38.91 \pm 0.06\%$ de viabilité à pH 2 pour *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1.

Par ailleurs, à pH 3 et 4, *L. plantarum* BCX1 a montré un taux de survie de $40.03 \pm 0.05\%$ et $69.54 \pm 0.20\%$ respectivement. Tandis que, *L. plantarum* S10 présente le meilleur taux de survie avec $74.28 \pm 0.15\%$ et $84.01 \pm 0.60\%$. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux d'**Anandharaj et al.**

(2015), qui ont obtenu un taux de survie de 34.41 à 45.22 % à pH 2 avec différentes souches de genre *Lactiplantibacillus*.

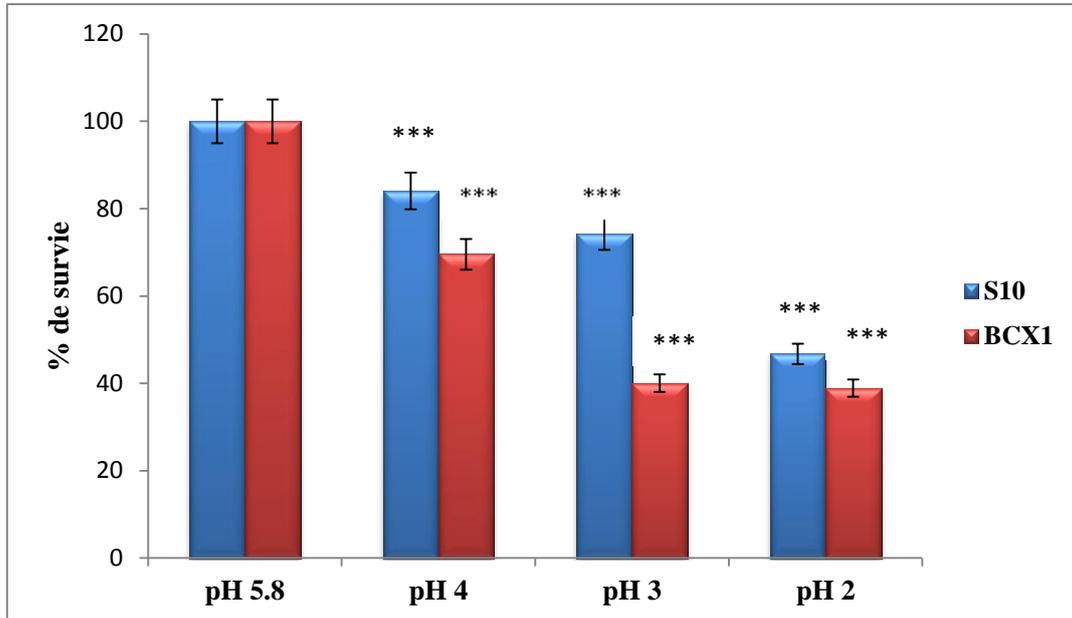


Figure 11. Taux de survie des souches de *L. plantarum* sur des milieux aux différents pH.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures ; *** : Différence hautement significative ($p < 0.001$).

III.2.2. Résistance aux sels biliaires

La concentration physiologique appropriées de la bile humaine est comprise entre 0.3% et 0.5%, qui sont considérées comme un critère pour la sélection des souches probiotiques résistantes (Guo et al., 2010).

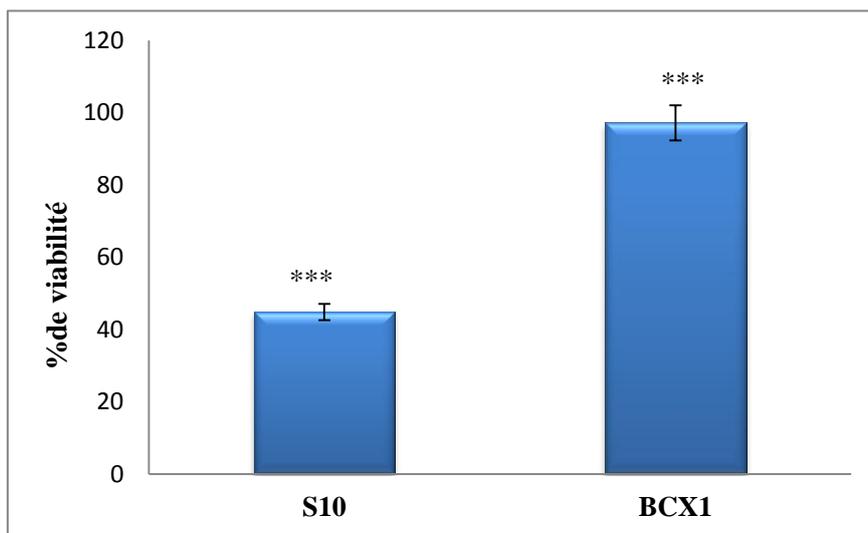


Figure 12. Survie des souches de *L. plantarum* en présence de 0.3% de sels biliaires.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures ; *** : Différence hautement significative ($p < 0.001$).

Au reflet de la **Figure 12**, nous remarquons que les souches mise au test ont un taux de survie d'environ $44.83 \pm 0.10\%$, $97.19 \pm 0.35\%$ ($p < 0.001$) pour *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 respectivement. Ce qui indique, une très bonne résistance aux sels biliaries pour *L. plantarum* BCX1 avec un taux de vie supérieur à 90% après un temps d'exposition de 4h dans un milieu simulant les conditions du duodénum à une concentration de 0.3% de sels biliaries. En outre, nos résultats sont identiques à celle obtenue par **Anandharaj et al. (2015)**, qui ont obtenu un pourcentage de tolérance variable entre 37.26 à 89.34% en présence de 0.3% de sels biliaries avec *L. plantarum*. Cette capacité de résistance aux sels biliaries a été rapportée par plusieurs auteurs (**Riane et al., 2019 ; Topçu et al., 2020 ; Sui et al., 2021**)

III.2.3. Hydrophobicité des surfaces cellulaires

Dans ce test, nous avons évalué l'hydrophobicité de la surface cellulaire de *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 vis-à-vis de quatre solvants, le xylène (solvant apolaire), le toluène (solvant monopolaire), le chloroforme (solvant acide monopolaire, accepteur d'électrons) et l'éthyle acétate (solvant basique monopolaire, donneur d'électrons), les résultats obtenus sont mentionnés dans la **Figure 13**.

D'après les résultats, nous remarquons que les pourcentages d'hydrophobicité sont relativement variables selon la nature des solvants et les souches d'une même espèce. La souche de *L. plantarum* S10 montre une meilleur hydrophobicité avec l'éthyle acétate, xylène, toluène, dont le pourcentage était de $91.92 \pm 0.18\%$, $95.51 \pm 0.20\%$ et $74.60 \pm 0.08\%$ respectivement, alors qu'une hydrophobicité modérée a été obtenue avec le chloroforme ($67.60 \pm 0.09\%$). Tandis que, une faible hydrophobicité a été révélée pour la souche de *L. plantarum* BCX1 avec le chloroforme ($14.31 \pm 0.03\%$). Le taux d'hydrophobicité de cette souche augmente de manière significative de $42.94 \pm 0.07\%$ à $63.50 \pm 0.10\%$ avec les trois solvants. Ces résultats sont proches de ceux des études menées par **Huidrom et Sharma (2018)**, qui ont montré que cette capacité est due à la variation de la composition des polymères de surface qui sont principalement responsable des propriétés d'adhérence des isolats probiotiques.

D'après **Ekmekci et al. (2009)**, l'hydrophobicité des lactobacilles est classée comme faible si le pourcentage d'affinité est entre 0-35%, modéré entre 36-70% et forte entre 71-100%. Sur la base des résultats obtenus, on déduit que les surfaces de *L. plantarum* S10 et de *L. plantarum* BCX1 sont hydrophobes.

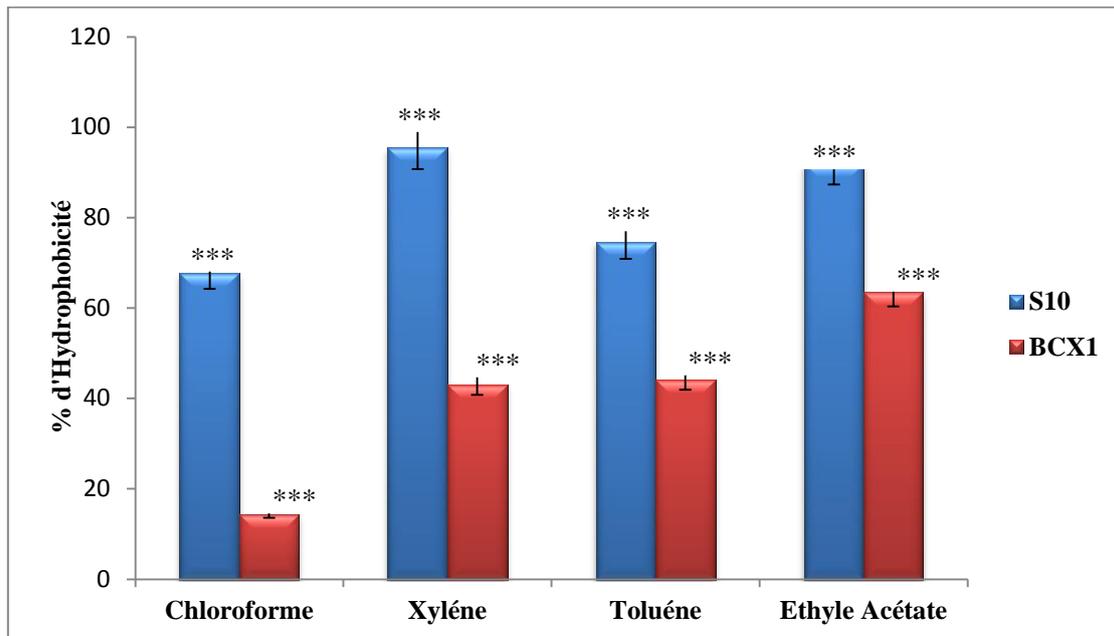


Figure 13. Pourcentage d'hydrophobicité des souches de *L.plantarum*.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures ; *** : Différence hautement significative ($p < 0.001$).

L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules hôtes. Ce test permet d'évaluer le potentiel de colonisation « bactérie-cellules intestinale » par les interactions hydrophobes (Oelschlaeger, 2010). Ce paramètre est influencé par les facteurs de milieu et l'âge de la bactérie ainsi que par sa structure (Baillif *et al.*, 2010).

III.2.4. Capacité d'auto-agrégation/co-agrégation

La propriété d'auto-agrégation est considérée comme un caractère important de l'adhésion, car elle facilite la colonisation temporaire des probiotiques dans le tractus gastro-intestinale humain et protège l'hôte par la formation de biofilm. D'après les résultats obtenus, nous constatons que les deux souches étudiées ont une capacité modérée d'auto-agrégation avec un pourcentage de $88.38 \pm 0.10\%$ et $54.17 \pm 0.05\%$ pour *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 respectivement après 3 heures d'incubation.

L'observation microscopique a également confirmé la formation des regroupements cellulaires et la présence des agrégats (Figure 14).

Les résultats obtenus avec *L.plantarum* S10 sont compatibles à ceux de Janković et ses collaborateurs (2012), qui ont montré que trois souches de *L. plantarum* (S1, A et B) avaient un fort pourcentage d'auto agrégation ($\geq 80\%$), alors que, les résultats de notre deuxième souche de *L. plantarum* BCX1 ne sont pas compatibles avec cette même étude. Selon Zeng *et al.* (2020), une

forte auto-agrégation est due à la surface hydrophobe, tandis que la surface hydrophile est responsable d'une faible auto-agrégation.

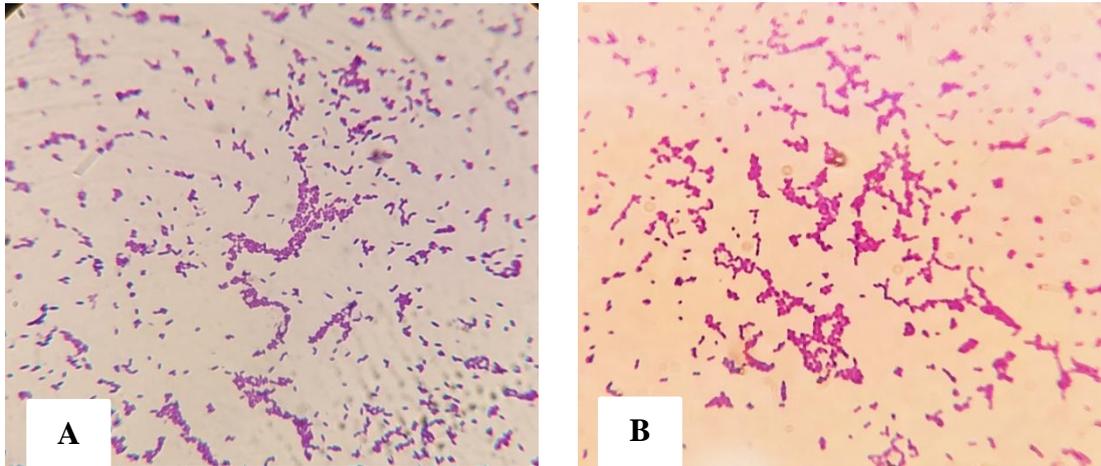


Figure 14. Photomicrographie de l'auto-agrégation des souches de *L. plantarum* (G×100)

(A): *L. plantarum* BCX1 (B): *L. plantarum* S10

La détermination de la co-agrégation est une méthode fiable pour l'évaluation de l'interaction étroite entre les bactéries pathogènes et les lactobacilles, ces dernières empêchant la colonisation des pathogènes par la libération des substances antimicrobiennes et par la formation des barrières (Kachouri *et al.*, 2015).

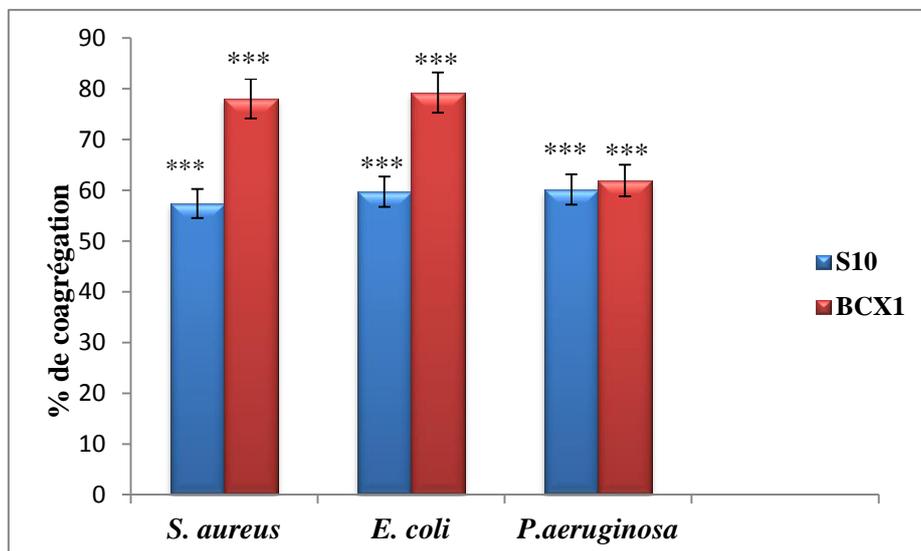


Figure 15. Pourcentage de co-agrégation des souches de *L. plantarum* avec les trois souches pathogènes.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures ; *** : Différence hautement significative ($p < 0.001$).

Nos résultats ont montré que *L. plantarum* BCX1 avait une meilleure capacité de co-agrégation avec *E. coli* et *S. aureus* avec un pourcentage respectif de $79.28 \pm 0.70\%$ et $78.06 \pm 0.66\%$. En revanche, un pourcentage modéré de $61.93 \pm 0.35\%$ a été observé avec *P. aeruginosa* (Figure 15). Alors que, pour

L. plantarum S10, la capacité de co-agrégation est modérée avec *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus* avec un pourcentage de $60.15 \pm 0.30\%$, $59.75 \pm 0.61\%$ et $57.41 \pm 0.56\%$ respectivement.

Ces résultats sont meilleurs à ceux obtenus par **Anandhrayej et al. (2015)**, qui ont obtenu un pourcentage de co-agrégation modéré de l'ordre de 19 à 68% avec les bactéries lactiques. Par ailleurs, en **2008**, **Collado** et ses collaborateurs ont trouvé que *L. plantarum* a donné un pourcentage de co-agrégation de 22.9 à 24.1% avec *S. aureus* après 4 heures d'incubation, et il a pu atteindre 74% après 24 heures d'incubation, ces résultats sont moins importants que les nôtres.

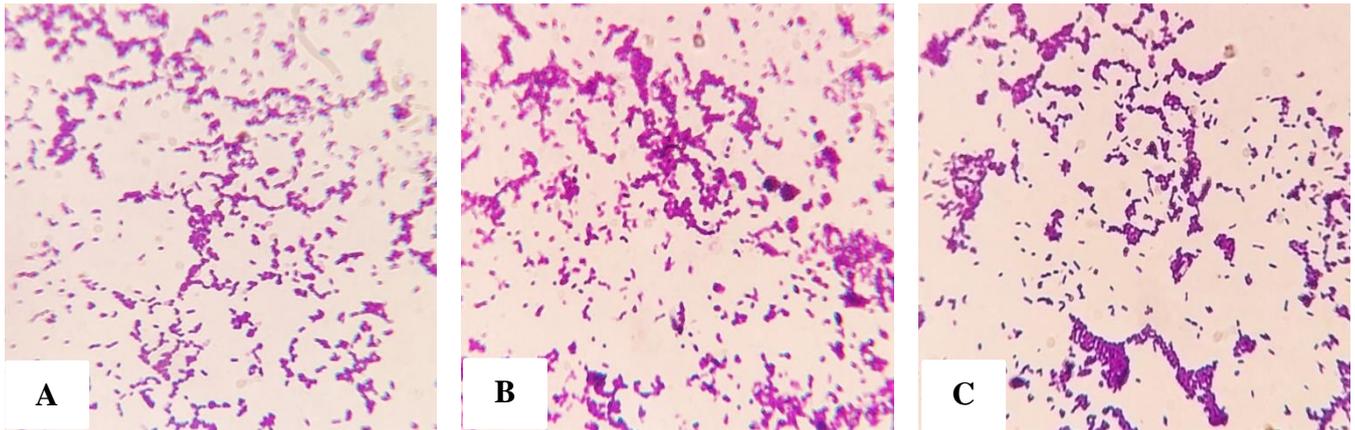


Figure 16. Photomicrographie de la co-agrégation de *L. plantarum* S10 (Gx100).

^(A):*S. aureus*, ^(B):*P. aeruginosa*, ^(C):*E. coli*.

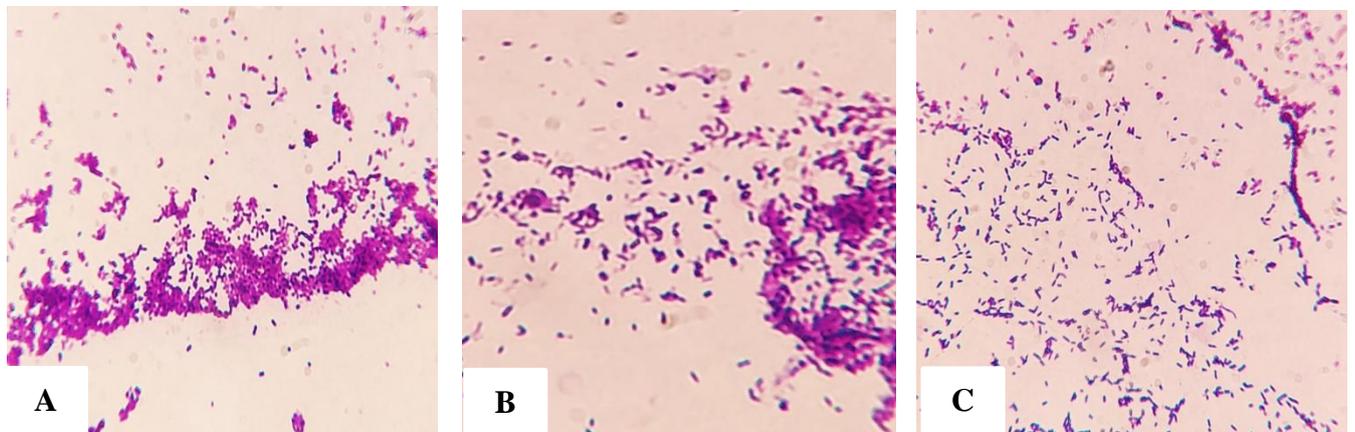


Figure 17. Photomicrographie de la co-agrégation de *L. plantarum* BCX1 (Gx100).

^(A):*S. aureus*, ^(B):*P. aeruginosa*, ^(C):*E. coli*.

III.2.5. Adhésion aux cellules épithéliales

La capacité des bactéries probiotiques à adhérer aux constituants du tractus gastro-intestinal est l'une des propriétés essentielles pour la sélection des microorganismes comme étant probiotiques (**Servin et Coconnier, 2003**).

Avant la réalisation de ce test, une confirmation de l'absence de contaminants microbiens des cellules épithéliales d'origine animale (Iléon du poulet) a été procédée sous microscope, dont la photographie illustre que le tissu est dépourvu de contaminants.

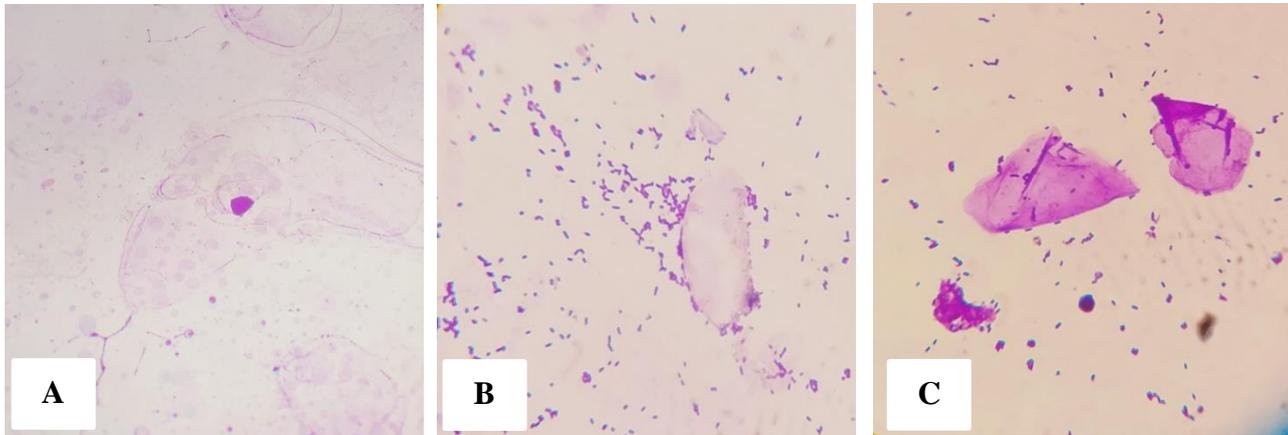


Figure 18. Photomicrographie de l'adhésion des souches de *L. plantarum* aux cellules épithéliales (Gx100).

^(A) : Cellule épithéliale saine, ^(B) : Cellules bactériennes BCX1 adhérees, ^(C) : Cellules bactériennes S10 adhérees.

La figure 18, représente l'observation microscopique où le test est considéré comme positif car le nombre de cellules de *L. plantarum* adhérentes est supérieur à 15 (Lin *et al.*, 2007).

Ce processus d'adhésion des lactobacilles se déroule essentiellement en deux phases, une adhérence spécifique qui se fixe directement via des adhésines (protéines, polysaccharidiques, ou des acides lipotechoïque) et éventuellement une adhérence non spécifique caractérisée par les différentes interactions physicochimiques qui peuvent exister entre les lactobacilles et la muqueuse notamment des forces de Van Der Waals, forces électrostatiques et liaisons hydrogènes (Mittelviehhaus *et al.*, 2019 ; Trush *et al.*, 2020).

III.3. Détermination *in vitro* de l'activité antioxydante des souches probiotiques

III.3.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ Scavenging Activity)

L'effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité des souches de *L. plantarum* est représenté par la Figure 19, où l'analyse statistique a révélé des différences hautement significatives (p<0.001) entre la viabilité et la concentration en peroxyde d'hydrogène.

En se référant aux résultats obtenus sur le milieu témoin, nous remarquons que les deux souches de *L. plantarum* montrent une résistance vis-à-vis du stress induit par les différentes concentrations d'H₂O₂. Les résultats ont révélé que la souche codée S10 préserve 42.85±0.003% de sa viabilité et

62.5 ±0.002% pour *L. plantarum* BCX1 après une exposition à 1mM d'H₂O₂. L'étude menée par Li *et al.* (2012), a montré que 11 souches de *L. plantarum* ont une tolérance au peroxyde d'hydrogène après 8 heures d'incubation, malgré les variations du degré de viabilité d'une souche à l'autre. De nombreuses souches de *Lactobacillus* se sont avérées résistantes au peroxyde d'hydrogène aux divers degrés (Wang, Yu, et Chou 2006).

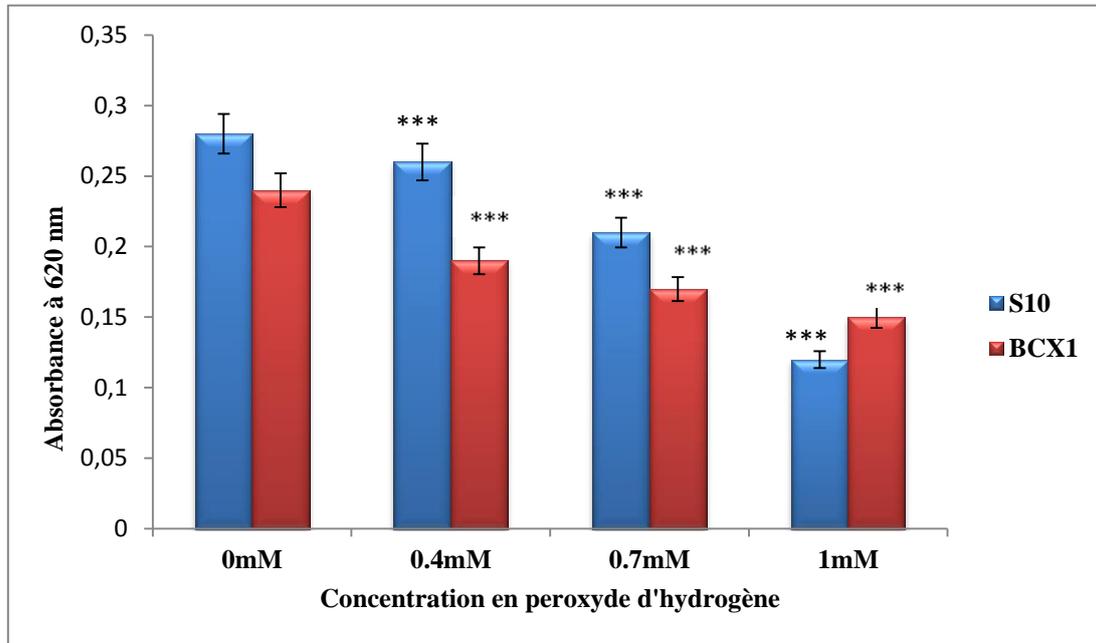


Figure 19. Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité des souches de *L. plantarum*.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

Le mécanisme par lequel les lactobacilles résistent au peroxyde d'hydrogène diffère selon les espèces et selon les souches de la même espèce. Chez la souche *Shirota* de *Lacticaseibacillus casei*, l'expression constituée du système thiorédoxine-thiorédoxine réductase joue un rôle important dans la tolérance à l'oxygène et au peroxyde d'hydrogène. Par ailleurs, il est bien établi que le NADH peroxydase décompose l'H₂O₂ et que certaines souches de *L. plantarum* produisent de la pseudo catalase qui agit également pour décomposer le peroxyde d'hydrogène (Serata *et al.*, 2016).

III.3.2. Activité de piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Les résultats obtenus sont illustrés par la **Figure 20**, où le surnageant de la culture cellulaire de *L. plantarum* S10 a révélé une forte capacité de piégeage des radicaux libre de DPPH avec un taux d'inhibition de 87.55±0.62% ; alors que le culot a montré une capacité d'inhibition estimée à 74.09±0.39%. En ce qui concerne, la souche de *L. plantarum* BCX1, le taux d'inhibition du surnageant était plus important (67.09±0.51%) que celui de la suspension bactérienne avec une capacité d'inhibition estimée à 47.03±0.34%. Nos résultats sont meilleurs à ceux trouvés par Zhang

et al. (2014), qui ont testé la capacité de certaines souches de lactobacilles à piéger les radicaux libres et ils ont montré que le taux d'inhibition du surnageant était plus important (63.2%) que celui de la suspension bactérienne avec un taux supérieur à 50%.

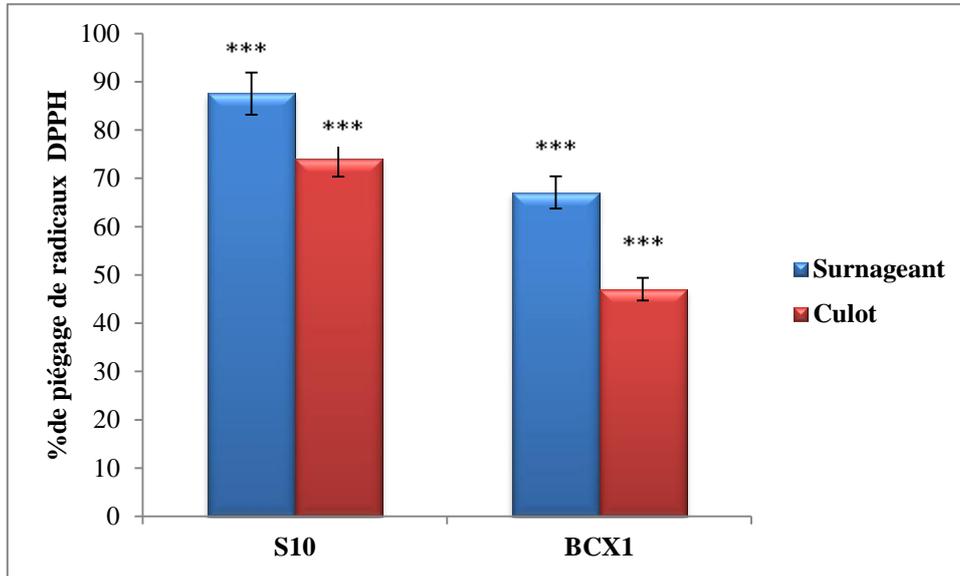


Figure 20. Capacité des souches *L. plantarum* de leurs surnageants à piéger les radicaux libres de DPPH.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

L'activité de piégeage des radicaux libres de lactobacilles pourrait être due à des enzymes antioxydants intracellulaires notamment NADH oxydase ; Catalase et NADH peroxydase libérées après la lyse cellulaire ; les lysats de cellules de certains lactobacilles peuvent également contenir des composé antioxydants non enzymatique tels que le glutathion et le thiorédoxine (Zhang *et al.*, 2011).

III.3.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles

Les résultats de l'activité de piégeage des radicaux hydroxyles par les cultures cellulaires et leurs surnageants sont groupés sur la **Figure 21**.

Le résultat a révélé que *L. plantarum* BCX1 possède une forte capacité de piégeage des radicaux hydroxyles, où le taux d'inhibition est de $85.36 \pm 0.57\%$, alors que *L. plantarum* S10 avait un taux de $35.16 \pm 0.14\%$. D'autre part, les surnageants des deux souches possédaient une activité moins importante avec un taux d'inhibition de $20.34 \pm 0.15\%$ et $16 \pm 0.06\%$ respectivement.

Ces résultats peuvent être expliqués par la capacité de l'inhibition de la production des radicaux hydroxyles qui sont responsable de la lésion oxydative des biomolécules, ceux-ci proviennent principalement de la réaction de Fenton en présence de métaux de transition tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}) (Kao et Chen, 2006). En effet, selon Li *et al.* (2012), la chélation de ces ions est

due grâce à la présence des exo polysaccharides sur la surface bactérienne. L'étude menée par **Sui et al. (2021)** a montré que certaines souches de bactéries lactiques, possèdent une activité antioxydante (par l'élimination des ions de ces métaux) supérieure à 60%, ce résultat est proche à ceux obtenus dans ce travail.

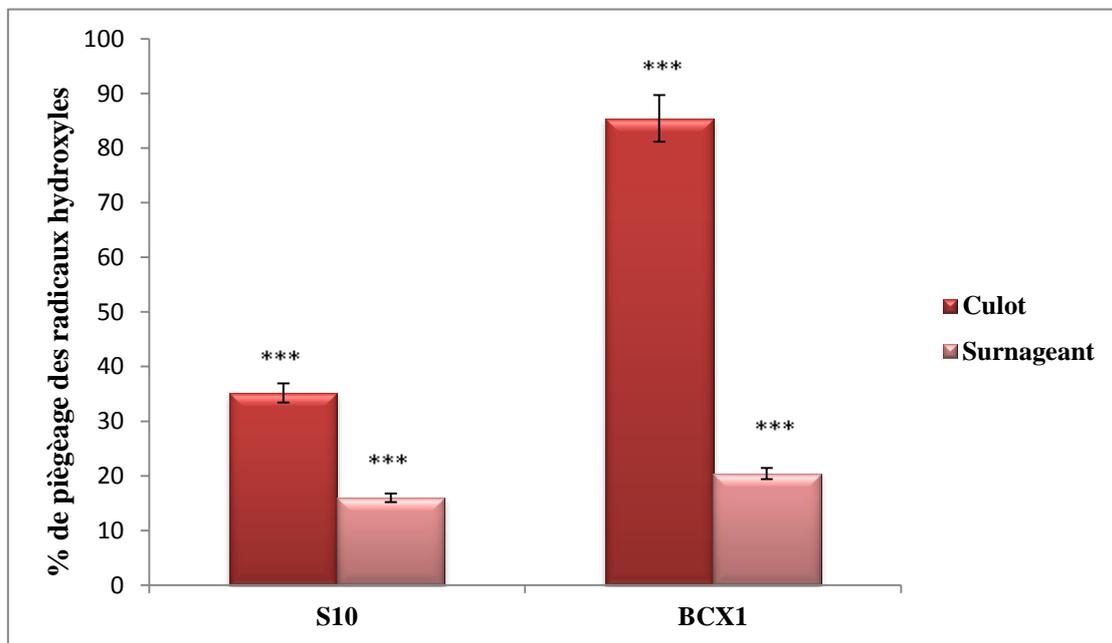


Figure 21. Pourcentage de piégeage des radicaux hydroxyles par les souches de *L. plantarum* et leurs surnageants.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

Une autre étude de **Serata et al. (2016)**, a montré que la protéine HprA1 contribue à la résistance aux effets du peroxyde d'hydrogène chez les bactéries du groupe *L. casei/ L. paracasei* en se liant au fer dans la cellule, empêchant ainsi la formation d'un radical hydroxyle. Donc, pour les lactobacilles qui se développent bien dans des conditions aérobies, l'expression de HprA1 peut constituer un mécanisme raisonnable et efficace pour éviter des niveaux élevés de toxicité du radical hydroxyle.

III.4. Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes de l'extrait et du jus de fraise

III.4.1. Teneur en polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux de la fraise (extrait et jus) sont illustrés dans la **Figure 22**. La détermination de ces résultats a été faite en utilisant l'équation de la régression linéaire à partir de la courbe d'étalonnage établie par l'acide gallique ($y = 7.59 X + 0.0084$ et $R = 0.98$) et exprimées en mg EAG /100ml.

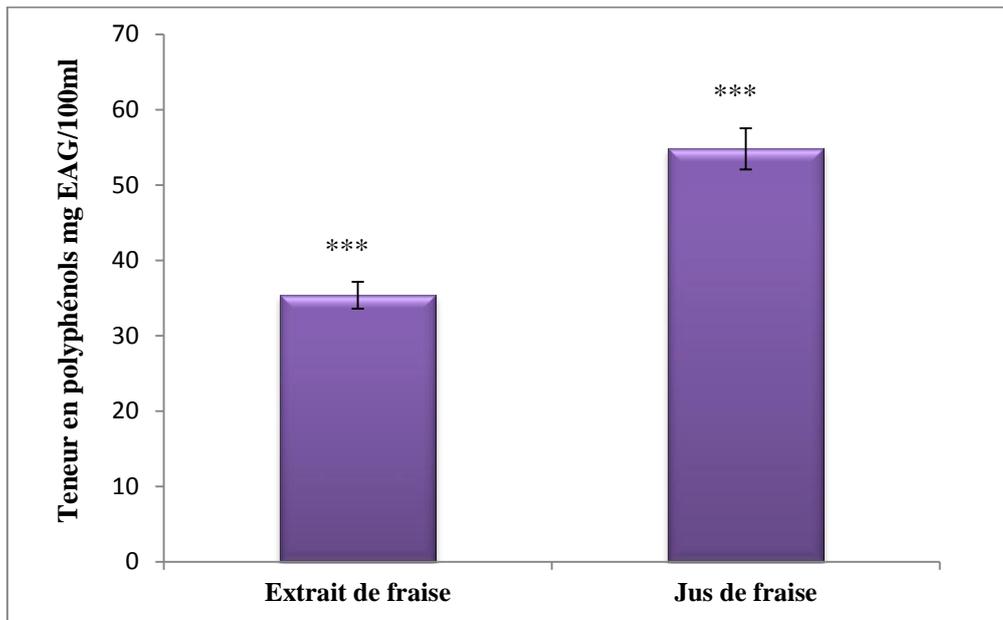


Figure 22. Teneur en polyphénols du jus de fraise et de l'extrait.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté des différences significatives ($p < 0.001$) entre les échantillons dont l'extrait et le jus de fraise renferment respectivement une quantité en polyphénols totaux de 35.34 ± 0.004 et 54.82 ± 0.007 mg EAG/100ml. Nos résultats sont proches de ceux trouvés par **Henning et al. (2010)** qui ont obtenu une teneur en polyphénols dans l'extrait de fraise de 53 mg EAG/100g.

Toutefois, les résultats d'autres études ne concordent pas avec ceux obtenus dans cette étude dont les teneurs en polyphénols totaux des extraits de fraise étaient variables ; ces différences peuvent être en relation avec des facteurs géographiques, climatiques et génétiques. Néanmoins, la méthode et le temps d'extraction peuvent également influencer les teneurs en composés phénoliques ainsi que la solubilité et le type du solvant utilisé et le degré de polymérisation des composés phénoliques (**Bentabet et al., 2014 ; Ghedadba et al., 2015 ; Cheurfa et Allem 2016**).

III.4.2. Teneur en flavonoïdes

D'après l'histogramme illustré dans la **Figure 23**, nous avons obtenu une teneur en flavonoïdes de 160.02 ± 0.17 µg EQ/100 ml, correspondant à l'extrait de fraise. Alors que, dans le jus une meilleure teneur de 518.88 ± 0.09 µg EQ/100ml a été obtenue.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux des chercheurs **Ciz et al. (2010)** et **Rita et al. (2018)** qui ont trouvé une teneur en composés flavonoidiques dans les extraits de fraise allant de 526 µg EQ/100ml à 599.7 µg EQ/100 ml. Par contre, plusieurs auteurs ont trouvé des résultats inférieurs aux nôtres. Cette différence de résultats est due aux conditions climatiques qui stimulent la

biosynthèse des métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, essentiellement leur glycosylation ainsi que la polarité du solvant d'extraction (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015).

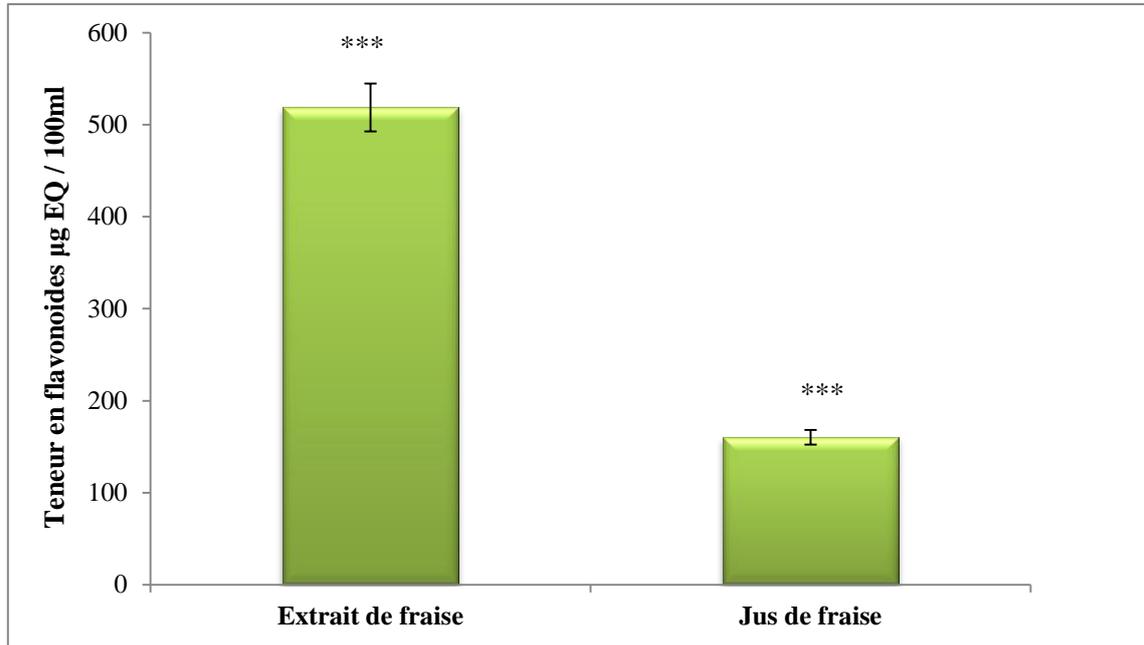


Figure 23. Teneur en flavonoïdes de jus de fraise et leur extrait.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures ; *** : Différence hautement significative ($p < 0.001$).

III.5. Détermination de l'activité antioxydante de l'extrait et du jus de fraise

III.5.1. Activité de piégeage de radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

D'après les résultats obtenus (Figure 24), nous avons trouvé que les valeurs de l'activité antioxydante sont avérées plus importantes pour l'extrait de la fraise, comparativement à celle de l'antioxydant utilisé comme standard (trolox) et avec des taux d'inhibition respectifs de $88.75 \pm 0.57\%$ et $47.25 \pm 0.006\%$. En revanche, l'activité de piégeage des radicaux libres dans le jus de fraise a été estimée à $88.15 \pm 0.50\%$.

En se référant à l'étude de Milardovic *et al.* (2006), ce test nous a permis de faire une estimation de la capacité des substances d'agir en tant que piégeurs des radicaux libres ou donateurs d'hydrogène, et évaluer leur activité antioxydante.

Ces résultats corroborent et ceux de l'étude de Barros *et al.* (2020), qui ont trouvé que l'extrait de fraise a une forte activité de piégeage des radicaux de DPPH. Une autre étude faite par Henning *et al.* (2010), a montré que l'extrait de fraise a une capacité anti-radicalaire plus élevée à celle de trolox. Cette capacité pourrait s'expliquer selon Turkmen *et al.* (2007), par la richesse différentielle en composés phénoliques, flavonoidiques, et aux autres métabolites secondaires que nous n'avons

pas dosés et qui présentait un potentiel bioactif qui semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH.

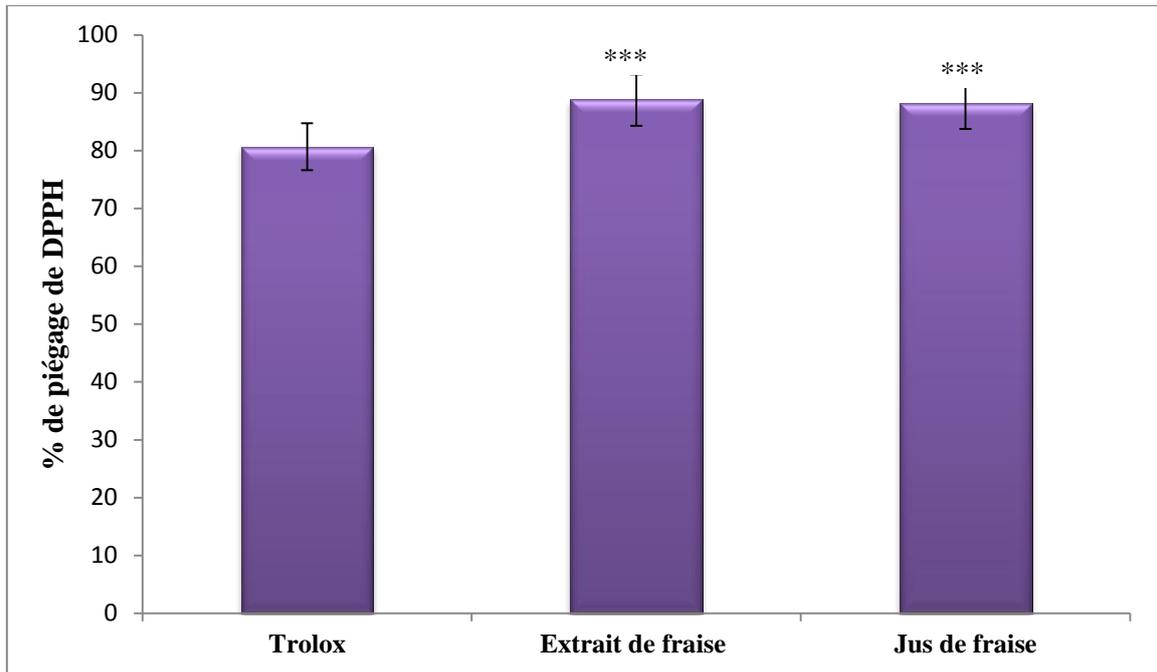


Figure 24. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'extrait et le jus de fraise.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

III.5.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power)

Les résultats représentés dans la **Figure 25**, montrent l'évolution du pouvoir réducteur de l'extrait et de jus de fraise exprimés en μg équivalent d'acide ascorbique/ ml.

L'analyse statistique a montré qu'il y a des différences hautement significatives ($p < 0.001$), cette différence pourrait être liée à la quantité de leurs contenus totaux en composés phénoliques et en flavonoïdes. En effet, l'extrait et le jus de fraise exercent la meilleure capacité à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) avec $227.08 \pm 0.12 \mu\text{g}$ EAA/ml et $144.23 \pm 0.11 \mu\text{g}$ EAA/ml respectivement. En outre, le trolox utilisé comme contrôle a donné un pouvoir de réduction du fer de $30.88 \pm 0.003 \mu\text{g}$ EAA/ml.

Selon **Djenidi et al. (2020)**, le pouvoir réducteur est un indicateur significatif de l'activité antioxydante d'une substance, il est basé sur la capacité des composés phénoliques à réduire le complexe ferrique (Fe^{3+}) de couleur jaune en fer ferreux (Fe^{2+}) de couleur bleu verdâtre, dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur. De même, une étude similaire menée par **Perron et Brumaghim en 2009**, entre les polyphénols et la capacité de chélation du fer, a également indiqué que les fortes propriétés de liaison du fer aux polyphénols, que ce soit la capacité de chélation du fer du polyéchol contenant du catéchol ou du gallol, jouent en réalité un rôle clé dans leurs comportements. Ce pouvoir est souvent considéré comme un profil comparable à celui

des teneurs en substances antioxydantes dont la nature et la concentration modulent le pouvoir réducteur (Bentabet *et al.*, 2014).

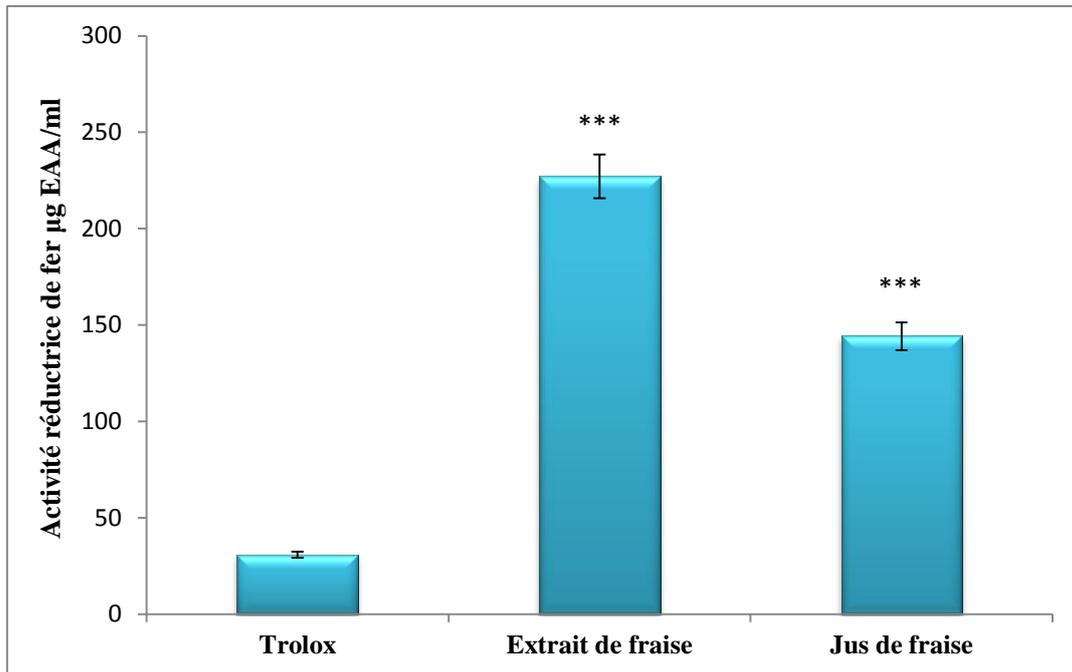


Figure 25. Pouvoir réducteur de jus de fraise et leur extrait.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

III.6. Préparation du jus de fraise fermenté et évaluation de quelques paramètres de fermentation

III.6.1. Evolution du pH et d'acidité

Avant de précéder à la fermentation, le jus brut de fraise avait un pH de 4.15 ± 0.008 , ce résultat est proche de celui trouvé par Garzón et Wrolstad (2002) et Wang *et al.* (2021) (pH égale à 3.98) pour un jus du même fruit.

Cependant après l'ensemencement du jus brut par les deux souches étudiées, nous remarquons une diminution progressive des valeurs du pH au cours de la fermentation. Le **Tableau 4** résume l'évolution du pH et de l'acidité dans le produit.

Tableau 4. Evolution de pH et de l'acidité dans le jus de fraise au cours de la fermentation.

	pH		Acidité (acide citrique%)	
	T ₀	T _{24h}	T ₀	T _{24h}
Jus brut	4.15±0.008		0.20±0.03	
Jus lactofermenté S10	4.00±0.07	3.77±0.03	0.28±0.01	0.60±0.02
Jus lactofermenté BCX1	4.00±0.07	3.80±0.02	0.44±0.008	0.50±0.009

Après inoculation des jus bruts de fraise par les deux souches (*L. plantarum* S10, BCX1), une diminution progressive du pH a été notée, pour atteindre des valeurs respectives de pH 4.00 ± 0.07 . Nous remarquons une chute de cette valeur après 24h de fermentation pour atteindre un pH de 3.77 ± 0.03 et 3.80 ± 0.02 respectivement. Ces résultats sont justifiés par la capacité de nos souches à convertir les composants du jus de fraise en acides organiques qui agissent directement sur le potentiel hydrogène du produit. De même, il est bien établi que les bactéries lactiques ont un métabolisme du carbone relativement simple qui est principalement consacré à la synthèse de l'acide lactique lors de la fermentation.

En ce qui concerne l'acidité du jus de fraise brut, d'après les résultats de **Tableau 4**, nous constatons que cette acidité (% acide citrique) est de $0.20 \pm 0.03\%$ et elle a évolué à $0.28 \pm 0.01\%$ et $0.44 \pm 0.008\%$ après inoculation du jus par *L. plantarum* S10 et BCX1 respectivement. Après 24 heures de fermentation, nous trouvons que l'acidité des jus a augmenté pour atteindre une valeur de $0.60 \pm 0.02\%$ pour le jus lactofermenté par *L. plantarum* S10 et $0.50 \pm 0.009\%$ pour celui inoculé par *L. plantarum* BCX1. Ces résultats sont en accords avec ceux trouvés par **Sharma et Mishra (2013)** ; **Reddy et al. (2015)** ; et **Malik, Bora et Sharma (2019)** qui ont montré qu'au cours de la fermentation des jus des fruits, le pH diminue et l'acidité augmente.

III.6.2. Evolution du nombre de cellules viables

Après la fermentation des jus de fraise par les souches de *L. plantarum*, l'évolution du nombre de cellules viables a été suivi par l'application de la méthode du dénombrement direct sur boîte de Pétri à T_0 et après 24 heures de fermentation.

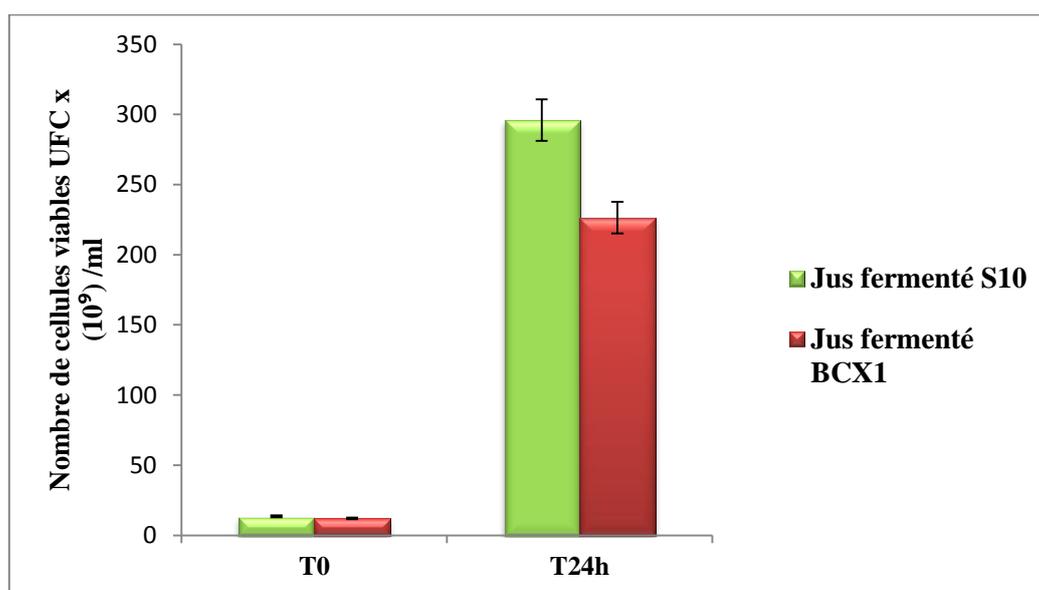


Figure 26. Nombre des cellules viables dans le jus de fraise après 24h de fermentation.

D'après les résultats de la **Figure 26**, une augmentation du nombre de cellules viables a été observé après ensemencement des souches de *L. plantarum* BCX1 et *L. plantarum* S10 dans le jus de fraise pour atteindre 226×10^9 UFC/ml et 296×10^9 UFC/ml respectivement. D'après ces données, nos souches sont capables de survivre dans le jus fermenté où l'acidité mesurée était élevée et le pH de jus de fraise était bas. Cette particularité est due principalement au métabolisme hétérofermentaire des souches lors de la fermentation malolactique où l'acide malique est décarboxylé dans le cytoplasme par des enzymes malolactiques pour produire de l'acide lactique et du CO₂. Cette décarboxylation permet l'alcalinisation du cytoplasme et la production d'ATP (**Filannino et al., 2014**).

III.7. Activités antioxydantes de la bactérie après 24 heures de fermentation du jus de fraise

Ce test a pour objectifs, la vérification de la perte ou non des activités antioxydantes de la souche véhiculé par une matrice alimentaire fermentée (le jus de fraise).

III.7.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ Scavenging Activity)

L'effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité des deux souches (*L. plantarum* S10 et BCX1) après 24h de fermentation dans les jus de fraise est représenté sur la **Figure 27**.

D'après les résultats obtenus, nous observons qu'il y a une amélioration de la résistance des souches étudiées après 24 heures de fermentation vis-à-vis des différentes concentrations d'H₂O₂ comparativement au témoin. Ainsi, la meilleure résistance est observée dans le jus de fraise lactofermenté par la souche BCX1 ($74.42 \pm 0.22\%$) comparativement à celle de la souche S10 ($58.82 \pm 0.01\%$).

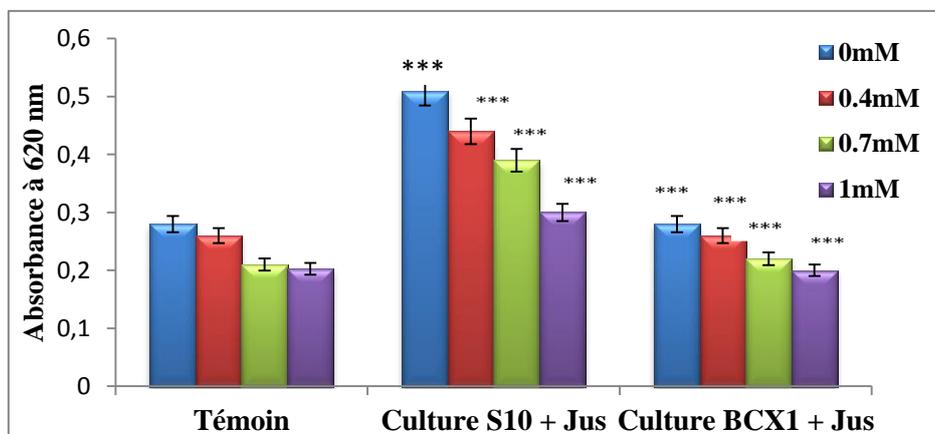


Figure 27. Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité des souches de *L. plantarum* après 24h de fermentation.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

III.7.2. Activité de piégeage des radicaux libres de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Les résultats des pourcentages de piégeage des radicaux libres de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl après 24 heures de fermentation de jus par *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 sont illustrés dans la **Figure 28**. L'analyse statistique des résultats révèle une différence significative ($P < 0.001$), la culture sur jus de fraise donne une meilleure activité d'inhibition avec un pourcentage de piégeage des radicaux libres de $90.67 \pm 0.06\%$ alors que la deuxième souche *L. plantarum* BCX1 a donné une capacité de piégeage des radicaux de $73.44 \pm 0.04\%$. En revanche, la culture témoin a donné le plus faible pourcentage d'activité anti radicalaire pour *L. plantarum* S10 ($74.09 \pm 0.39\%$) et *L. plantarum* BCX1 (47.03 ± 0.34) respectivement.

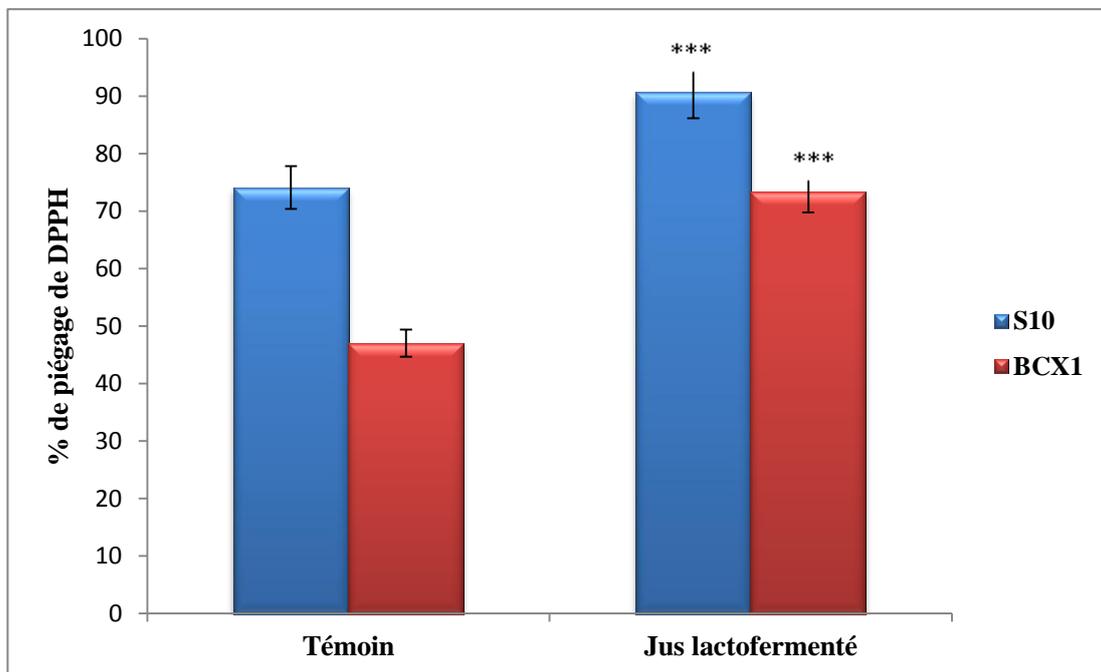


Figure 28. Pourcentage de piégeage de radicaux libre de DPPH après 24h de fermentation.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

III.7.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles

Les résultats des pourcentages de piégeage des radicaux hydroxyles après 24 heures de fermentation des jus par *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 sont groupés sur la **Figure 29**. Les résultats ont révélé que la capacité de piégeage de ces radicaux augmente en présence de la matrice alimentaire fermentée par rapport à celle du témoin, montrant ainsi un taux d'inhibition de $58.60 \pm 0.11\%$ pour la culture S10 dans le jus de fraise et $90.52 \pm 0.22\%$ pour la culture de la souche *L. plantarum* BCX1 dans la même matrice.

L'augmentation des activités antioxydantes de la bactérie peut être justifiée par l'augmentation du nombre des cellules au cours des 24 heures de fermentation. Les études menées par **Li et al. (2012)** et **Das et Goyal, (2015)** ont déduit que les valeurs de l'inhibition du radical hydroxyle ont augmenté parallèlement avec l'augmentation de la concentration en cellules de *Lactobacillus* au cours de la fermentation.

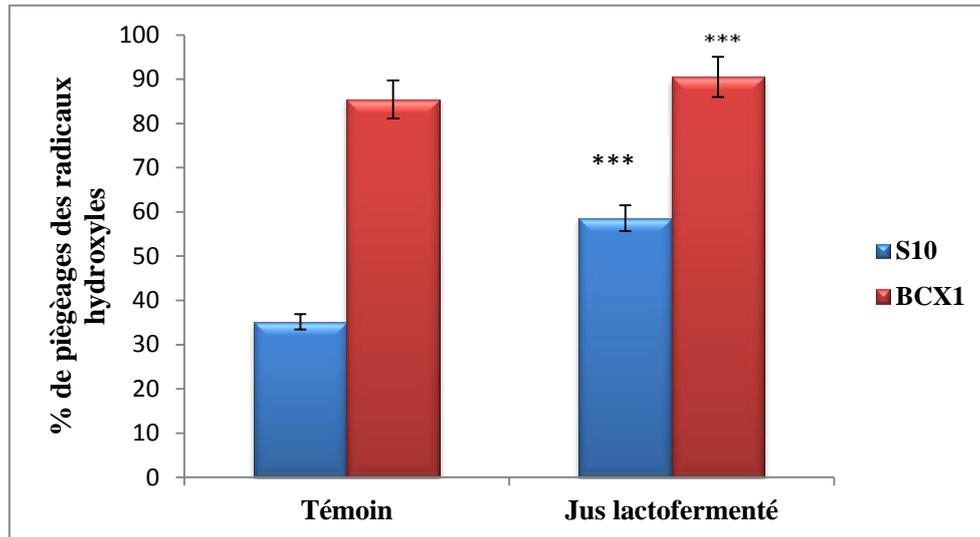


Figure 29. Pourcentage de piègèges de radical hydroxyle après 24h de fermentation.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

Selon l'étude menée par **Li et al. (2019)**, la métabolisation des polyphénols et des flavonoïdes par la bactérie est le point clé de l'amélioration de la capacité antioxydante cellulaire, car les bactéries lactiques pourraient épuiser la molécule de glucose disponible dans les composés phénoliques, ce qui entraînerait la production d'aglycones libres avec un plus grand nombre de groupes hydroxyles, ce qui conduit à la production de certains métabolites plus antioxydant au cours de la fermentation du jus de fruit.

III.8. Effet de la digestion sur la viabilité des souches de *L. plantarum* in vitro

III.8.1. Nombre de cellules viables

L'effet de la digestion bucco-gastro-intestinale sur la viabilité des deux souches probiotiques est montré dans la **Figure 30**.

D'après la représentation graphique, nous remarquons que les souches étudiées sont résistantes aux conditions similaires de la digestion orale (présence de l' α -amylase et à pH7) après 2 secondes d'incubation avec un pourcentage de survie de 61.20% (153×10^9 UFC/ml), 81.25% (260×10^9 UFC/ml) pour *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 respectivement. Après la digestion

stomacale, une diminution accrue en nombre de cellules viables a été constatée, pour atteindre à la fin de la digestion intestinale un nombre de 10×10^9 UFC/ml (*L. plantarum* S10) et 5×10^9 UFC/ml (*L. plantarum* BCX1) ; ceci indique que le nombre de cellules est abaissé mais la survie reste toujours. L'addition de la pepsine aux conditions acides de l'estomac a provoqué une perte plus ou moins importante de la viabilité bactérienne.

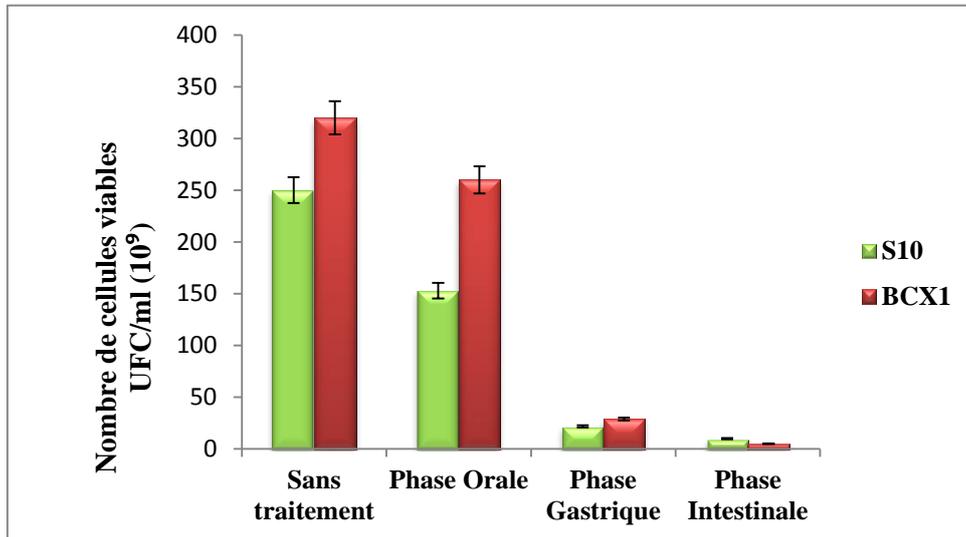


Figure 30. Effet de la digestion sur la viabilité et la survie des cellules des souches de *L. plantarum* (UFC/ml).

En 2017, **Vamanu** a obtenu des résultats similaires aux nôtres, il a indiqué que la présence de la pepsine avec un bas pH entraîne une diminution importante de la viabilité des souches de *L. plantarum*, *L. paracasei* et *L. rhamnosus*.

III.8.2. Aptitudes probiotiques des souches après la digestion bucco-gastro-intestinale

III.8.2.1. Résistance au pH gastrique

L'un des critères les plus importants pour la sélection des probiotiques est la capacité de la tolérance à l'environnement gastrique et celui intestinal après une administration orale (**Vemuri et al., 2018**).

La figure ci-dessous (**Figure 31**) présente l'effet de la digestion dans le tractus gastro-intestinal sur la viabilité des souches testées. En se référant aux résultats que nous avons eu précédemment et considérés comme témoin (**Figure 11**), nous remarquons que le taux de survie de deux souches a diminué progressivement en fonction de l'abaissement de pH de 4 à 2 et d'un compartiment à l'autre jusqu'à atteindre le niveau intestinal avec des taux de survie respectifs à pH4, pH3 et pH2 pour *L. plantarum* S10 de $44.28 \pm 0.07\%$, $33.60 \pm 0.09\%$, $22.70 \pm 0.001\%$, et de $44.28 \pm 0.05\%$, $21.11 \pm 0.08\%$ et $15.88 \pm 0.03\%$ pour *L. plantarum* BCX1.

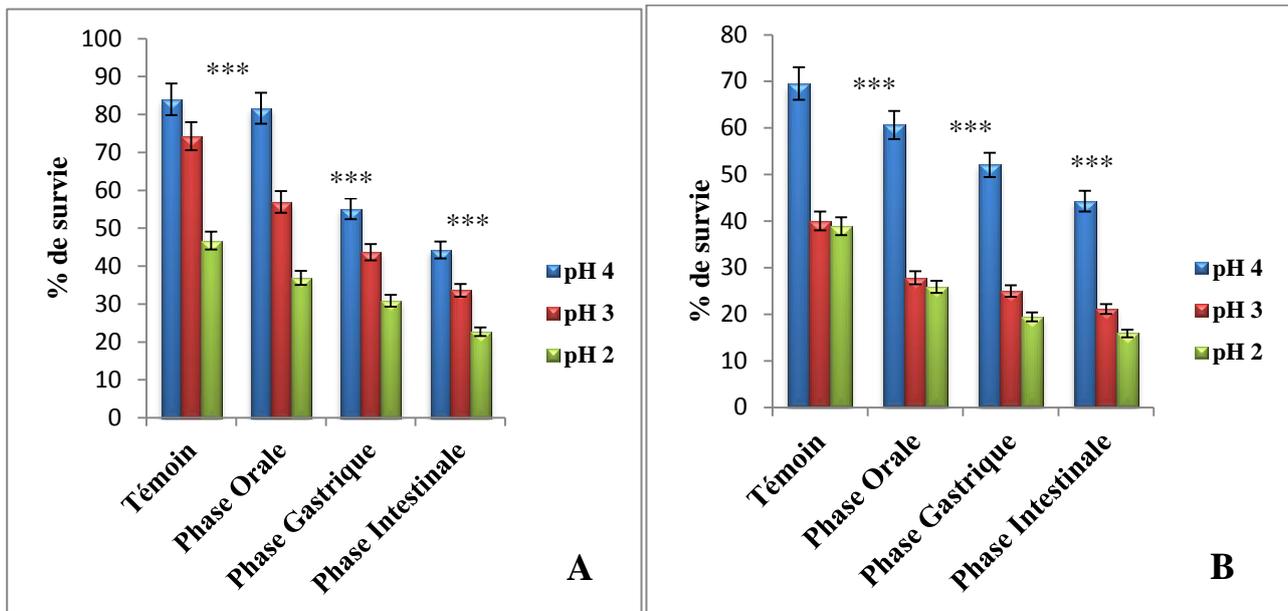


Figure 31. Taux de survie des souches de *L. plantarum* aux différents pH après la digestion bucco-gastro-intestinale.

(A): *L. plantarum* S10, (B): *L. plantarum* BCX1

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$)

Ces résultats vont et ceux de **Gheziel et al. (2019)**, qui ont montré que la viabilité de six souches de *L. plantarum* n'était pas affectée par le stress des conditions buccales, cependant la survie était significativement réduite sous les conditions gastriques (pH 2.0) ; en revanche, sous stress intestinal, une tendance à conserver la viabilité a été observée pour tous les souches de *L. plantarum*.

Nos résultats peuvent être expliqués par la présence d'un mécanisme de contrôle du pH intracellulaire (la FoF1 ATPase) qui transfère les protons dans l'environnement au détriment de l'ATP. Un second mécanisme pour l'homéostasie du pH était la voie de l'arginine désaminase (ADI) ; et un autre mécanisme de résistance aux acides exprimé par *L. lactis* dépendant du glutamate en présence de chlorure (**Yang et al., 2017 ; Topçu et al., 2020 ; Zhong et al., 2021**).

III.8.2.2. Résistance aux sels biliaries

L'effet des sels biliaries sur les deux souches de *L. plantarum* au niveau intestinal est représenté dans la **Figure 32**. D'après les résultats, nous constatons une diminution remarquable du taux de viabilité de *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 après 4 heures de digestion intestinale estimée à $36.64 \pm 0.01\%$ et $66.66 \pm 0.08\%$ respectivement.

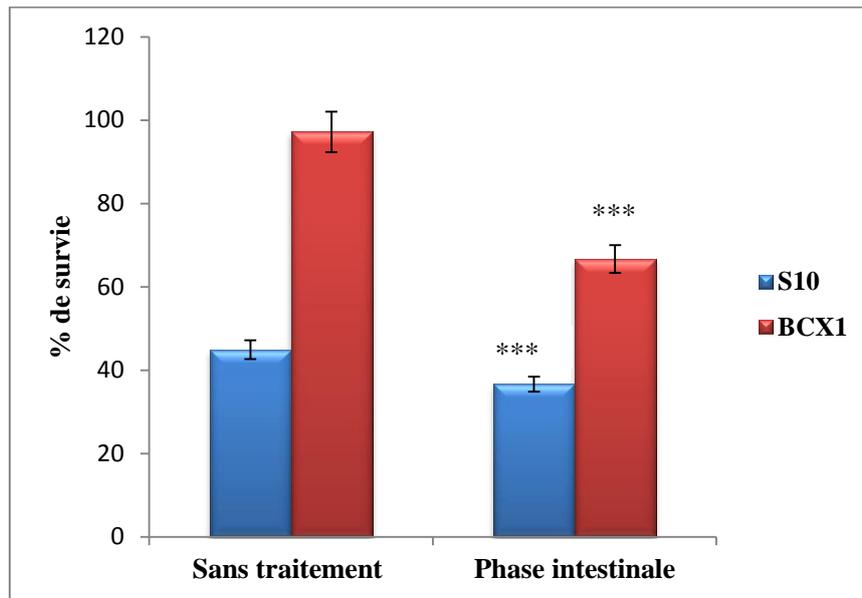


Figure 32. Taux de survie des souches de *L. plantarum* aux sels biliaires au niveau intestinale.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. . *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

Nos résultats sont moins importants que ceux de **Riane et al. (2019)**, qui ont testé la tolérance de *L. plantarum* 15 aux sels biliaires après l'avoir exposé au suc gastrique, par conséquent, il s'est avéré que cette souche possède une capacité de résistance avec un taux de survie de 86.40%.

III.8.2.3. Hydrophobicité des surfaces cellulaire

L'adhésion des bactéries probiotiques à la muqueuse intestinale est nécessaire pour le développement des effets bénéfiques pour la santé ; l'estimation de la capacité d'hydrophobicité est souvent liée à l'adhérence et à la colonisation potentielle (**Xiao et al., 2020**). D'après les résultats illustrés dans la **Figure 33**, une différence hautement significative a été trouvée ($P < 0.001$).

Nous remarquons que les pourcentages d'hydrophobicité sont relativement variables d'un solvant à l'autre ; il est compris entre $10.91 \pm 0.003\%$ et $81.14 \pm 0.53\%$ pour *L. plantarum* S10 et 5.34 ± 0.008 et $93.51 \pm 0.60\%$ pour *L. plantarum* BCX1. On constate aussi que ces résultats sont supérieures à ceux du témoin pour les trois solvants (xylène, éthyle acétate et toluène). Ces variations d'hydrophobicité à la surface des cellules sont due à la variation de composition des polymères de surface associés à l'interaction hydrophobe qui sont principalement responsable des propriétés d'adhérence de surface des isolats probiotiques (**Somashekaraiyah et al., 2019 ; Rodríguez-Sánchez et al., 2021**).

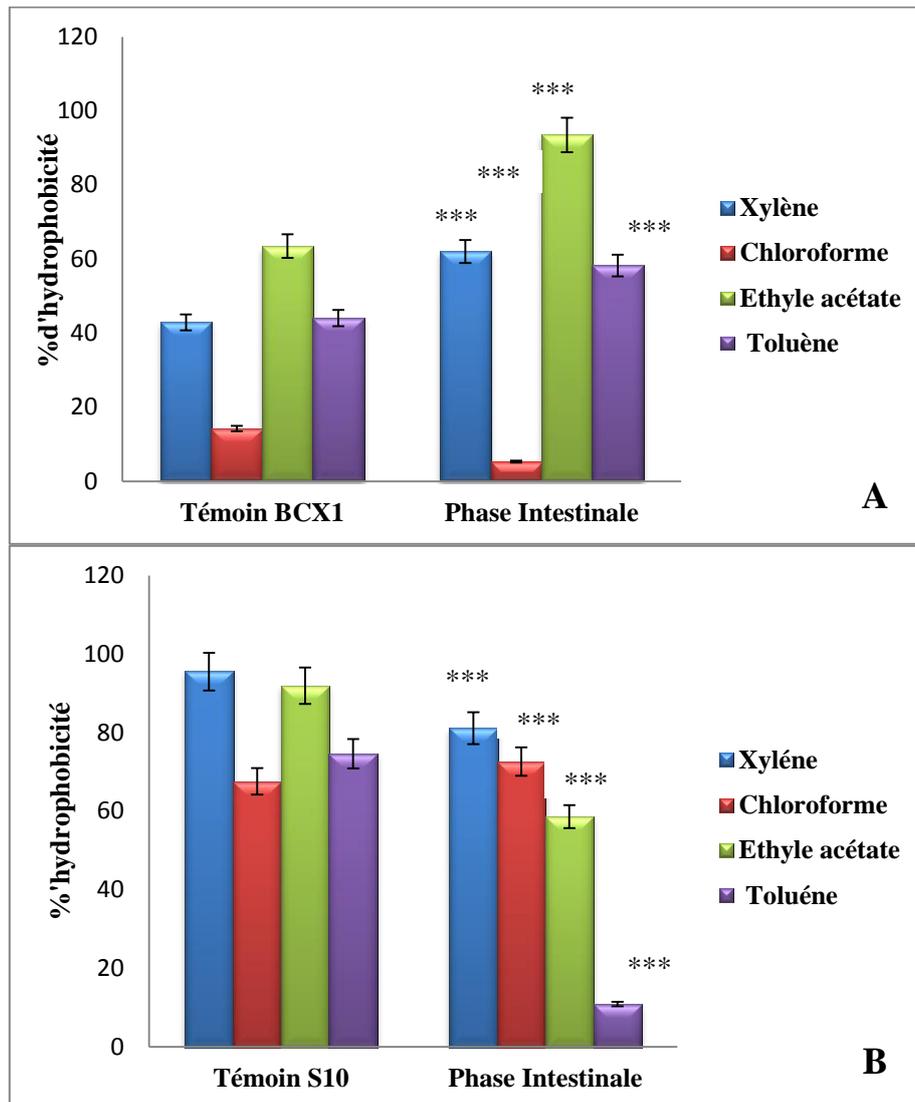


Figure 33. Pourcentage d'hydrophobicité intestinale des souches de *L. plantarum*.

^(A) : *L. plantarum* BCX1 , ^(B) : *L. plantarum* S10.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

III.8.2.4. Auto-agrégation et co-agrégation

La propriété d'autoagrégation est une caractéristique importante de l'adhésion et la colonisation des probiotiques du tractus gastro-intestinal humain (Mallappa *et al.*, 2019). D'après les résultats illustrés dans la Figure 34, nous remarquons que les taux d'autoagrégation de *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 dans le compartiment intestinal sont de $73.67 \pm 0.06\%$, $34.17 \pm 0.04\%$ respectivement. Ces valeurs sont inférieures à ceux des témoins et le taux d'autoagrégation est toujours supérieur à 80% pour *L. plantarum* S10.

Nos résultats sont meilleurs à ceux trouvés de Hernández-Alcàntara *et al.* (2018) et Topçu *et al.* (2020), qui ont testé le potentiel d'adhésion de souches de *Lactobacillus* à l'épithélium intestinal et ils ont trouvé que le taux d'autoagrégation était entre 10.75 et 17.62%. Ces résultats peuvent être

expliqués par la présence de plusieurs récepteurs extracellulaires avec des interactions complexes dans des conditions *in vivo* dans l'intestin humain.

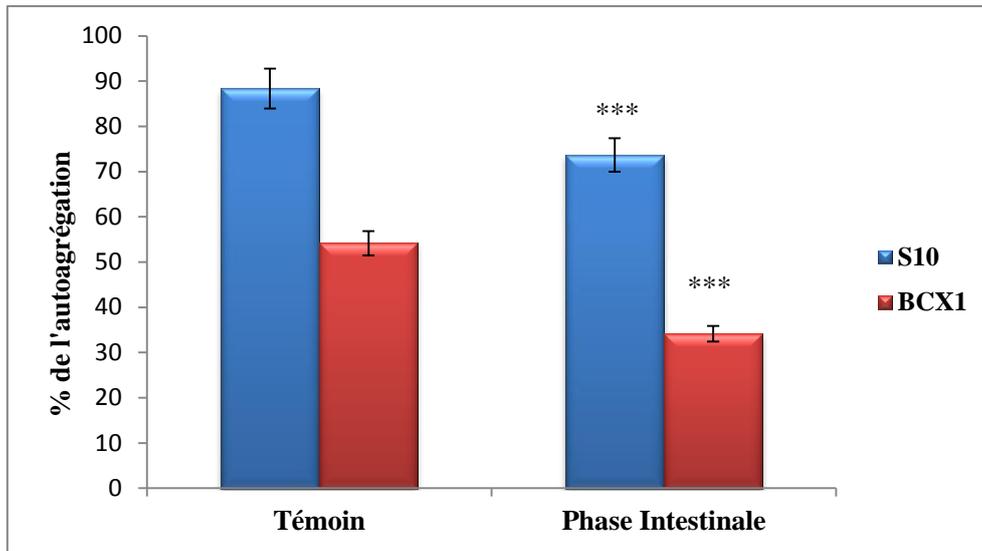


Figure 34. Pourcentage d’autoagrégation des souches de *L. plantarum* après la digestion bucco-gastro-intestinale

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

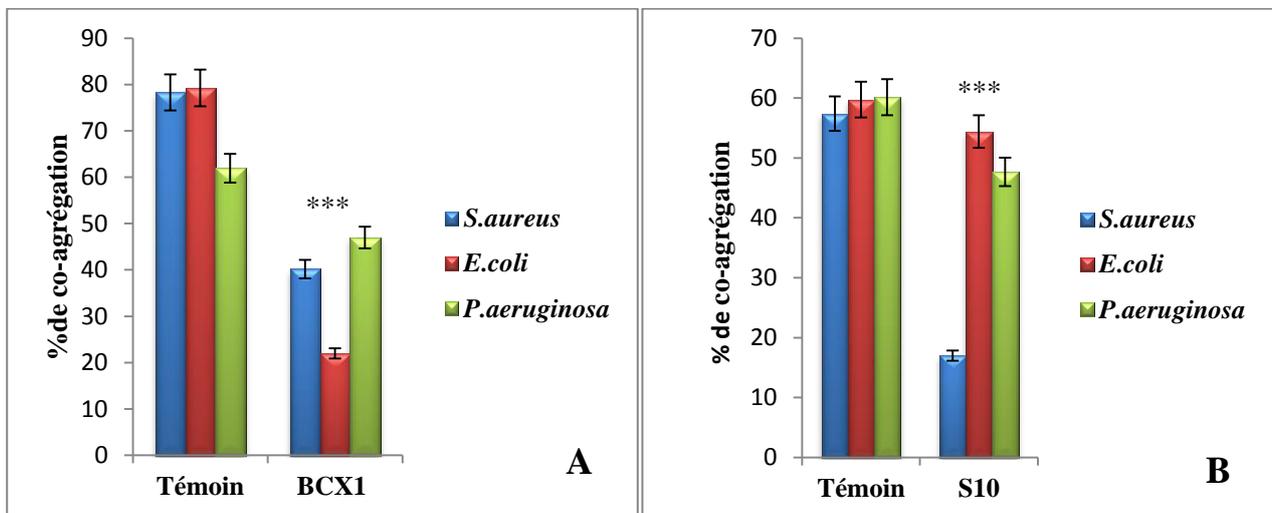


Figure 35. Pourcentage de la co-agrégation des souches de *L. plantarum* après la digestion intestinale.

^(A): *L. plantarum* BCX1, ^(B) : *L. plantarum* S10.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

En ce qui concerne, la capacité de la co-agrégation, elle est considérée comme une propriété majeure des bactéries probiotiques, grâce à la formation d’une barrière qui empêche la colonisation des micro-organismes pathogènes. D’après les résultats illustrés dans la **Figure 35**, on remarque une diminution des pourcentages de la co-agrégation comparativement à ceux du témoin. En

particulier, notre souche *L. plantarum* S10 qui possède un pourcentage de $54.41 \pm 0.03\%$, $47.67 \pm 0.07\%$ et $17 \pm 0.52\%$ avec *E. coli*, *P.aeruginosa* et *S.aureus* respectivement. Par ailleurs, le pourcentage de la co-agrégation pour *L. plantarum* BCX1 était de $21.95 \pm 0.05\%$, $47 \pm 0.23\%$, $40.18 \pm 0.32\%$ dans l'ordre pour les trois souches pathogènes testées après le processus de la digestion intestinale.

III.8. 3. Activité antioxydante des souches après digestion bucco-gastro-intestinale

III.8.3. 1. Résistance au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 Scavenging Activity)

L'effet de la digestion sur la résistance au peroxyde d'hydrogène est mentionné dans la **Figure 36**. D'après les résultats obtenus, on constate que l'absorbance diminue en fonction de la concentration de peroxyde d'hydrogène et au cours du passage via le tractus gastro-intestinal.

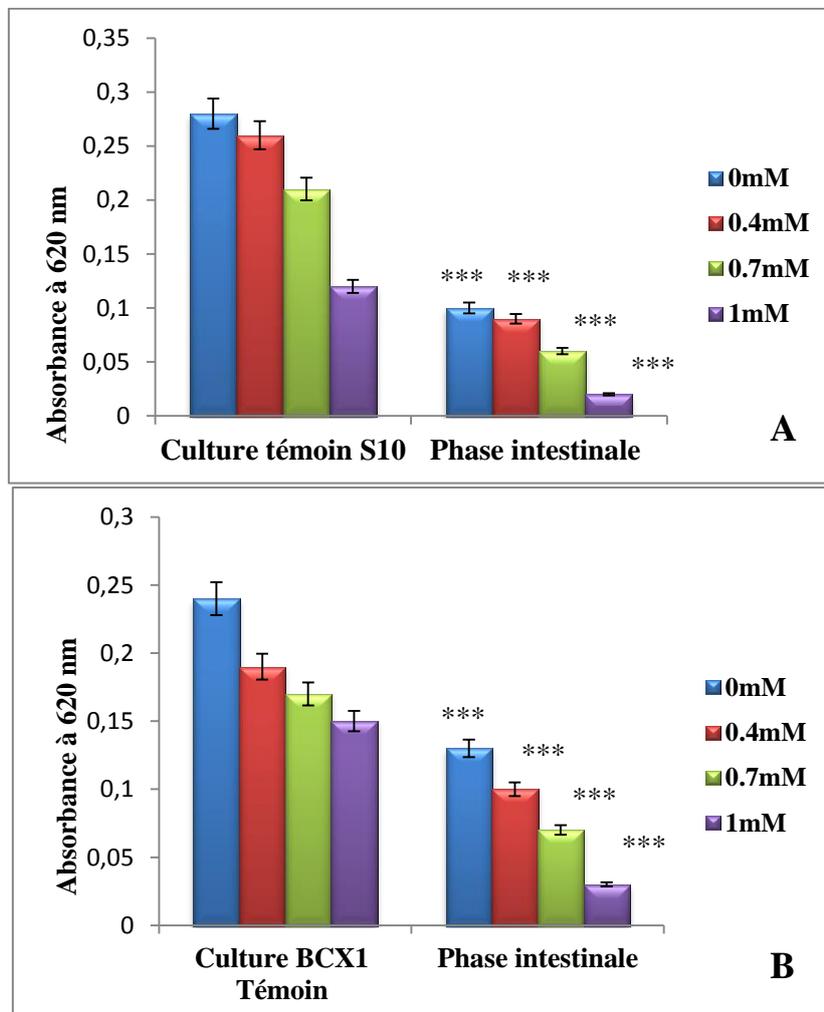


Figure 36. Résistance des souches de *L.plantarum* au peroxyde d'hydrogène après la digestion bucco-gastro-intestinale.

^(A) :*L. plantarum* BCX1 , ^(B) : *L. plantarum* S10.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

Autrement dit, et comparativement au témoin, la résistance aux différentes concentrations d' H_2O_2 a diminué dans les trois compartiments jusqu'à atteindre l'étage intestinal où une valeur de la densité optique de 0.02 ± 0.001 et 0.03 ± 0.004 pour *L.plantarum* S10 et *L.plantarum* BCX1 respectivement a été notée.

III.8.3.2. Activité de piégeage des radicaux libres de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Les résultats du taux d'inhibition des radicaux libres (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) sont illustrés dans la **Figure 37**. Les différences sont statistiquement hautement significatives ($p < 0.001$).

D'après les résultats précédemment mentionnés dans la **Figure 37**, et en se référant au taux d'inhibition des cellules témoins ; nous constatons que l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH est plus appréciable et importante dans la phase orale et au cours du passage vers la phase intestinale passant par la phase gastrique, le taux d'inhibition diminue pour atteindre un taux d'inhibition de $49.54 \pm 0.04\%$, $51.17 \pm 0.40\%$ pour *L. plantarum* BCX1 et *L. plantarum* S10 respectivement.

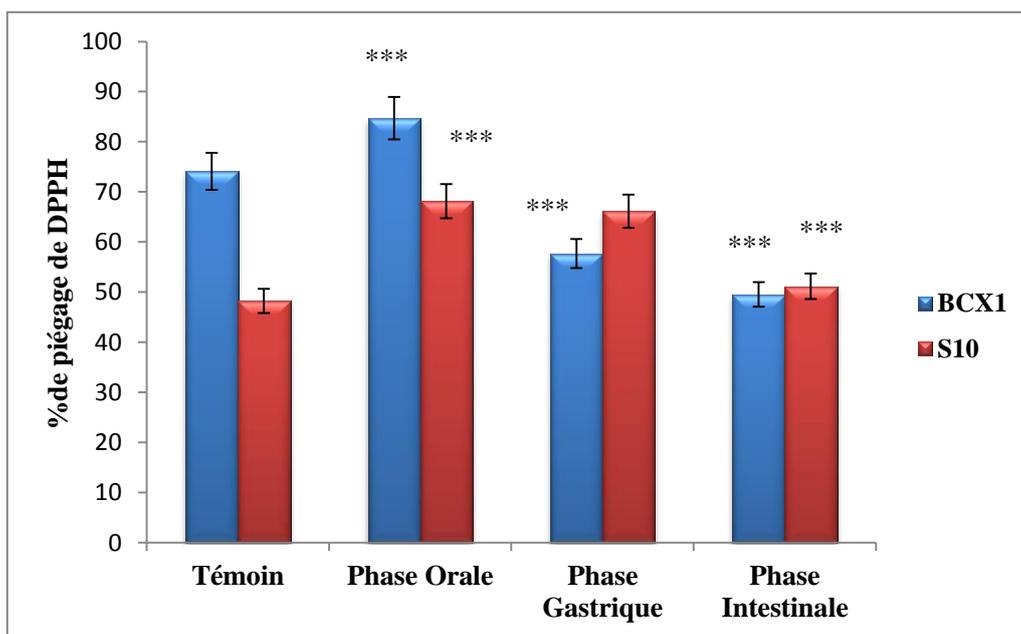


Figure 37. Pourcentage de piégeage des radicaux DPPH par les souches de *L.plantarum* après digestion bucco-gastro-intestinale.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

Nos résultats sont meilleurs de ceux trouvés par **Gharbi et al. (2019)** ayant testés la capacité des souches probiotiques à piéger les radicaux libres au niveau intestinal et ils ont montré que la souche *L. plantarum* avait un taux d'inhibition compris entre 35.8% et 38%. Ces variables des résultats peuvent être dus à la présence des protéines ou des polysaccharides au niveau des surfaces

cellulaires. Cependant, l'élimination de ces composés à la surface des cellules entraîne une diminution de la capacité à atténuer les radicaux libres ; d'une manière générale le passage de la souche dans le tractus gastro-intestinal peut être affecté par les différentes conditions hostiles, provoquant la perte cellulaires, ce qui conduit à une diminution de l'activité antioxydante.

III.8.3.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles

L'effet de la digestion *in vitro* sur l'activité de piégeage des radicaux hydroxyles des souches au cours de passage est illustré dans la **Figure 38**.

Les différences sont statistiquement hautement significatives ($P < 0.001$). Nous remarquons que la capacité de piégeage des radicaux hydroxyles a diminué au cours du passage dans le tractus gastro-intestinal. Le taux d'inhibition est abaissé vers $32.43 \pm 0.45\%$, $76.55 \pm 0.03\%$ au niveau buccal, de $28.46 \pm 0.22\%$, $62.33 \pm 0.39\%$ au niveau gastrique et le taux atteint $21.30 \pm 0.34\%$, $45.42 \pm 0.09\%$ au niveau intestinal pour *L.plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 respectivement et ce après 4h de digestion.

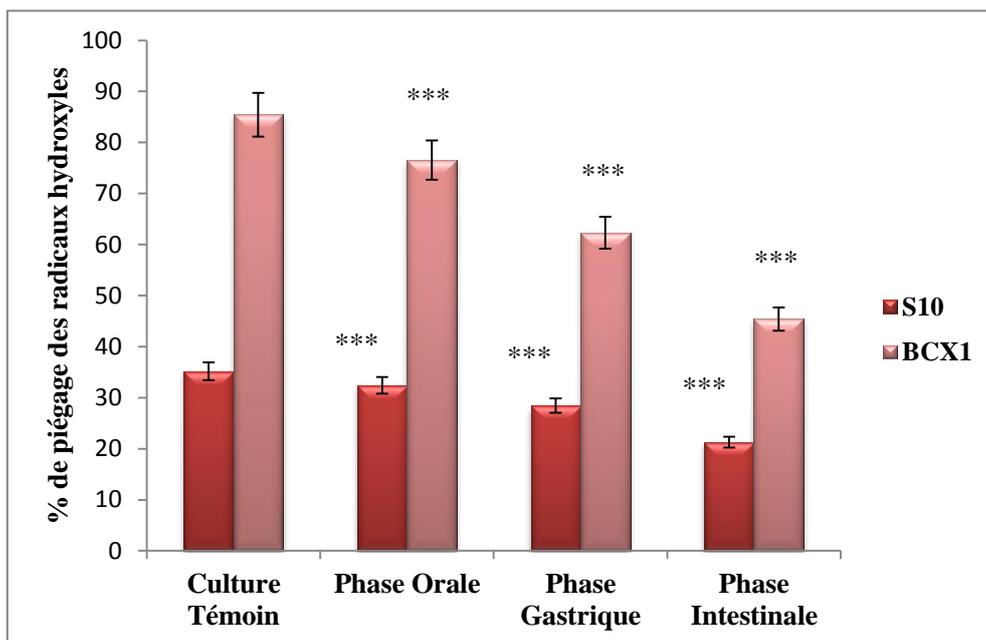


Figure 38. Pourcentage de piégeage des radicaux hydroxyles par *L.plantarum* après digestion bucco-gastro-intestinale.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

III.9. Digestion bucco-gastro-intestinale de jus et de l'extrait

Ce test a pour objectifs, d'évaluer la stabilité, la bioaccessibilité des polyphénols ainsi que l'activité antioxydante après chaque phase de la digestion.

III.9.1. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes

L'effet de la digestion bucco-gastro-intestinale sur la bioaccessibilité des composés actifs (polyphénols, flavonoïdes) est présenté sur les **Figures 39** et **40**.

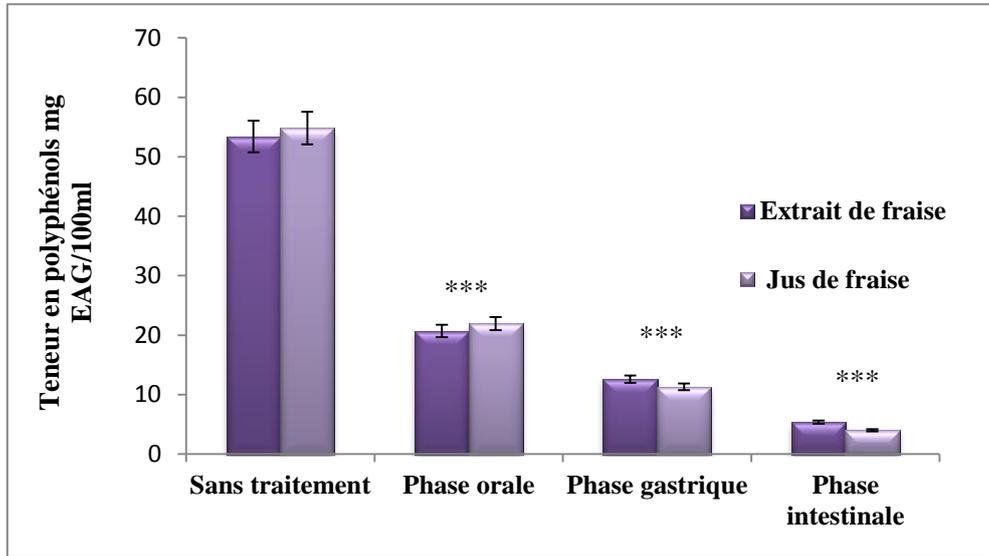


Figure 39. Teneur en polyphénols après la digestion bucco-gastro-intestinale.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

Selon l'histogramme mentionné sur la **Figure 39**, on remarque une diminution continue de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes après le passage dans chaque étage digestif.

La proportion des polyphénols pouvant arriver à l'intestin pendant la digestion bucco-gastro-intestinale est de 10.11% (5.4 ± 0.004 mg EAG/100ml) et 7.33% (4.02 ± 0.001 mg EAG/100ml) pour l'extrait et le jus de fraise respectivement (c'est la fraction potentiellement biodisponible).

Dans le cas des flavonoïdes, nous constatons que la fraction biodisponible dans le jus de fraise au niveau intestinal ($78.36 \pm 0.08 \mu\text{g EQ}/100\text{ml}$) est plus importante que celle de l'extrait atteignant environ 25.09% ($130.23 \pm 0.06 \mu\text{g EQ}/100\text{ml}$) (**Figure 40**).

D'après les résultats obtenus on peut conclure que, la présence des composés phénoliques dans une matrice alimentaire n'implique pas nécessairement, une facilité d'absorption ou de biodisponibilité (**Ariza et al., 2018**). Néanmoins, cette bioaccessibilité pourrait être principalement influencé par plusieurs facteurs tels que, le traitement des fruits et légumes, mais également la désintégration de la matrice alimentaire par la mastication, les interactions avec les constituants des sucs gastro-intestinaux ainsi que les conditions physiologiques de la digestion (**Dufour et al., 2018 ; Scrob, Hosu, et Cimpoi, 2019**).

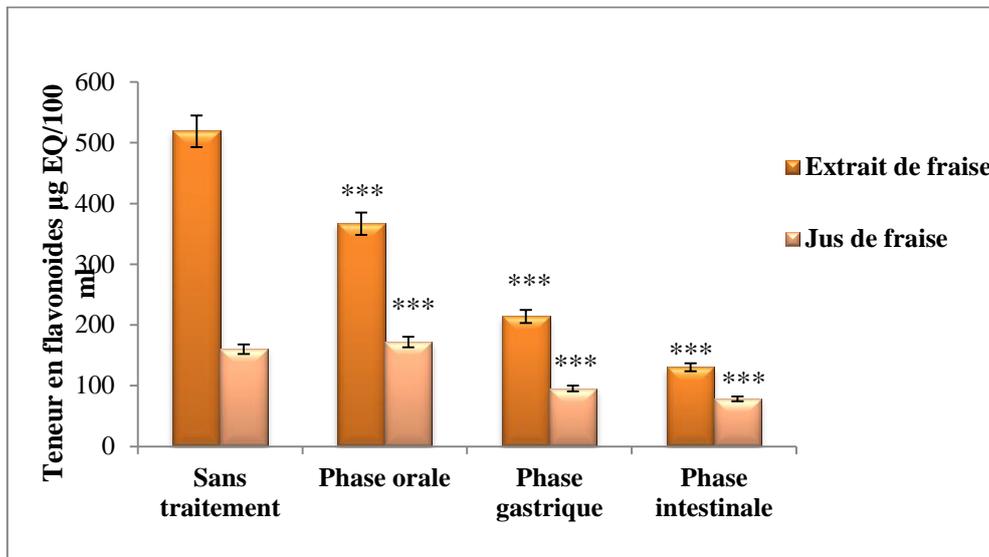


Figure 40. Teneur en flavonoïdes après la digestion bucco-gastro-intestinale.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

III.9.2. Effet de la digestion sur l'activité antioxydante de jus brut et de l'extrait de fraise *in vitro*

L'activité antioxydante de nos échantillons (extraits et jus) est déterminée après chaque phase digestive, comme présenté dans la **Figure 41**.

L'activité de piégeage des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) de jus et d'extrait a diminué après chaque phase de digestion pour atteindre dans la phase intestinale avec un pourcentage de piégeage de $29.01 \pm 0.08\%$ et $17.32 \pm 0.06\%$ pour le jus et l'extrait de fraise respectivement.

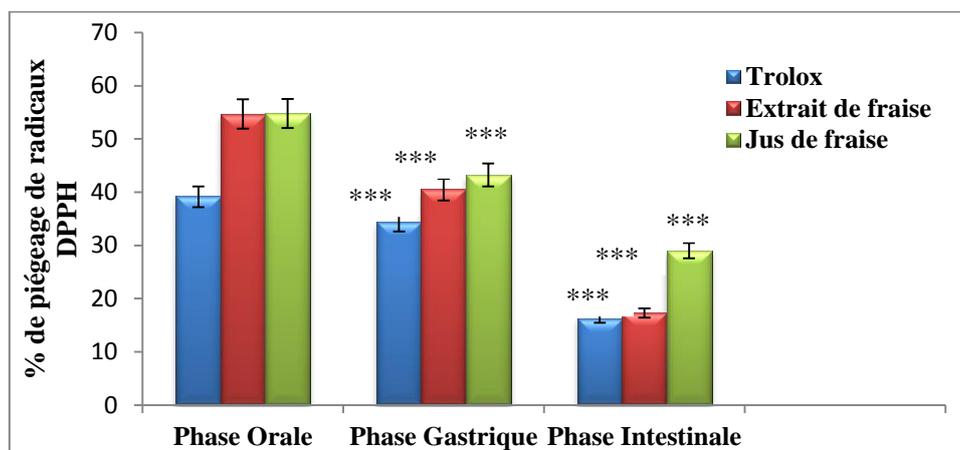


Figure 41. Pouvoir de piégeage des radicaux DPPH d'extrait et de jus après la digestion bucco-gastro-intestinale.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

Par ailleurs, pour le cas du trolox qui est utilisé comme un standard, le taux de piégeage de radicaux DPPH après la phase intestinale était de $16.28 \pm 0.05\%$, c'est-à-dire inférieur au pourcentage observé avec l'extrait et le jus de fraise.

En effet, nos résultats sont en accords avec ceux trouvés par **Burgos-Edwards et al. (2017)** et **Thomas-Valdés et al. (2019)**, qui ont obtenus une diminution de la capacité de piégeage du radical libre DPPH tout au long du processus de digestion. Une autre étude de **Correa-Betanzo et al. (2014)** ont signalé une diminution de l'activité avec une valeur de 51% et 6% après digestion gastrique et intestinale, respectivement. Il est intéressant de noter que certains auteurs ont signalé une augmentation des valeurs de DPPH après la phase gastrique, suivies d'une diminution à la fin de l'étape intestinale. Ces résultats pourrait également être justifiées par les effets synergiques entres les diverses classes d'antioxydants présents dans l'extrait et le jus de fraise (composés phénoliques, flavonoïdes, tanins, caroténoïdes, etc.) (**Thomas-Valdés et al., 2018**).

Pour le pouvoir réducteur du fer, les résultats du pouvoir réducteur de l'extrait et de jus de la fraise après la digestion bucco-gastro intestinale sont illustrés dans la **Figure 42** avec des différences hautement significatives ($p < 0.001$).

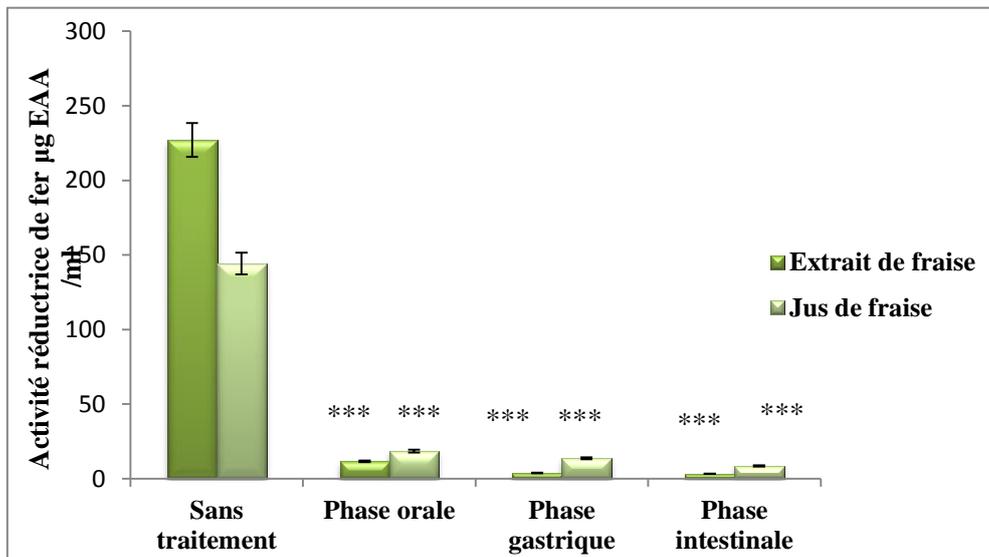


Figure 42. Pouvoir réducteur après la digestion bucco-gastro-intestinale.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

D'après nos résultats (**Figure 42**), on observe une chute brutale de cette propriété pour l'extrait de fraise pour atteindre une valeur de 3.33 ± 0.03 µg EAA/ml (taux de perte est de 76.53%) dans la phase intestinale. Cependant, comparativement à l'extrait, le pouvoir réducteur du fer du jus est mieux préservé après le passage gastro-intestinal. Nous constatons que le jus de fraise a un pouvoir de 8.54 ± 0.005 µg EAA/ml (niveau intestinale). Des résultats similaires ont été observés pour les

groseilles sauvages (**Burgos-Edwards et al., 2017**), la fraise (**Thomas-Valdés et al., 2018**), et les différentes variétés de pommes soumises à la digestion *in vitro* (**Bouayed, Hoffmann, & Bohn, 2011**), ces chercheurs ont obtenus une diminution de 45% du pouvoir réducteur à la fin de la phase gastrique, suivie d'une nouvelle perte de 6% après la phase intestinale.

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que le pouvoir réducteur et anti-radicalaire des fruits est étroitement lié aux variations quantitatives et qualitatives en composés phénoliques (**Scrob, Hosu, et Cimpoi, 2019**).

III.10. Digestion *in-vitro* des deux combinaisons « bactéries /extraits », « bactéries/ jus »

III.10.1. Aptitudes probiotiques des *L. plantarum* dans la matrice

III.10.1.1. Survie et viabilité des *L. plantarum*

Les résultats de la viabilité des souches étudiées en combinaison avec l'extrait et le jus de fraise après chaque phase de digestion sont groupés dans la **Figure 43**.

La viabilité bactérienne est améliorée en présence de jus et d'extrait de fraise par rapport à la culture seule au cours de la digestion. Il apparaît que la survie en présence du jus est meilleure à celle en présence des extraits. En phase intestinale, le nombre de population cellulaire est de 145×10^9 UFC /ml et de 40×10^9 UFC/ ml pour le jus de fraise ; alors qu'un nombre de cellules de 43×10^9 UFC/ml est obtenu avec l'extrait de fraise et 39×10^9 UFC/ml dans l'ordre de *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 respectivement.

Ces résultats peuvent être dus à l'effet stimulateurs des polyphénols sur la croissance des probiotiques dont des études ont indiqué que l'effet des composés phénoliques dépend de la forme et le type des polyphénols et leur concentration dans le milieu, ainsi que la sensibilité et la susceptibilité de la souche bactérienne (**Gwiazdowska et al., 2015**).

Une étude menée par **Rastmanesh (2011)**, a montré que l'administration de *L. paracasei* en association avec des fructooligosaccharides (principal prébiotique dans l'alimentation) dans le jus d'orange a augmenté le nombre de *Lactobacillus*.spp.et *Bifidobacterium* spp. Par ailleurs, **China et al. (2012)**, ont montré que l'extrait phénolique de grignons de raisin (1 mg/ml) a induit une augmentation de la biomasse de *L. acidophilus*.

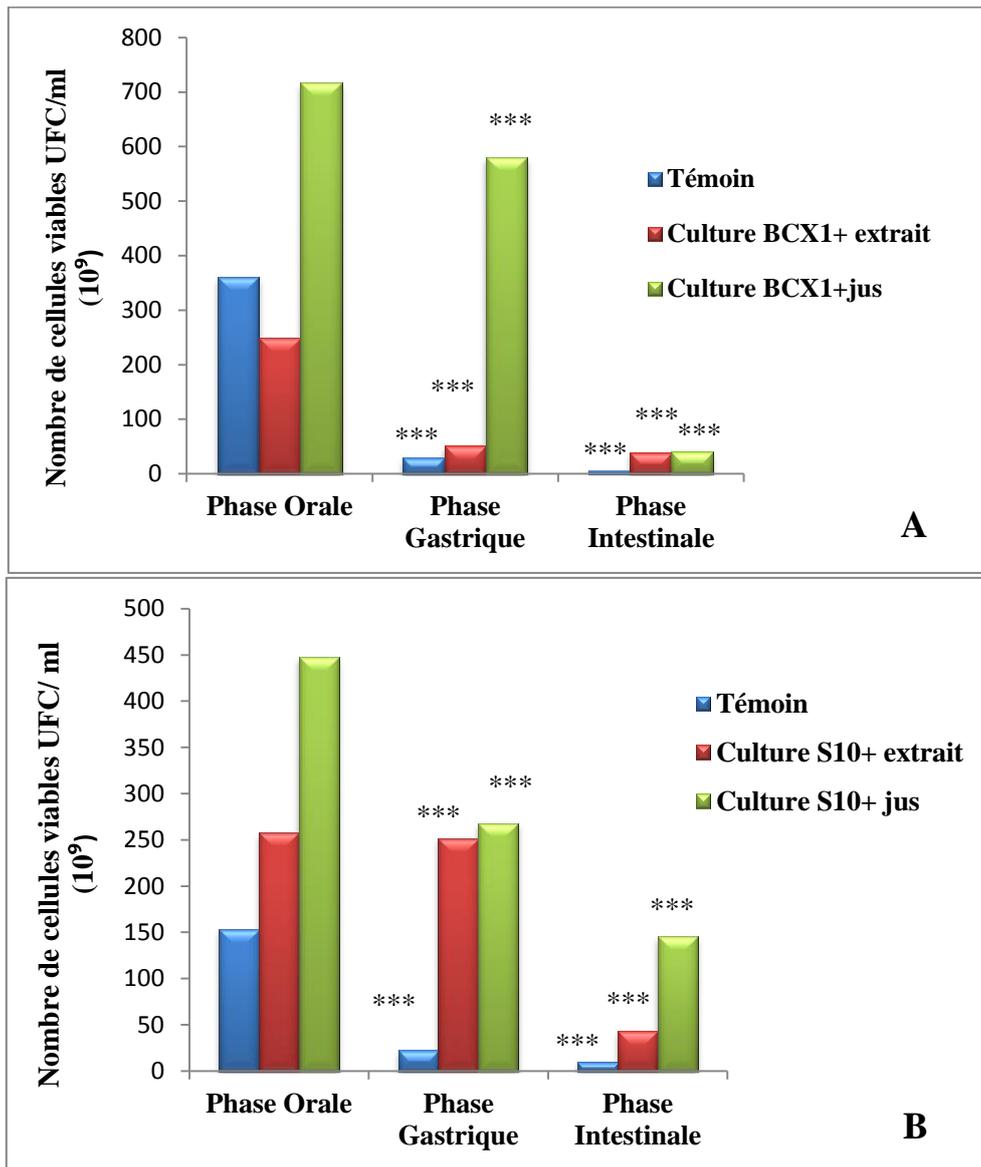


Figure 43. Nombre de cellules viables de *L. plantarum* après la digestion.
 (A) : *L. plantarum* BCX1; (B) : *L. plantarum* S10.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

III.10.1.2. Résistance au pH gastrique

Les souches de *L. plantarum* ont été évaluées pour leur capacité à survivre dans des milieux aux bas pH, lorsqu'elles sont véhiculées par les matrices végétales et leurs extraits (jus et extrait de fraise).

Comme il est montré sur la **Figure 44**, la survie et la viabilité des souches de *L. plantarum* véhiculé par la matrice végétale (extrait et jus de fraise) après exposition aux bas pH pendant 2 heures sont améliorées de manière hautement significative par rapport à celles du témoin (culture seule). Le meilleur pourcentage de survie aux conditions acides est observé avec la culture en combinaison avec le jus de fraise où la survie est de $96.52 \pm 0.39\%$; $85.12 \pm 0.04\%$ et $80.70 \pm 0.33\%$ aux pH4, pH 3 et pH2 respectivement pour *L. plantarum* BCX1. Cependant, avec l'extrait de fraise, la viabilité était

de $89.18 \pm 0.44\%$, $76.25 \pm 0.02\%$ et $50.22 \pm 0.09\%$ pour les mêmes valeurs de pH, en effet, nous remarquons que cette viabilité est inférieure à celle trouvée avec les jus. En revanche, des valeurs de $68.87 \pm 0.33\%$; $68.61 \pm 0.02\%$ et $60.10 \pm 0.04\%$ aux pH4, pH3 et pH2 pour *L. plantarum* BCX1 véhiculé par l'extrait de fraise, et de $96.51 \pm 0.08\%$, $83.54 \pm 0.01\%$ et $77.45 \pm 0.12\%$ pour le jus.

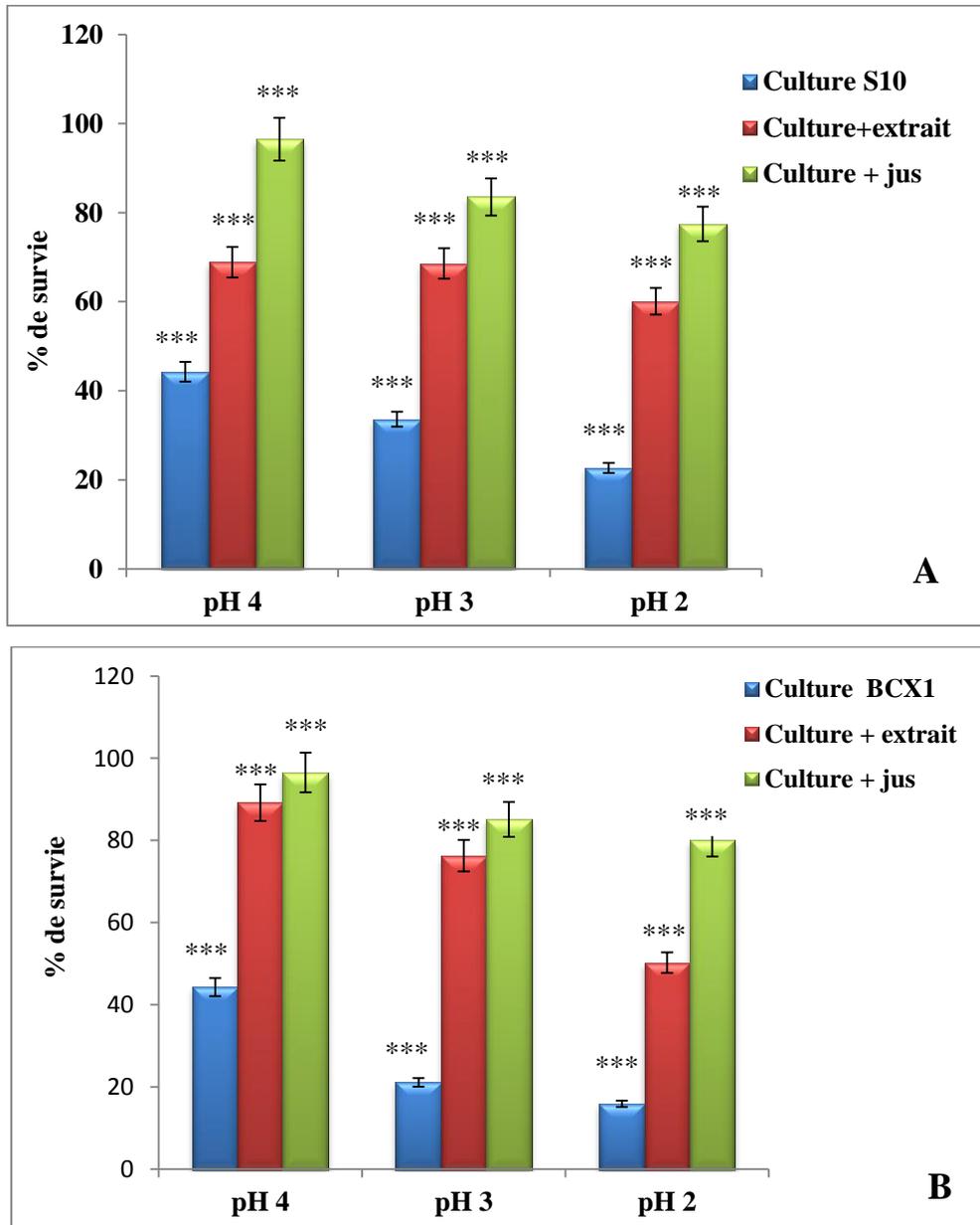


Figure 44. Survie aux bas pH des souches de *L. plantarum* après la digestion (phase intestinale)

(A): *L. plantarum* S10 (B): *L. plantarum* BCX1.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

Les extraits et les jus de fraise exercent un effet protecteur de *L. plantarum* dans des conditions acides, le phénomène pourrait être principalement attribué à la présence de sucres dans les jus et leurs extraits. Dans une étude similaire, **Corcoran et al. (2005)**, ont signalé que la présence de glucose améliore la viabilité des probiotiques en cas d'exposition à des solutions à faible pH, ainsi

les données ont indiqué que le glucose fournit l'ATP à la F₀F₁-ATPase via la glycolyse, ce qui permet l'exclusion des protons et améliore ainsi la survie pendant le transit gastrique.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Aboufazli et Baba en 2015**, qui ont démontré que l'incorporation des probiotiques (*L. plantarum*) avec des matrices alimentaires (végétales) pouvait représenter une stratégie pour promouvoir la tolérance à l'acidité au cours du processus de digestion.

III.10.1.3. Résistance aux sels biliaries

Les résultats de la résistance de *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 aux sels biliaries véhiculés par une matrice végétale après la digestion bucco-gastro-intestinale sont illustrés dans la **Figure 45**.

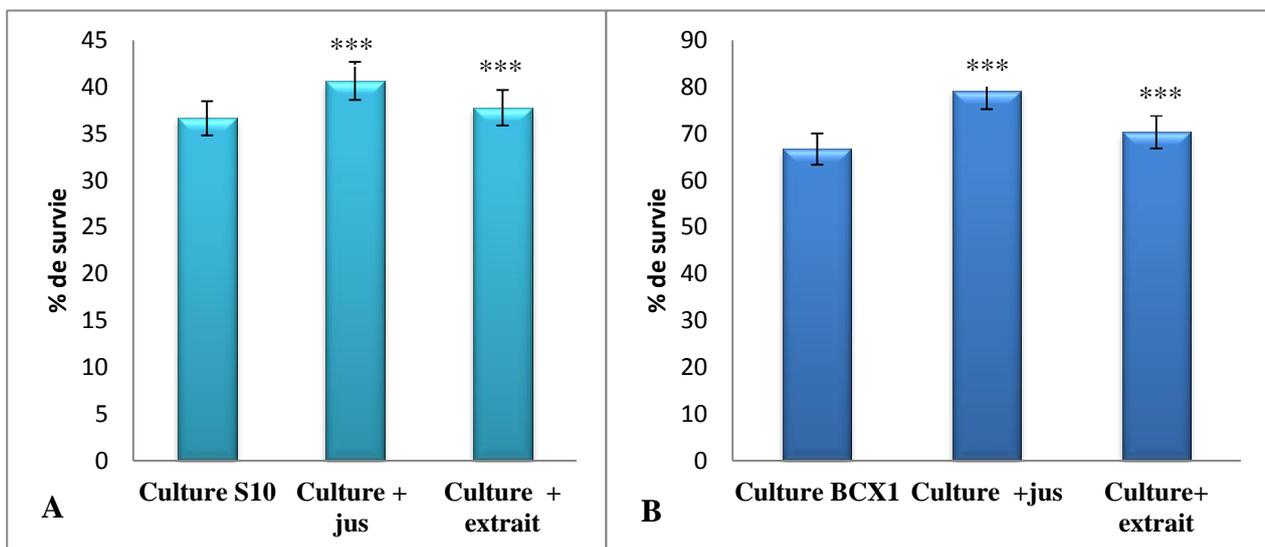


Figure 45. Survie en présence de 0.3% de sels biliaries des souches de *L. plantarum* combinée aux matrices après la digestion (phase intestinale).

^(A): *L. plantarum* S10, ^(B): *L. plantarum* BCX1.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

D'après l'histogramme, on observe que le pourcentage de survie des souches étudiées après l'exposition à 0.3% de sels biliaries durant 4 heures est amélioré de manière hautement significative ($p < 0.001$) comparativement au témoin. Il est clair que la culture combinée aux jus présente une meilleure survie par rapport à la culture combinée à l'extrait dont le pourcentage de survie de *L. plantarum* BCX1 véhiculé par le jus de fraise est de l'ordre de $79.20 \pm 0.03\%$ alors que dans le cas de *L. plantarum* S10, il est de $40.62 \pm 0.08\%$. En outre, la présence de cette dernière dans l'extrait donne un taux de survie respectif de $37.77 \pm 0.04\%$ et $70.33 \pm 0.01\%$ pour l'extrait de fraise. Ces résultats sont proches à ceux trouvés par **Xia et al. 2021**, qui montra que *L. plantarum* ATCC 8014 possède

une excellente résistance aux conditions de liquide intestinal in vitro en présence de la matrice végétale.

III.10.1.4. Hydrophobicité des surfaces cellulaires

Les résultats de l'hydrophobicité des souches en présence des matrices végétales (jus et extrait de fraise) sont représentés dans la **Figure 46**.

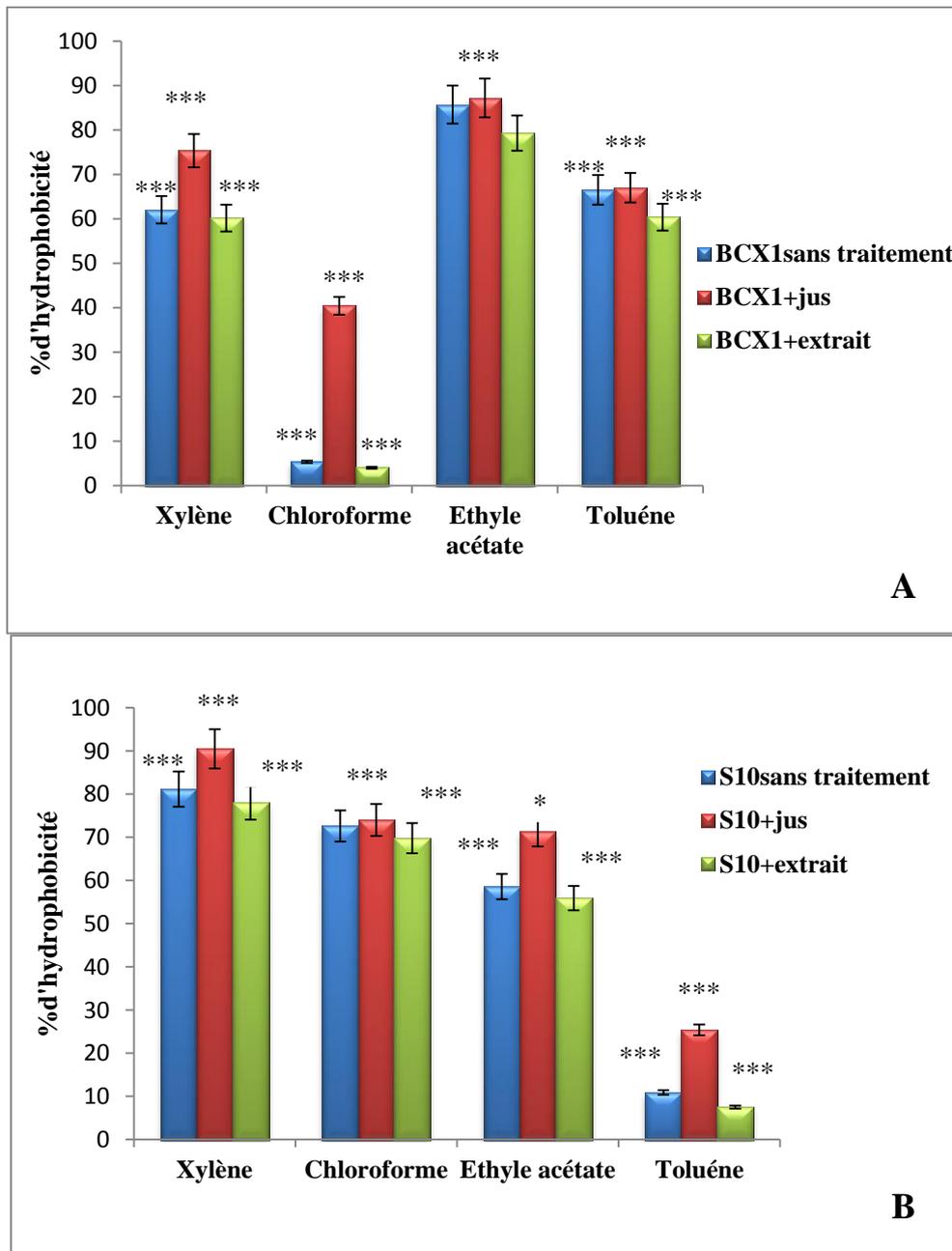


Figure 46. Pourcentage d'hydrophobicité intestinale des souches de *L. plantarum*.

(^A): *L. plantarum* BCX1, (^B): *L. plantarum* S10.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$). * :

Différences significatives ($p < 0.05$)

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les pourcentages d'hydrophobicité sont relativement variables d'un solvant à l'autre et d'une souche à l'autre. L'hydrophobicité des souches étudiées varie entre $4.0 \pm 0.007\%$ et $90.50 \pm 0.48\%$. Cependant, une forte affinité pour le xylène avec un pourcentage de $90.5 \pm 0.34\%$, $78 \pm 0.03\%$ a été obtenue avec *L. plantarum* S10 véhiculé avec le jus et l'extrait de fraise respectivement, par contre, *L. plantarum* BCX1 possède une meilleure affinité pour l'éthyle acétate ($87.2 \pm 0.02\%$, $79.3 \pm 0.05\%$). Le taux d'hydrophobicité augmente de manière significatif pour les autres solvants ($p < 0.001$) comparativement au témoin. Ces résultats pouvant être comparés à ceux des différents travaux réalisés dans le même contexte, principalement celui de **Mallappa et al. (2019)** qui ont évalué certains isolats de *Lactobacillus* pour leur capacité à se lier aux différents solvants organiques dont les résultats publiés ont montré un pourcentage supérieure à 80% avec tous les solvants.

Une étude menée par **Khalil, (2010)** a montré que les cellules adaptées à l'acide gallique sont plus hydrophobes pour tous les solvants testés et présentaient la plus forte affinité pour le xylène (65%), cela peut être dû à la production d'une quantité plus élevée d'exopolysaccharides capsulaires.

III.10.1.5. Capacité d'auto-agrégation

La capacité d'auto-agrégation de la souche en présence des matrices végétales est présentée dans la **Figure 47**. D'après les résultats obtenus, l'effet matrice a donné des différences hautement significatives ($p < 0.001$) avec une amélioration de l'auto-agrégation lorsque la souche est combinée au jus de fraise un pourcentage de $92.78 \pm 0.12\%$ et $56.02 \pm 0.33\%$ pour *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 respectivement. En outre, concernant l'extrait du même fruit des valeurs de $88.50 \pm 0.22\%$ et $40.22 \pm 0.34\%$ a été observées.

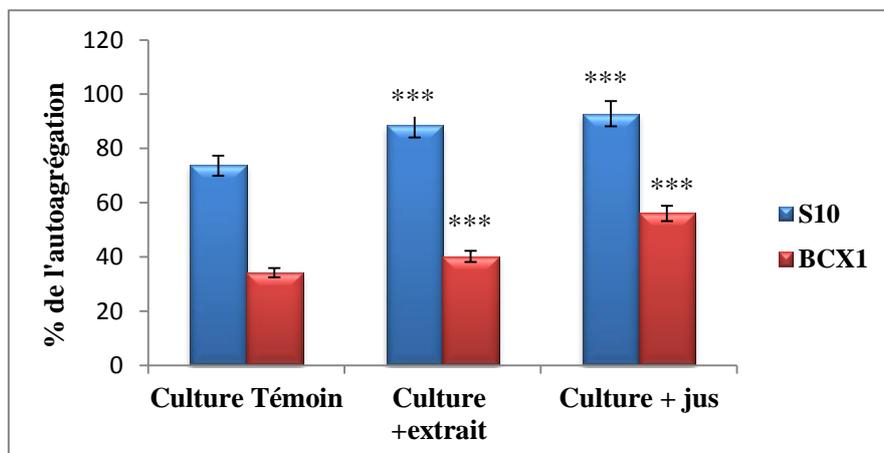


Figure 47. Capacité d'auto-agrégation des souches de *L. plantarum* en présence de matrice végétale (niveau intestinal).

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

Nos résultats rejoignent ceux trouvés par **Parker et al. (2008)**, qui ont démontré qu'une concentration comprise entre 30-100 µg/ml de polyphénols améliore la capacité d'auto-agrégation des probiotiques, et donc une amélioration de l'adhésion des probiotiques au niveau intestinal. Cependant, d'après ces auteurs, le mécanisme par lequel les polyphénols influencent l'adhésion aux cellules de l'intestin n'est pas encore complètement compris.

III.10.1.6. Capacité de la co-agrégation

D'après les résultats illustrés dans la **Figure 48**, nos souches (*L.plantarum* S10 et *L.plantarum* BCX1) présentent une augmentation de la capacité de co-agrégation lorsqu'elles sont véhiculées par les deux matrices végétales (jus et extrait de fraise).

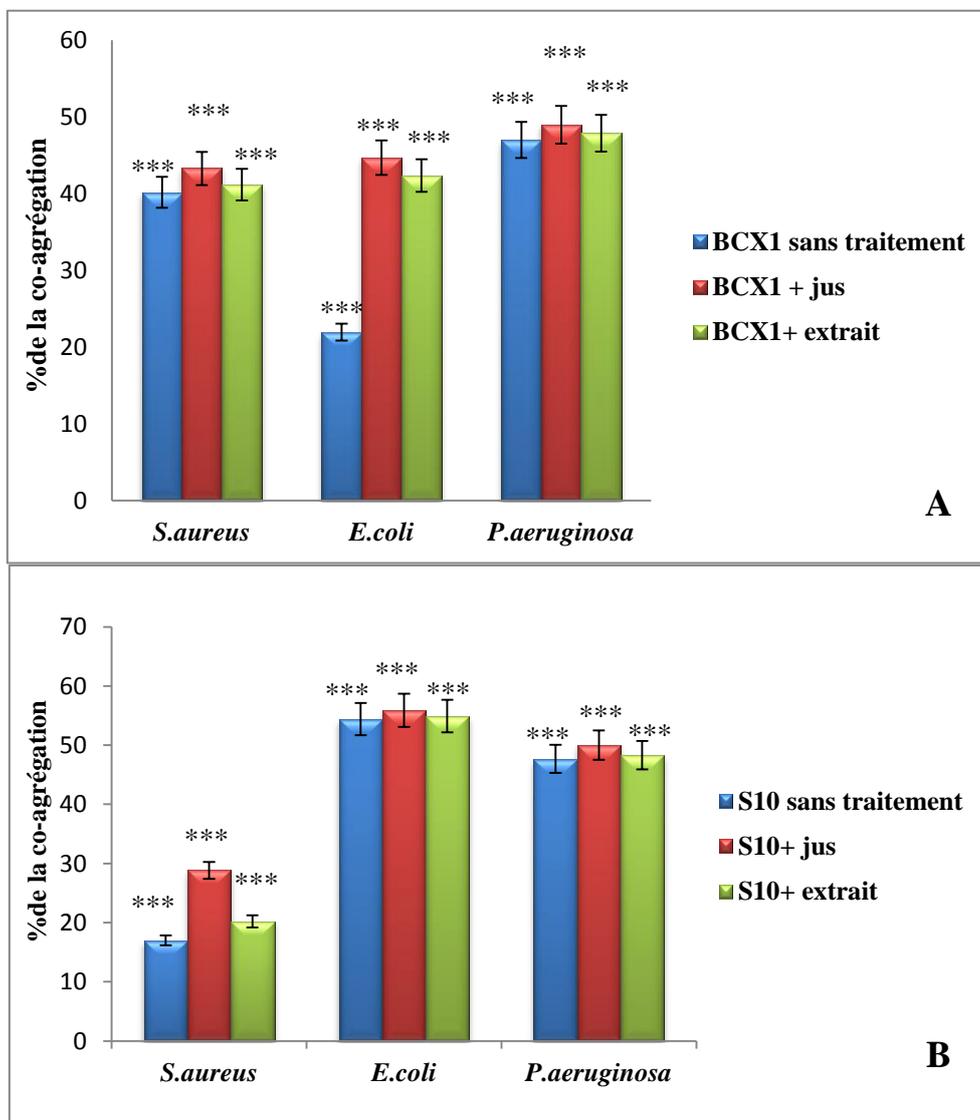


Figure 48. Pourcentage de la co-agrégation des souches de *L. plantarum* après la digestion intestinale.

(^A): *L. plantarum* BCX1, (^B): *L. plantarum* S10.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives (p < 0.001).

En effet, les résultats de cette capacité des souches véhiculées avec le jus sont meilleurs que ceux obtenus avec l'extrait de fraise. Le pourcentage de co-agrégation le plus élevée pour *L. plantarum* S10 (véhiculé avec le jus de fraise) est celui obtenu avec *E.coli* ($55.90\pm 0.005\%$), suivie par *P.aeruginosa* ($50.01\pm 0.003\%$) et *S.aureus* ($28.81\pm 0.03\%$). Cependant, *L. plantarum* BCX1 a une meilleure capacité de co-agrégation avec *P.aeruginosa* ($49.00\pm 0.09\%$). Donc, il s'agit d'une capacité positive d'inhibition des pathogènes dans le TGI.

Nos résultats sont identique à de nombreuses études qui révèlent que la présence de la matrice végétale (extrait et jus de fraise) augmente de manière significative la capacité de la co-agrégation des espèces de *Lactobacillus*, notamment, *Limosilactobacillus reuteri* et *Lactobacillus acidophilus* et donc la formation d'une barrière de défense qui empêchent la colonisation des agents pathogènes (Aravind et al., 2021). D'autre part, un nombre croissant des preuves *in vitro* indiquent que l'activité prébiotique des polyphénols de fruit améliore la croissance des bactéries probiotiques, entraîne une diminution de la disponibilité des nutriments pour les bactéries pathogènes, tels que, *E.coli*, *Clostridium perfringens* et *Helicobacter pylori* (Morais et al., 2016 ; Alves-Santos et al., 2020).

III.10.2. Activité antioxydante des souches de *L. plantarum* en combinaison avec la matrice végétale

III.10.2.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ Scavenging Activity)

Les résultats de la capacité de *L. plantarum* en présence de la matrice végétale (extrait et jus de fraise) à résister au peroxyde d'hydrogène après la digestion bucco-gastro-intestinale (phase intestinale) sont regroupés dans la figure ci-dessous.

D'après les résultats obtenus, nous observons qu'il y a une amélioration de la capacité de *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 à résister au peroxyde d'hydrogène en présence de la matrice végétale, sachant que la meilleure résistance est observée dans le cas des combinaisons de la culture avec le jus de fraise. Les différences sont statistiquement significative ($p < 0.001$), avec une survie supérieure à 60%, en présence des jus et des extraits de fraise et cela même en présence d'H₂O₂ à une concentration 1mM.

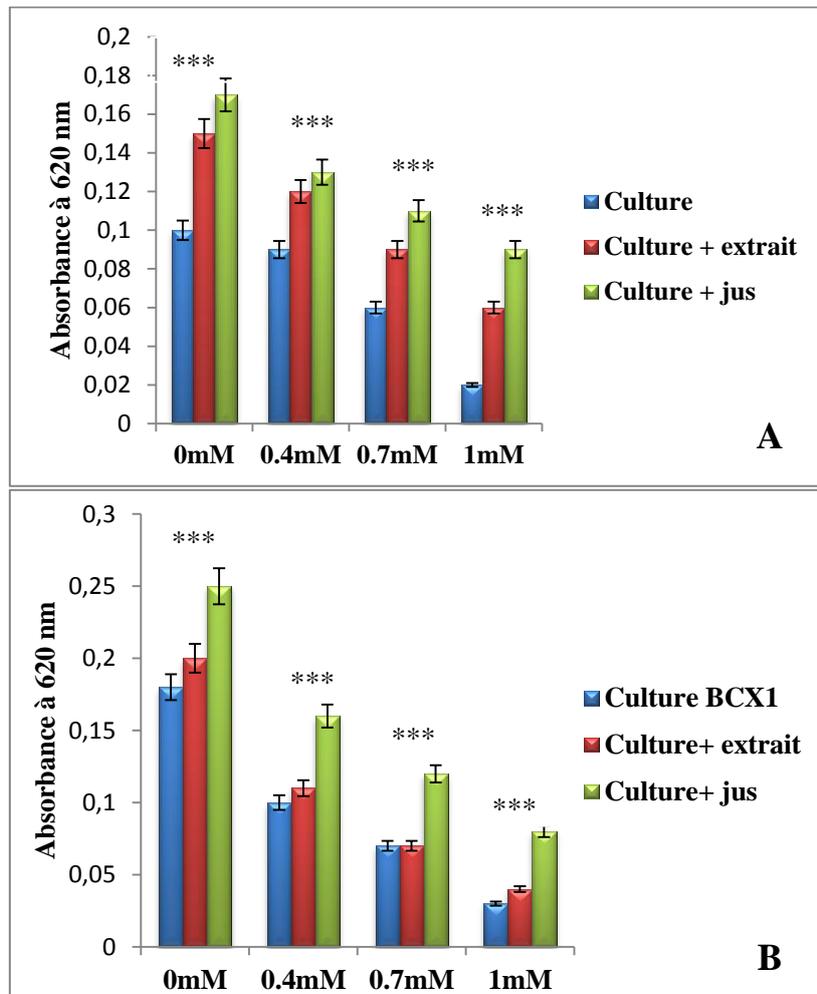


Figure 49. Capacité des souches de *L. plantarum* à résister au peroxyde d'hydrogène au niveau intestinale.

(^A): *L. plantarum* S10; (^B): *L. plantarum* BCX1.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

III.10.2.2. Activité de piégeage de radical de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

L'activité anti-radicalaire des souches probiotiques étudiées en présence des extraits et de jus est illustrée dans la **Figure 50**.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que la capacité de piégeage des radicaux libres de DPPH par les deux souches est mieux améliorée en présence de la matrices végétale (extrait et jus de fraise), par rapport au témoin et au cours des trois phases de digestion (orale ; gastrique ; intestinale). Les différences entre le témoin et les souches combinées avec l'extrait et le jus de fraise en phase de la digestion intestinale sont significatives ($p < 0.05$; $p < 0.01$), avec un pourcentage d'inhibition de $54.30 \pm 0.03\%$ (Culture +extrait de fraise), $64.50 \pm 0.06\%$ (Culture +jus de fraise) pour *L. plantarum* BCX1. Ces résultats sont supérieurs à ceux trouvés avec *L. plantarum* S10 avec un

taux d'inhibition de $51.88 \pm 0.09\%$ (Culture +extrait de fraise) et $52 \pm 0.07\%$ (Culture +jus de fraise). Ces résultats sont meilleurs à ceux de **Barros et al. (2020)**, une diminution de l'activité antioxydante a été observée au cours du processus de digestion en présence de la matrice végétale.

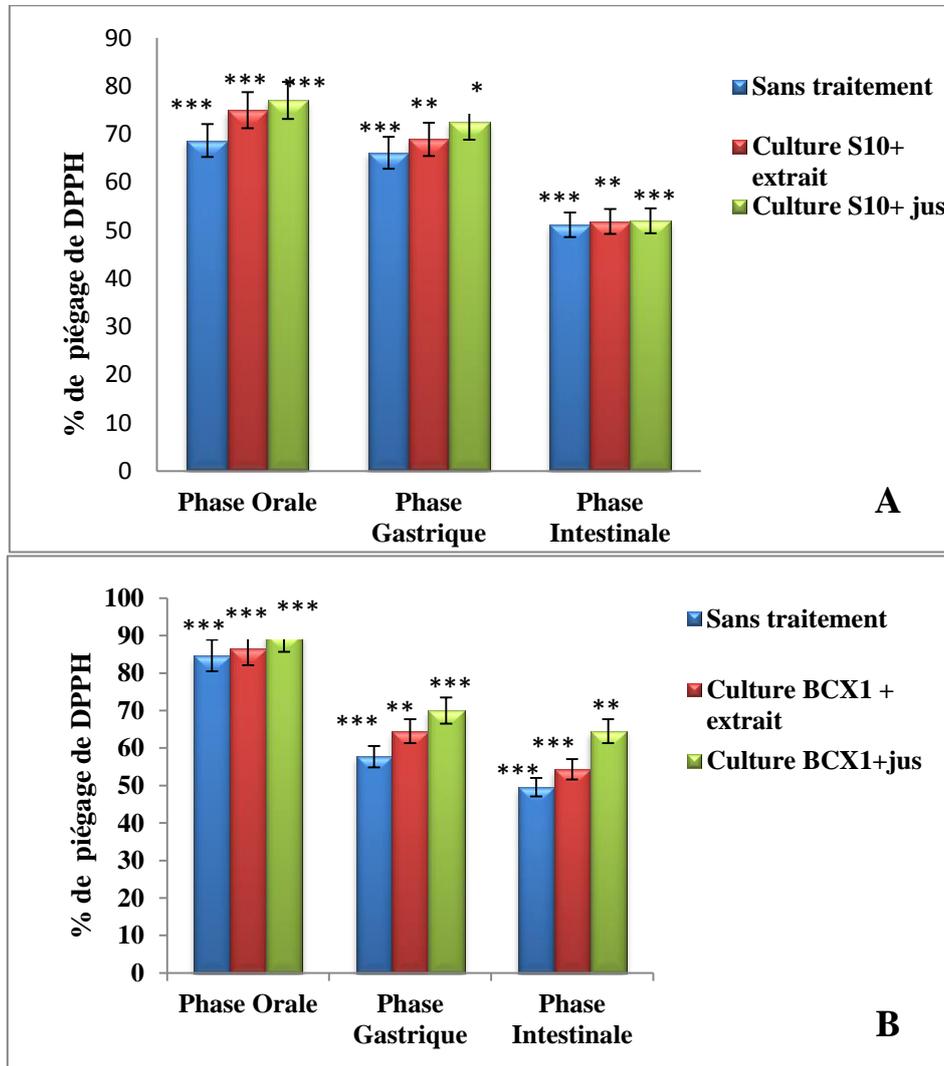


Figure 50. Piégeage de radicaux DPPH par des souches de *L. plantarum* combiné avec la matrice végétale lors de la digestion.

(^A) :*L. plantarum* S10, (^B) : *L. plantarum* BCX1.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$). ** : Différences très significatives ($p < 0.01$). * : Différences significatives ($p < 0.05$).

III.10.2.3. Activité de piégeage du radical hydroxyle

Les résultats de la capacité des souches de *L. plantarum* à piéger les radicaux hydroxyles après la digestion bucco-gastro-intestinale en présence de la matrice végétale (extrait et jus de fraise) sont regroupés dans la **Figure 51**.

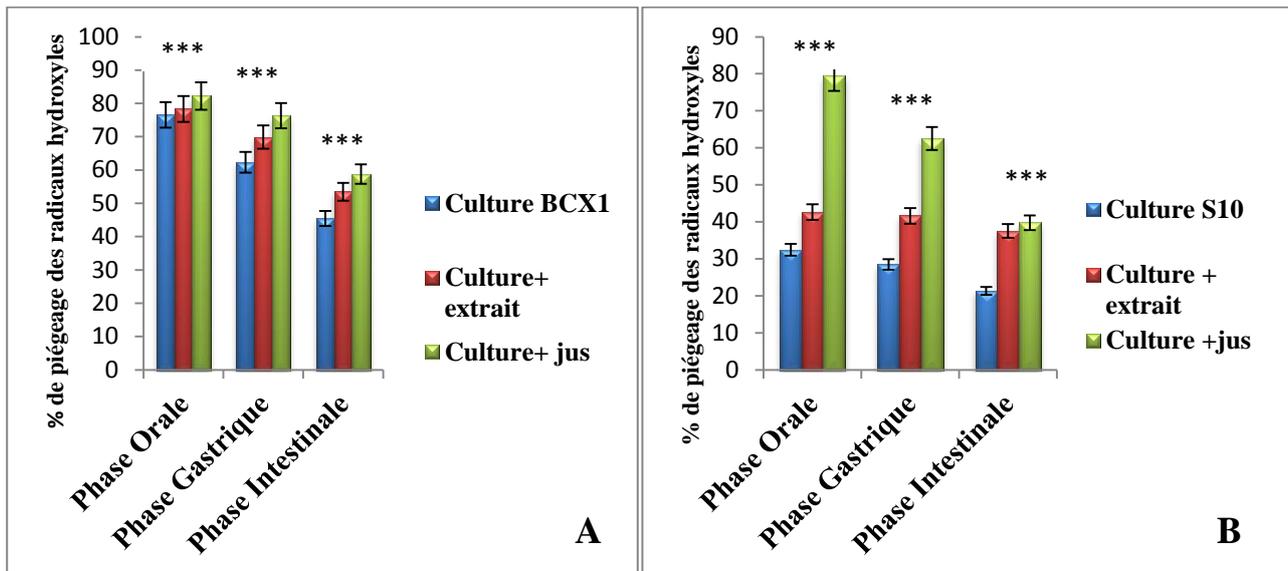


Figure 51. Piégeage des radicaux hydroxyles par les souches de *L. plantarum* combinée avec la matrice végétale lors de la digestion.

^(A) : *L. plantarum* BCX1, ^(B) : *L. plantarum* S10.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

Au vu des histogrammes, il est remarquable qu'il y a une augmentation de la capacité à piéger les radicaux hydroxyles des souches étudiées en présence des matrices végétales (extrait et jus de fraise), comparativement à celles du témoin au cours des trois phases avec des différences hautement significatives ($p < 0.001$). Au niveau de l'étage intestinal, la capacité de piégeage des radicaux hydroxyles en présences de jus est plus élevée par rapport au extrait de fraise et au témoin estimé à $58.77 \pm 0.04\%$, $53.44 \pm 0.009\%$ pour *L. plantarum* BCX1 et $39.77 \pm 0.002\%$, $37.53 \pm 0.08\%$ pour *L. plantarum* S10 respectivement.

Selon **Abd Rahman et al. (2018)**, les extraits et les jus de fraise présentaient un niveau élevé de capacité de piégeage des radicaux libre grâce à la richesse en composés phénoliques qui peuvent avoir des effets antioxydants contre les espèces réactives l'oxygène (ERO). En outre, cette activité peut être due d'une part au métabolisme bactérien des composés phénoliques ce qui indique une génération des molécules hautement antioxydants, d'autre part, à l'augmentation de nombre de cellules.

III.10.2.4. Pouvoir réducteur du fer (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power)

Les résultats représentés dans la **Figure 52**, montrent l'évolution du pouvoir réducteur des souches étudiées en présence d'extrait et de jus de fraise.

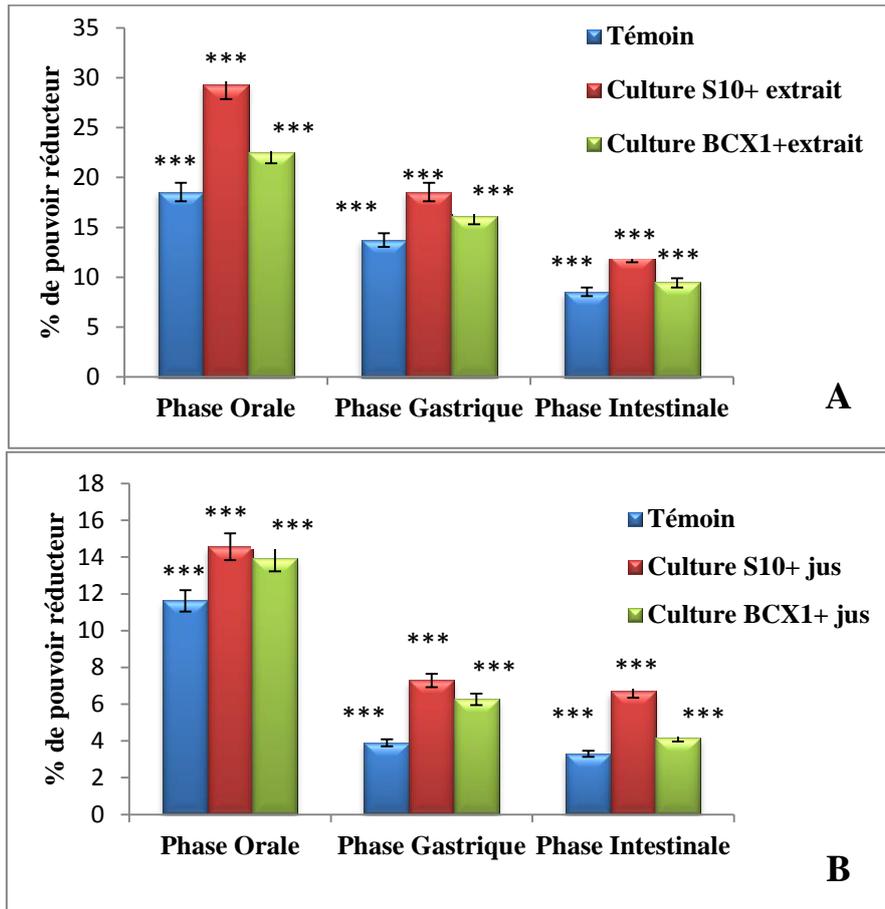


Figure 52. Pouvoir réducteur des souches de *L.plantarum* véhiculé par la matrice végétale après digestion bucco-gastro- intestinale.

^(A): combiné à l'extrait de fraise, ^(B): combiné au jus de fraise.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

L'analyse statistique a montré qu'il y a une différence significative entre les deux souches dans les trois phases, orale, gastrique et intestinale. En effet, la valeur la plus importante est enregistrée pour *L.plantarum*S10 véhiculé par le jus de fraise qui est de $29.33 \pm 0.006 \mu\text{g EAA/ml}$, et la plus basse avec une valeur de $9.44 \pm 0.02 \mu\text{g EAA/ml}$ (véhiculé avec l'extrait). Concernant, la deuxième souche BCX1, les résultats obtenus sont inférieure à ceux du *L.plantarum* S10 avec une teneur de $14.56 \pm 0.007 \mu\text{g EAA/ml}$, $13.92 \pm 0.001 \mu\text{g EAA/ml}$ pour le jus et l'extrait de fraise respectivement. Cette différence de valeurs peut être due à l'aspect qualitatif et/ou quantitatif des composés phénoliques, ce qui indique que la présence des matrices végétales a une influence positive sur la capacité dite pouvoir réducteur (Liu *et al.*, 2019 ; Adebo et Medina-Meza, 2020).

III.11. Biodisponibilité des polyphénols et flavonoïdes après la combinaison des souches de *L. plantarum* avec la matrice végétale (extrait / jus) lors de la digestion

Les résultats des dosages après les phases de digestion lors de la combinaison des souches de *L. plantarum*-extraits et *L. plantarum*-jus de fraise sont illustrés par les **Figures 53** et **54**.

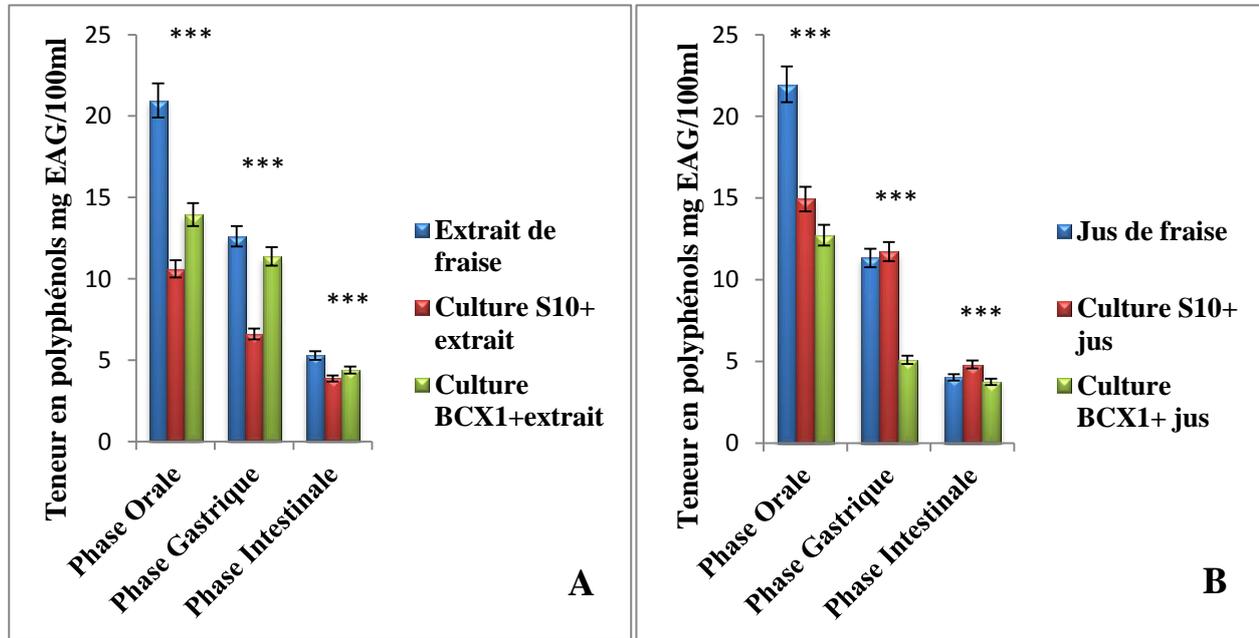


Figure 53. Effet de la digestion *in vitro* sur la teneur en polyphénols en présence des souches de *L. plantarum*.

(^A) : combiné à l'extrait de fraise ; (^B) : combiné au jus de fraise.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

L'analyse des histogrammes de la digestion montre une perte en polyphénols et en flavonoïdes d'une manière hautement significatives ($p < 0.001$), avec les deux combinaisons extrait de fraise-*L. plantarum*, jus de fraise-*L. plantarum* pour les deux souches testées. Par ailleurs, nous constatons que cette diminution est plus importante comparativement à celle obtenue lors des dosages après digestion des extraits et de jus seule, cela confirme qu'il y a une dégradation de ces composés par les souches bactériennes qui utilisent beaucoup plus les polyphénols dans le jus de fraise comparativement à l'extrait.

Nos résultats, rejoignent ceux de **Garbetta et al. (2018)** et **Shi et al. (2020)** qui ont démontré que les composés phénoliques sont considérés comme des prébiotiques idéaux pour les bactéries probiotiques et que l'incubation des composés phénoliques avec *Lactocaseibacillus paracasei* LMG P-22043 a permis de maintenir leur survie et viabilité.

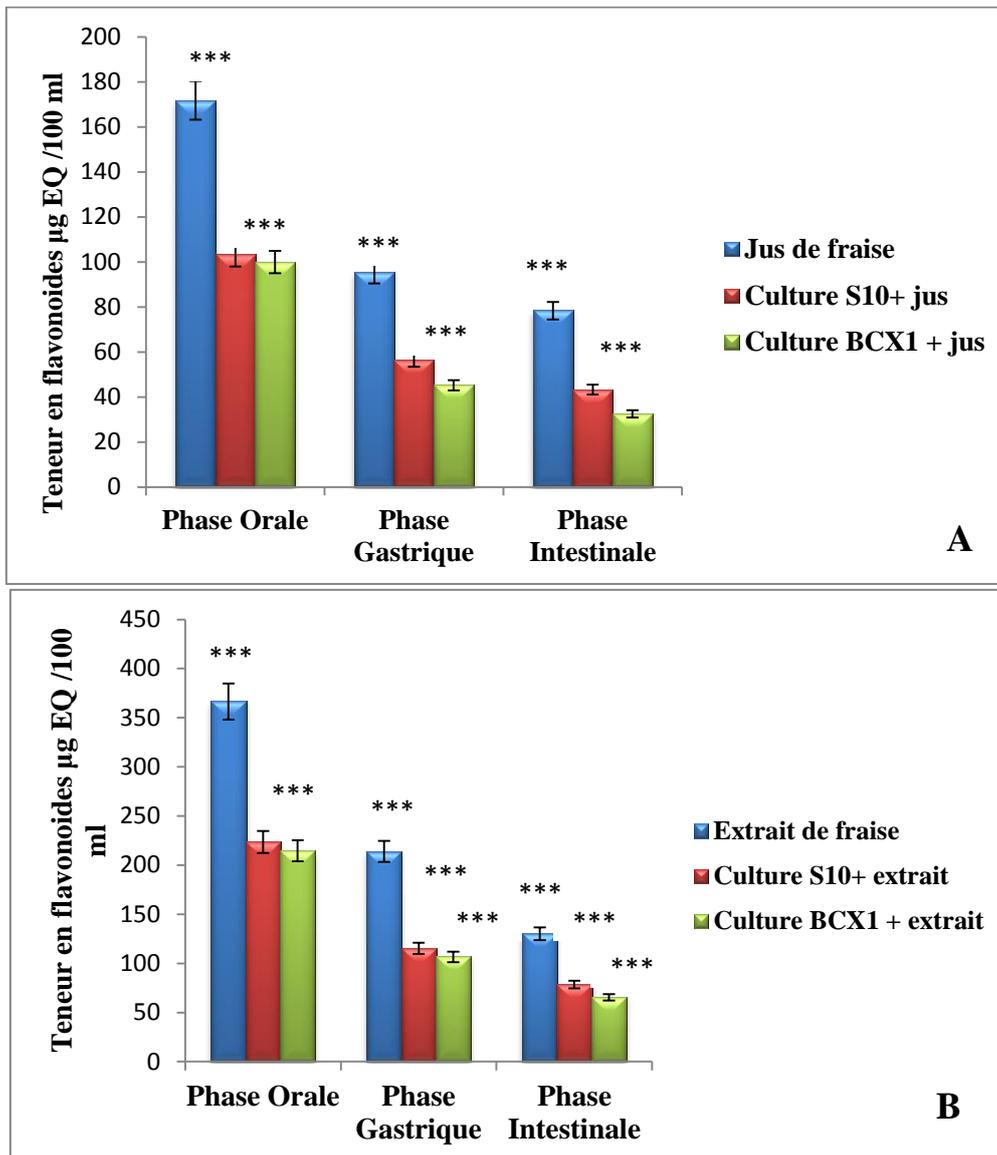


Figure 54. Effet de la digestion *in vitro* sur la teneur en flavonoïdes en présence des souches de *L.plantarum*.

(A) : combiné à l'extrait de fraise, (B) : combiné au jus de fraise

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

III.12. Montage d'un circuit pour une simulation d'une digestion bucco-gastro-intestinale

Au cours de la digestion, de nombreux phénomènes chimiques, enzymatiques et mécaniques se produisent simultanément dont dépend la physiologie digestive, pour cela, il est nécessaire de recourir à des nouvelles modèles *in vitro* ou *in vivo* pour l'étude de la digestion (Menard et Dapont, 2014).

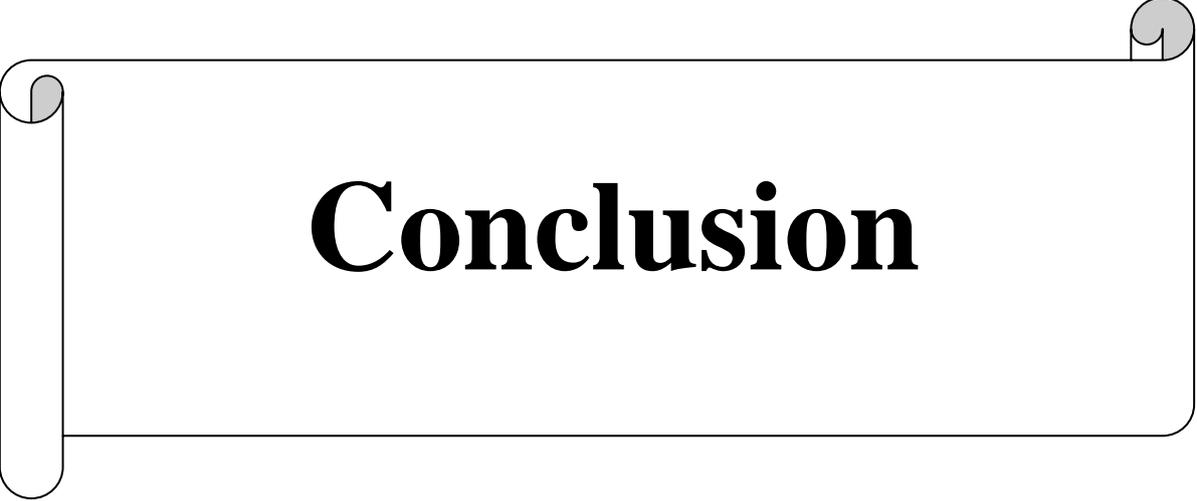
Les résultats illustrés dans le tableau ci-dessous ; représentent la différence entre les deux expériences *in vitro* pour trois tests : nombre de cellules (UFC/ml), capacité de piégeage de radicaux hydroxyles et de radicaux libres.

Tableau 5. Les différents tests réalisés après le montage d'un circuit digestif.

	Nombre de cellules (UFC/ml)	Piégeage de radicaux hydroxyles (%)	Piégeage des radicaux libres DPPH (%)
Témoin S10	$10 \times 10^9 \pm 0.00$	21.30 ± 0.004	51.17 ± 0.40
Montage	$25 \times 10^9 \pm 0.00$	40.23 ± 0.33	76.30 ± 0.20
Témoin BCX1	$5 \times 10^9 \pm 0.00$	45.42 ± 0.36	49.54 ± 0.009
Montage	$16 \times 10^9 \pm 0.00$	56.30 ± 0.38	64.30 ± 0.08

Les résultats montrent que le nombre de cellules dans le contenu intestinal de montage est relativement supérieur à celui du témoin, ainsi que la capacité à piéger les radicaux hydroxyles et les radicaux libres avec un pourcentage de 40.23 ± 0.33 %, 56.30 ± 0.38 % et 76.30 ± 0.20 %, 64.30 ± 0.08 % pour *L. plantarum* S10 et *L. plantarum* BCX1 respectivement. On peut déduire que l'augmentation de l'activité antioxydante est proportionnelle avec l'augmentation de nombre de cellules.

En effet, ce modèle (*in vitro*) est plus proche physiologiquement de ce qui se passe chez l'homme car il permet de modéliser les paramètres clés de la digestion à savoir, la forme, la température du corps (37°C), pH adapté pour les trois phases. En outre, chaque compartiment contient son liquide équivalent, et le déplacement de la souche d'une phase à l'autre dans des conditions appropriées avec une agitation mécanique. Les variations dans le paramétrage de système de digestion *in vitro* vont directement influencer l'activité des enzymes et par conséquent modifier le résultat de digestion. Face à cette difficulté, à savoir l'impossibilité de comparer les résultats entre différentes études et au besoin d'harmoniser un protocole de digestion qui puisse être utilisé par l'ensemble de la communauté scientifique a raison de nombreux avantages (Minekus *et al.*, 2014 ; Brodkorb *et al.*, 2019).

A decorative scroll-like frame with a black outline and rounded corners. The frame is oriented horizontally and has a vertical strip on the left side, suggesting it is a scroll. The word "Conclusion" is centered within the frame in a bold, black, serif font. The scroll is unrolled, with the top and bottom edges visible.

Conclusion

Les probiotiques constituent l'un des axes de recherche les plus anciens et les plus récents, à cause de l'émergence des études sur le microbiote, particulièrement, la viabilité au cours du transit gastro-intestinal.

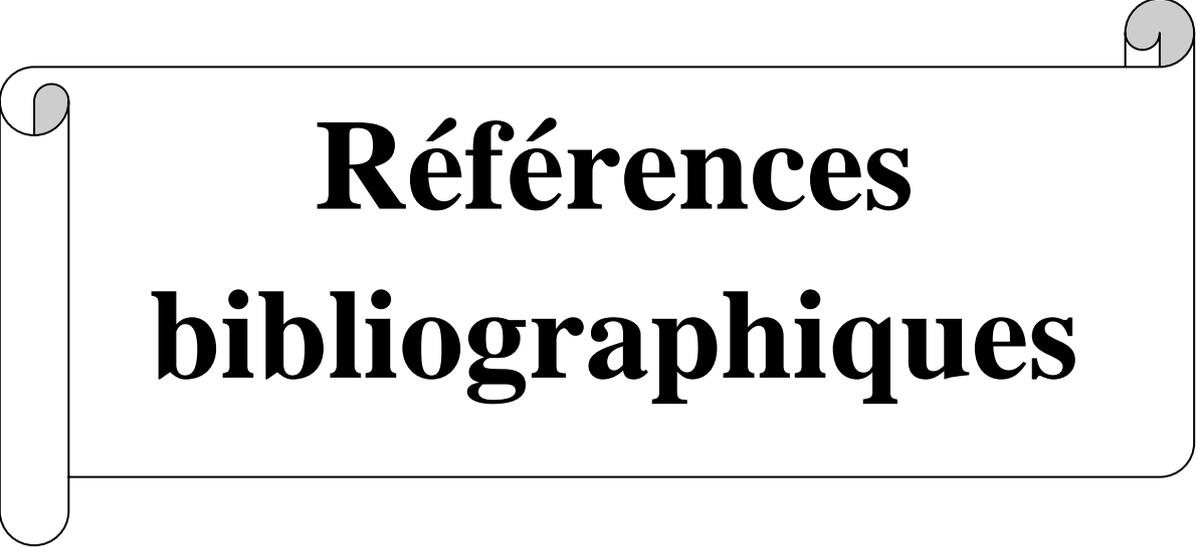
A la lumière des résultats des différentes parties de la présente étude, on déduit que nos souches de *Lactiplantibacillus plantarum* S10 et BCX1 ont une tolérance remarquable vis-à-vis des conditions bucco-gastro-intestinal, à savoir l'acidité, les sels biliaires, les enzymes digestifs. De même nos souches possèdent la particularité d'auto-agrégation, de co-agrégation avec les souches pathogènes et d'adhérer aux cellules épithéliales. En outre, elles ont montré une bonne résistance au peroxyde d'hydrogène, une capacité de piégeage des radicaux hydroxyles ainsi que les radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), c'est-à-dire une bonne activité antioxydante.

En raison de la teneur en éléments nutritifs adéquats, la matrice végétale représentée par la fraise, a amélioré la survie et la viabilité des souches mises au test. Le jus fermenté a également amélioré leurs pouvoirs antioxydants, sachant qu'avec le jus de fraise la survie est meilleure.

L'incorporation de nos bactéries avec l'extrait et jus de fraise est considérée comme étant un paramètre majeur pour la protection de ces bactéries de l'effet délétère des conditions drastiques du tractus digestif. Leur passage dans des liquides simulant la digestion bucco-gastro-intestinale a montré une amélioration du statut probiotique avec une perte des composés phénoliques d'une phase à l'autre, ce qui confirme que ces derniers sont considérés comme des stimulateurs de croissance pour ces bactéries.

Toutefois, ce travail ouvre des nouvelles perspectives dont, nous proposons :

- Des essais *in vivo* pour évaluer la survie, la viabilité, et les profils antioxydants de nos souches dans le tractus digestif ;
- L'association de nos souches pourrait être bénéfique pour avoir des effets synergiques ;
- Développement des aliments fonctionnels tels que les jus fermentés par des souches probiotiques pour lutter contre des maladies digestives et extra-digestives ;
- Travailler sur des stratégies de protection des souches contre les conditions hostiles du corps (microencapsulation).



Références bibliographiques

A

- Abd Rahman, N. F., Shamsudin, R., Ismail, A., Shah, N. N. A. K., & Varith, J. (2018).** Effects of drying methods on total phenolic contents and antioxidant capacity of the pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peels. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 50, 217-225.
- Abedfar, A., Hosseininezhad, M., Sadeghi, A., & Raeisi, M. (2021).** Comparative survival of exopolysaccharide encapsulated *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* in simulated gastrointestinal conditions and storage time. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 594-603.
- Aboufazli, F., & Baba, A. S. (2015).** Effect of vegetable milk on survival of probiotics in fermented ice cream under gastrointestinal conditions. *Food Science and Technology Research*, 21(3), 391-397.
- Adebo, O. A., & Medina-Meza. (2020).** Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: A mini review. *Molecules*, 25(4), 927-946.
- Adriouch, S., Kesse-Guyot, E., Herberg, S., Touvier, M., & Fezeu, L. K. (2017).** Association entre les apports en polyphénols et le risque de maladies cardiovasculaires : résultats d'une étude prospective sur 84 000 adultes français. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 31(3), 238-240.
- Ahire, J. J., Jakkamsetty, C., Kashikar, M. S., Lakshmi, S. G., & Madempudi, R. S. (2021).** In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* UBLP40 Isolated from Traditional Indigenous Fermented Food. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-12.
- Ali-Rachedi, F., Meraghni, S., Touaibia, N., & Mesbah, S. (2018).** Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea sub. Maritima L.* *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 87, 13-21.
- Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., & Khan, F. H. (2020).** Understanding oxidants and antioxidants: classical team with new players. *Journal of food biochemistry*, 44(3), 13145.
- Al-Nabulsi, A. A., Awaisheh, S. S., Ibrahim, A. S., Hayek, A. S., & El-Qudah, M. J. (2014).** Health Benefits of Symbiotic Functional Food Products. *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*, 22, 395-403.
- Al-Tawaha, R., & Meng, C. (2018).** Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: a review. *Advances in Environmental Biology*, 12(1), 16-27.

- Alves-Santos, A. M., Sugizaki, C. S. A., Lima, G. C., & Naves, M. M. V. (2020).** Prebiotic effect of dietary polyphenols: Systematic review. *Journal of Functional Foods*, 74, 104169.
- Amira, S., Sifour, M., Ouled-Haddar, H., Hadeif, S., Khennouf, T., Mauriello, G., & Maresca, D. (2020).** Effect of different food stress conditions on the viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* isolated from klila (an Algerian traditional fermented cheese). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(5), 38-43.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17(6), 454 – 461.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., Santhanakaruppu, R., Manimaran, M., Rani, R. P., & Sivakumar, S. (2015).** Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. *Research in microbiology*, 166(5), 428-439.
- Anukam, K. C., & Reid, G. (2007).** Probiotics: 100 years (1907–2007) after Elie Metchnikoff's observation. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 1, 466-474.
- Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Ilavenil, S., Choi, K. C., & Srigopalram, S. (2016).** *In vitro* importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1), 6-10.
- Aravind, S. M., Wichienhot, S., Tsao, R., Ramakrishnan, S., & Chakkaravarthi, S. (2021).** Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. *Food Research International*, 110189.
- Ariza, M. T., Reboredo-Rodríguez, P., Cervantes, L., Soria, C., Martínez-Ferri, E., González-Barreiro, C., & Simal-Gándara, J. (2018).** Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. *Food chemistry*, 248, 155-165.
- Ashaolu, T. J. (2020).** Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110625.

B

- Bahri, F., Lejeune, A., Dubois-Dauphin, R., Elmejdoub, T., Boulahrouf, A., & Thonart, P. (2014).** Characterization of *Lactobacillus* strains isolated from Algerian children faeces for their probiotic properties. *African Journal of Microbiology Research*, 8(3), 297-303.

- Baillif, S., Hartmann, D., Freney, J., & Kodjikian, L. (2010).** Implant intraoculaire et adhésion bactérienne : influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 33(3), 210-221.
- Barros, R. G. C., Pereira, U. C., Andrade, J. K. S., de Oliveira, C. S., Vasconcelos, S. V., & Narain, N. (2020).** In vitro gastrointestinal digestion and probiotics fermentation impact on bioaccessibility of phenolics compounds and antioxidant capacity of some native and exotic fruit residues with potential antidiabetic effects. *Food Research International*, 136, 109614.
- Basu, A., Nguyen, A., Betts, N. M., & Lyons, T. J. (2014).** Strawberry as a functional food: an evidence-based review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(6), 790-806.
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006).** Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729-1738.
- Beldarrain-Iznaga, T., Villalobos-Carvajal, R., Sevillano-Armesto, E., & Leiva-Vega, J. (2021).** Functional properties of *Lactobacillus casei* C24 improved by microencapsulation using multilayer double emulsion. *Food Research International*, 141, 110136.
- Bengoa, A. A., Zavala, L., Carasi, P., Trejo, S. A., Bronsoms, S., de los Ángeles Serradell, M., & Abraham, A. G. (2018).** Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Research International*, 103, 462-467.
- Benhamada, N. and Idoui, T. (2020).** Traditional fermented wheat: nutritional quality and sensory evaluation of bread produced from composite fermented wheat flour. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 12(2), 37-46.
- Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014).** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364-371.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012).** Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition Metabolism*, 61(2), 160-174.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011).** Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128, 14-21.
- Boudouhi R., Ferreira C., Morel E., Szymanski A., Tizaoui S. (2005).** *Aliments fonctionnels : «réalité et/ou allégation»*, Université Lille 1 Sciences et Technologies. p 202.

- Bouridane, H., Sifour, M., Idoui, T., Annick, L., & Thonard, P. (2016).** Technological and probiotic traits of the lactobacilli isolated from vaginal tract of the healthy women for probiotic use. *Iranian Journal of Biotechnology*, 14(3), 192-201.
- Bove, P., Russo, P., Capozzi, V., Gallone, A., Spano, G., & Fiocco, D. (2013).** *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiological Research*, 168(6), 351-359.
- Breidt, Jr, F., & Caldwell, J. M. (2011).** Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in cucumber fermentation brines. *Journal of Food Science*, 76(3), 198-203.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Feunteun, S. L., & Recio, I. (2019).** INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14, 991–1014.
- Bruno-Bárcena, J. M., Azcárate-Peril, M. A., Klaenhammer, T. R., & Hassan, H. M. (2005).** Marker-free chromosomal integration of the manganese superoxide dismutase gene (*sodA*) from *Streptococcus thermophilus* into *Lactobacillus gasseri*. *FEMS Microbiology Letters*, 246(1), 91-101.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011).** Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467-483.
- Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A., Cailliez-Grimal, C., Gaini, C. (2014).** Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid Interface Science*, 213, 21-35.
- Burgos-Edwards, A., Jimenez-Aspee, F., Thomas-Valdes, S., Schmeda-Hirschmann, G., & Theoduloz, C. (2017).** Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 237, 1073-1082.

C

- Cao, P., Wu, L., Wu, Z., Pan, D., Zeng, X., Guo, Y., & Lian, L. (2019).** Effects of oligosaccharides on the fermentation properties of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Science*, 102, 1-10.

Cheurfa, M., & Allem, R. (2016). Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) d'Algérie in vitro. *Phytothérapie*, 14(3), 181-187.

China, R., Mukherjee, S., Sen, S., Bose, S., Datta, S., Koley, H., & Dhar, P. (2012). Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiological Research*, 167(8), 500-506.

Číž, M., Čížová, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A., & Lojek, A. (2010). Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, 21(4), 518-523.

Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European food Research and Technology*, 226(5), 1065-1073.

Corcoran B, Stanton C, Fitzgerald G, Ross R. (2005). Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3060-3067.

Correa-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M., & Paliyath, G. (2014). Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 165, 522–531

Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(3), 429-453.

D

Dalli, S. S., Uprety, B. K., & Rakshit, S. K. (2017). Industrial production of active probiotics for food enrichment. In *Engineering Foods for Bioactives Stability and Delivery* (pp. 85-118). Springer, New York, NY.

Das, D., & Goyal, A. (2015). Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim. *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 263-268.

De Montijo-Prieto, S., Castro, D. J., Reina, J. C., Jimenez-Valera, M., & Ruiz-Bravo, A. (2019). Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* C4 (CECT 9567), a potential probiotic strain isolated from kefir. *Archives of Microbiology*, 201(3), 409-414.

- De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., de Vos, W. M. (2006).** *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16(9), 1018-1028.
- Dinev, T., Beev, G., Tzanova, M., Denev, S., Dermendzhieva, D., & Stoyanova, A. (2018).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic and food spoilage microorganisms: a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 21(3), 253–268.
- Djenidi, H., Khennouf, S., & Bouaziz, A. (2020).** Antioxidant activity and phenolic content of commonly consumed fruits and vegetables in Algeria. *Progress in Nutrition*, 22(1), 224-235.
- Dufour, C., Loonis, M., Delosière, M., Buffière, C., Hafnaoui, N., Santé-Lhoutellier, V., & Rémond, D. (2018).** The matrix of fruit & vegetables modulates the gastrointestinal bioaccessibility of polyphenols and their impact on dietary protein digestibility. *Food chemistry*, 240, 314-322.
- Dunne, C. O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G., Shanahan, F., & Collins, J. K. (2001).** *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 386-392.

E

- Ekblad, B., & Kristiansen, P. E. (2019).** NMR structures and mutational analysis of the two peptides constituting the bacteriocin plantaricin S. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Ekmekçi, H., Aslim, B., & Darilmaz, Ö. D. (2009).** Some factors affecting the autoaggregation ability of vaginal lactobacilli isolated from Turkish women. *Archive Biology and Sciences*, 61(3), 407-412.
- Endo, H., Niioka, M., Kobayashi, N., Tanaka, M., & Watanabe, T. (2013).** Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: new insight into the probiotics for the gut-liver axis. *PloS one*, 8(5), 63388.
- Erlank, H., Elmann, A., Kohen, R., & Kanner, J. (2011).** Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(12), 2319-2327.

F

FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food-Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Meeting Report, London Ontario, Canada.

Filannino, P., Cardinali, G., Rizzello, C. G., Buchin, S., De Angelis, M., Gobbetti, M., & Di Cagno, R. (2014). Metabolic responses of *Lactobacillus plantarum* strains during fermentation and storage of vegetable and fruit juices. *Applied and environmental microbiology*, 80(7), 2206-2215.

Fong, F. L. Y., Shah, N. P., Kirjavainen, P., & El-Nezami, H. (2016). Mechanism of action of probiotic bacteria on intestinal and systemic immunities and antigen-presenting cells. *International Reviews of Immunology*, 35(3), 179-188.

G

Galdeano, C. M., Cazorla, S. I., Dumit, J. M. L., Vélez, E., & Perdigón, G. (2019). Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 74(2), 115-124.

Garbetta, A., D'Antuono, I., Sisto, A., Minervini, F., Cardinali, A., & Lavermicocca, P. (2018). Effect of artichoke fermentation by probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LMG P-22043 and of digestion process on polyphenols and antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 45, 523-529.

Garzon, G. A., & Wrolstad, R. E. (2002). Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. *Journal of Food Science*, 67(4), 1288-1299.

Gautam, N., & Sharma, N. (2015). Evaluation of probiotic potential of new bacterial strain, *Lactobacillus spicheri* G2 isolated from Gundruk. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 85(4), 979-986.

Gharib, S. A. H., Saad, O. A.O., Zayed, G., Ali, F. S. (2020). Antimicrobial activity and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Traditional Fermented Dairy Products. *Journal of Modern Research*, 2, 40-48.

Gharbi, Y., Fhoula, I., Ruas-Matiedo, P., Najjari, A., Boudabous, A., Gueimonde, M., & Ouzari, H. (2019). In-vitro characterization of potentially probiotic *Lactobacillus* strains isolated from human microbiota: interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line HT29. *Annals of Microbiology*, 69(1), 61-72.

- Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselsela, H., & Oueld-Mokhtar, S. M. (2015).** Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13(2), 118-129.
- Gheziel, C., Russo, P., Arena, M. P., Spano, G., Ouzari, H. I., Kheroua, O., & Capozzi, V. (2019).** 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*, 11(1), 113-123.
- Gogineni, V. K., Morrow, L. E., Gregory, P. J., & Malesker, M. A. (2013).** Probiotics: history and evolution. *Journal of Ancient Diseases and Preventive Remedies*, 1(2), 1-7.
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M., Quecan, B. X., & de Melo Franco, B. D. (2016).** Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 863-878.
- Gowd, V., Karim, N., Shishir, M. R. I., Xie, L., & Chen, W. (2019).** Dietary polyphenols to combat the metabolic diseases via altering gut microbiota. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 81-93.
- Guendouze-Bouchefa, N., Madani, K., Chibane, M., Boulekbache-Makhlouf, L., Hauchard, D., Kiendrebeogo, M., & Duez, P. (2015).** Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three Ericaceae from Algeria. *Industrial crops and products*, 70, 459-466.
- Güney, D., & Güngörmüşler, M. (2021).** Development and Comparative Evaluation of a Novel Fermented Juice Mixture with Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(2), 495-505.
- Guo, X. H., Kim, J. M., Nam, H. M., Park, S. Y., & Kim, J. M. (2010).** Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 16(4), 321-326.
- Gwiazdowska, D., Juś, K., Jasnowska-Malecka, J., & Kluczyńska, K. (2015).** The impact of polyphenols on *Bifidobacterium* growth. *Acta Biochimica Polonica*, 62(4), 895-901.

H

- Hamon, E., Horvatovich, P., Izquierdo, E., Bringel, F., Marchioni, E., Aoudé-Werner, D., & Ennahar, S. (2011).** Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiology*, 11(1), 63-74.
- Harzallah, D., & Belhadj, H. (2013).** Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GI mucosal barrier. *Kongo M*, 197-216.

- Henning, S. M., Seeram, N. P., Zhang, Y., Li, L., Gao, K., Lee, R. P., Wang, D. C., Zerlin, A., Karp, H., Thames, G., Kotlerman, J., Li, Z., & Heber, D. (2010).** Strawberry consumption is associated with increased antioxidant capacity in serum. *Journal of Medicinal Food*, 13(1), 116-122.
- Hernández-Alcántara, A. M., Wachter, C., Llamas, M. G., Lòpez, P., & Pèrez-Chabela, M. L. (2018).** Probiotic properties and stress response of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked meat products. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 91, 249-257.
- Hervert-Hernández, D., García, O. P., Rosado, J. L., & Goñi, I. (2011).** The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. *Food Research International*, 44(5), 1182-1189.
- Holzapel, W. H., Goktepe, I., Juneja, V. K., & Ahmedna, M. (2006).** Introduction to prebiotics and probiotics. *Probiotics In Food Safety Human Health*, 35(2), 109-116.
- Holzapel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 365-373.
- Huckle, B. D., & Zhang, Z. (2011).** Maintenance and protection of probiotics. In *Probiotics* (pp. 87-108). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Huidrom, S., & Sharma, N. (2018).** Isolation and screening of novel isolates of Bifidobacteria from human milk as potential probiotic with antidiarrheal activity. *Annals of Applied Microbiology Biotechnology Journal*, 2(1), 1007-1015.
- Huys, G., Botteldoorn, N., Delvigne, F., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., Pot, B., & Dubois, G. (2013).** Microbial characterization of probiotics—Advisory report of the Working Group “8651 Probiotics” of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(8), 1479-1504.

I

- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018).** First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.
- Isa, J. K., & Razavi, S. H. (2017).** Characterization of *Lactobacillus plantarum* as a potential probiotic in vitro and use of a dairy product (yogurt) as food carrier. *Applied Food Biotechnology*, 4(1), 11-18.

Izquierdo Alegre, E. (2009). *Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique* (Doctoral dissertation, Strasbourg).

J

Jablonska-Rys, E., Sławinska, A., & Sz wajgier, D. (2016). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant properties and phenolic acid contents of oyster (*Pleurotus ostreatus*) and chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushrooms. *Food Science and Biotechnology*, 25(2), 439-444.

Janković, T., Frece, J., Abram, M., & Gobin, I. (2012). Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal Sanitary Engineering Research*, 6(1), 19-24.

Jayashree, S., Pooja, S., Pushpanathan, M., Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2014). Identification and characterization of bile salt hydrolase genes from the genome of *Lactobacillus fermentum* MTCC 8711. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(2), 855-866.

K

Kachouri, F., Ksontini, H., Kraiem, M., Setti, K., Mechmeche, M., & Hamdi, M. (2015). Involvement of antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* on functional properties of olive phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7924-7933.

Kao, T., & Chen, B. (2006). Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7544-7555.

Karasu, N., Şimşek, Ö., & Çon, A. H. (2010). Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. *Annals of Microbiology*, 60(2), 227-234.

Kaur, I. P., Chopra, K., & Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 1-9.

Kawabata, K., Yoshioka, Y., & Terao, J. (2019). Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules*, 24(2), 370-395.

Kesen, M. A., & Aiyegoro, O. A. (2018). Beneficial Characteristics and Evaluation Criteria of Probiotics. *International. Journal. Food Bioscience*, 1, 25-33.

Khalil, R. K. (2010). Influence of gallic acid and catechin polyphenols on probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(11), 2069-2079.

Kim, J., Muhammad, N., Jhun, B. H., & Yoo, J. W. (2016). Probiotic delivery systems: a brief overview. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 46(4), 377-386.

- Kim, S. K., Guevarra, R. B., Kim, Y. T., Kwon, J., Kim, H., Cho, J. H., Kim, H.B., & Lee, J. H. (2019).** Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(9), 1335–1340.
- Kim, S. Y. (2017).** Production of fermented kale juices with *Lactobacillus* strains and nutritional composition. *Preventive Nutrition and Food Science*, 22(3), 231-236.
- Kosin, B., & Rakshit, S. K. (2006).** Microbial and processing criteria for production of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 371-379.
- Kumar, B. V., Vijayendra, S. V. N., & Reddy, O. V. S. (2015).** Trends in dairy and non-dairy probiotic products a review. *Journal of food science and technology*, 52(10), 6112-6124.
- Kusharyati, D.F., Pramono, H., Rayandini, D., Manshur, T. A., Dewi, M. A., Khatimah, K., & Rovik, A. (2020).** Bifidobacterium from infant stool: the diversity and potential screening. *Biodiversitas. Journal of Biological Diversity*, 21(6), 2506-2513.

L

- Li, G. (2012).** Intestinal probiotics: interactions with bile salts and reduction of cholesterol. *Procedia Environmental Sciences*, 12, 1180-1186.
- Li, S. J., & So, J. S. (2021).** In Vitro Characterization of Cell Surface Properties of 14 Vaginal *Lactobacillus* Strains as Potential Probiotics. *Advances in Microbiology*, 11(02), 144-155.
- 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, Y., Liu, T., Zhao, M., Zhong, H., Luo, W., & Feng, F. (2019).** *In vitro* and *in vivo* investigations of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese traditional sourdough. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(4), 1893-1903.
- Lin, T. Y., & Chien, M. F. C. (2007).** Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*, 100(4), 1419-1423.
- Lin, X., Xia, Y., Yang, Y., Wang, G., Zhou, W., & Ai, L. (2020).** Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* AR113 and its molecular mechanism of antioxidant. *LWT*, 126, 109278.
- Liu, Y., Cheng, H., Liu, H., Ma, R., Ma, J., & Fang, H. (2019).** Fermentation by multiple bacterial strains improves the production of bioactive compounds and antioxidant activity of goji juice. *Molecules*, 24(19), 3519-3533.

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010).** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118-128.
- Lubelski, J., Konings, W. N., & Driessen, A. J. (2007).** Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 463-476.

M

- Malik, M., Bora, J., & Sharma, V. (2019).** Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Lactobacillus casei*) in carrot and beetroot juice substrates. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(11), 14214.
- Mallappa, R. H., Singh, D. K., Rokana, N., Pradhan, D., Batish, V. K., & Grover, S. (2019).** Screening and selection of probiotic *Lactobacillus* strains of Indian gut origin based on assessment of desired probiotic attributes combined with principal component and heat map analysis. *Food Science and Technology*, 105, 272-281.
- Marin, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2015).** Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Research International*, 1-18.
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017).** Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021-1051.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002).** Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12 (2-3), 173-182.
- Ménard, O., & Dupont, D. (2014).** A tous et limites des modèles de digestion gastro-intestinale : de l'*in vitro* à l'*in vivo*. *Innovations Agronomiques*, 36, 27-41.
- Milardović, S., Iveković, D., & Grabarić, B. S. (2006).** A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68(2), 175-180.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., & Dufour, C. (2014).** A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124.
- Mishra, V., Shah, C., Mokalsh, N., Chavan, R., Yadav, H., & Prajapati, J. (2015).** Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(14), 3615-3626.

Mittelviehhaus, M., Müller, D. B., Zambelli, T., & Vorholt, J. A. (2019). A modular atomic force microscopy approach reveals a large range of hydrophobic adhesion forces among bacterial members of the leaf microbiota. *The ISME Journal*, 13(7), 1878-1882.

Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6463-6472.

Morais, C. A., de Rosso, V. V., Estadella, D., & Pisani, L. P. (2016). Anthocyanins as inflammatory modulators and the role of the gut microbiota. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 33, 1-7.

Morelli, L. (2007). In vitro assessment of probiotic bacteria: from survival to functionality. *International Dairy Journal*, 17(11), 1278-1283.

Mu, G., Gao, Y., Tuo, Y., Li, H., Zhang, Y., Qian, F., & Jiang, S. (2018). Assessing and comparing antioxidant activities of lactobacilli strains by using different chemical and cellular antioxidant methods. *Journal of dairy science*, 101(12), 10792-10806.

N

Nadeem, M., Ubaid, N., Qureshi, T. M., Munir, M., & Mehmood, A. (2018). Effect of ultrasound and chemical treatment on total phenol, flavonoids and antioxidant properties on carrot-grape juice blend during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 45, 1-6.

Nantavisai, K., Puttikamonkul, S., Chotelersak, K., & Taweechoitipatr, M. (2018). In vitro adhesion property and competition against enteropathogens of *Lactobacillus* strains isolated from Thai infants. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 40(1), 69-74.

Ninane V., Mukandayambaje R., Berben G. (2009). Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(3), 459-466.

O

Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions- a review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57-62.

P

- Panghal, A., Chhikara, N., Sindhu, N., & Jaglan, S. (2018).** Role of food safety management systems in safe food production: A review. *Journal of food safety*, 38(4), 12464.
- Parkar, S. G., Stevenson, D. E., & Skinner, M. A. (2008).** The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International journal of food microbiology*, 124(3), 295-298.
- Pathak, S., Kesavan, P., Banerjee, A., Banerjee, A., Celep, G. S., Bissi, L., & Marotta, F. (2018).** Metabolism of Dietary Polyphenols by Human Gut Microbiota and Their Health Benefits. In *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*. Academic Press, 347-359.
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2015).** Challenges for the production of probiotic fruit juices. *Beverages*, 1(2), 95-103.
- Perron, N. R., & Brumaghim, J. L. (2009).** A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53(2), 75-100.
- Prabha, M. R., & Vasantha, K. (2011).** Antioxidant, cytotoxicity and polyphenolic content of *Calotropis procera*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(7), 136-140.

R

- Ranadheera, C., Vidanarachchi, J., Rocha, R., Cruz, A., & Ajlouni, S. (2017).** Probiotic delivery through fermentation: dairy vs. non-dairy beverages. *Fermentation*, 3(4), 67-84.
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010).** Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1-7.
- Rastmanesh, R. (2011).** High polyphenol, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction. *Chemico-biological interactions*, 189(1-2), 1-8.
- Reddy, L. V., Min, J. H., & Wee, Y. J. (2015).** Production of probiotic mango juice by fermentation of lactic acid bacteria. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 43(2), 120-125.
- Riane, K., Sifour, M., Ouled-Haddar, H., Idoui, T., Bounar, S., & Boussebt, S. (2019).** Probiotic properties and antioxidant efficiency of *Lactobacillus plantarum* 15 isolated from milk. *The Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*, 9(3), 516-520.
- Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S. H., Soltani, M., Hoseinifar, S. H., Harikrishnan, R., & Song, S.K. (2020).** Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 129 (1), 116-136.

Rita, R. K. B., Dhankar, J., & Nalla, D. B. (2018). Assessment of Strawberry Polyphenols Aqueous Extract for Major Compositional and Biofunctional Attributes. *International Journal Current Research Review*, 10(22), 1-6.

Rodríguez-Sánchez, S., Fernández-Pacheco, P., Seseña, S., Pintado, C., & Palop, M. L. (2021). Selection of probiotic Lactobacillus strains with antimicrobial activity to be used as biocontrol agents in food industry. *LWT, Food Science and Technology*, 143, 111142.

S

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197-215.

Sağlam, H., & Karahan, A. G. (2021). Plasmid stability of potential probiotic Lactobacillus plantarum strains in artificial gastric juice, at elevated temperature, and in the presence of novobiocin and acriflavine. *Archives of Microbiology*, 203(1), 183-191.

Sánchez, B., Champomier-Verges, M. C., Collado, M. D. C., Anglade, P., Baraige, F., Sanz, Y., & Zagorec, M. (2007). Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype longum. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6450-6459.

Sanders, M. E., Akkermans, L. M., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J. T., Hörmannspurger, G., & Huys, G. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut microbes*, 1(3), 164-185.

Scrob, T., Hosu, A., & Cimpoiu, C. (2019). The Influence of in vitro gastrointestinal digestion of brassica oleracea florets on the antioxidant activity and chlorophyll, carotenoid and phenolic content. *Antioxidants*, 8(7), 212-223.

Serata, M., Kiwaki, M., & Iino, T. (2016). Functional analysis of a novel hydrogen peroxide resistance gene in Lactobacillus casei strain Shirota. *Microbiology*, 162(11), 1885-1894.

Servin, A. L., & Coconnier, M. H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 741-754.

Servin, A. L. (2004). Antagonistic activity of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS. Microbiology*. 28(4), 405-440.

Sharma, V., & Mishra, H. N. (2013). Fermentation of vegetable juice mixture by probiotic lactic acid bacteria. *Nutrafoods*, 12(1), 17-22.

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 Sciences*, 61(1), 65-75.

- Shi, Y., Zhou, S., Fan, S., Ma, Y., Li, D., Tao, Y., & Han, Y. (2020).** Encapsulation of bioactive polyphenols by starch and their impacts on gut microbiota. *Current Opinion in Food Science*, 38, 102–111.
- Siezen, R. J., & van Hylckama Vlieg, J. E. (2011).** Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum* a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 1-13.
- Silva, J. G., Castro, R. D., Sant'Anna, F. M., Barquete, R. M., Oliveira, L. G., Acurcio, L. B., Luiz, L.M.P., Sales, J.A., Nicoli, J.R., & Souza, M. R. (2019).** *In vitro* assessment of the probiotic potential of *Lactobacilli* isolated from Minas artisanal cheese produced in the Araxá region, Minas Gerais state, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*, 71(2), 647-657.
- Sivamaruthi, B. S., Fern, L. A., Hj, D. S. N. R. P., & Chaiyasut, C. (2020).** The influence of probiotics on bile acids in diseases and aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110310.
- Somashekaraiyah, R., Shruthi, B., Deepthi, B. V., & Sreenivasa, M. Y. (2019).** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from neera: a naturally fermenting coconut palm nectar. *Frontiers in microbiology*, 10, 1382-1393.
- Smirnoff, N. (Ed.). (2008).** *Antioxidants and reactive oxygen species in plants* (pp. 169-177). Oxford: Blackwell.
- Socol, C. R., de SouzaVandenbergh, L. P., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., De DeaLindner, J., & Thomaz-Socol, V. (2010).** The potential of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413-434.
- Spacova, I., Dodiya, H. B., Happel, A.-U., Strain, C., Vandenheuvel, D., Wang, X., & Reid, G. (2020).** Future of probiotics and prebiotics and the implications for early career researchers. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1400.
- 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.
- Sui, Y., Liu, J., Liu, Y., Wang, Y., Xiao, Y., Gao, B., & Zhu, D. (2021).** *In vitro* probiotic characterization of *Lactobacillus* strains from fermented tangerine vinegar and their cholesterol degradation activity. *Food Bioscience*, 39, 100843.
- Sun, H., Chen, Y., Cheng, M., Zhang, X., Zheng, X., & Zhang, Z. (2018).** The modulatory effect of polyphenols from green tea, oolong tea and black tea on human intestinal microbiota *in vitro*. *Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 399-407.

T

- Tang, W., Xing, Z., Hu, W., Li, C., Wang, J., & Wang, Y. (2016).** Antioxidative effects in vivo and colonization of *Lactobacillus plantarum* MA2 in the murine intestinal tract. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16), 7193-7202.
- Topçu, K. C., Kaya, M., & Kaban, G. (2020).** Probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from pastırma. *LWT*, 134, 110216.
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., & Giammanco, M. (2007).** Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), 466-479.
- Trush, E. A., Poluektova, E. A., Beniashvili, A. G., Shifrin, O. S., Poluektov, Y. M., & Ivashkin, V. T. (2020).** The Evolution of Human Probiotics: Challenges and Prospects. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 1291–1299.
- Thomas-Valdés, S., Theoduloz, C., Jiménez-Aspee, F., Burgos-Edwards, A., & Schmeda-Hirschmann, G. (2018).** Changes in polyphenol composition and bioactivity of the native Chilean white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* f. *chiloensis*) after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food research international*, 105, 10-18.
- Thomas-Valdés, S., Theoduloz, C., Jiménez-Aspee, F., & Schmeda-Hirschmann, G. (2019).** Effect of simulated gastrointestinal digestion on polyphenols and bioactivity of the native Chilean red strawberry (*Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis* f. *patagonica*). *Food Research International*, 123, 106-114.
- Turkmen, N., Velioglu, Y. S., Sari, F., & Polat G. (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12(3), 484-496.

V

- Vamanu, E. (2017).** Effect of gastric and small intestinal digestion on lactic acid bacteria activity in a GIS1 simulator. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(7), 1453-1457.
- Van Coillie, E., Goris, J., Cleenwerck, I., Grijspeerdt, K., Botteldoorn, N., Van Immerseel, F., & Heyndrickx, M. (2007).** Identification of *Lactobacilli* isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella Enteritidis*. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 1095-1106.

Vanderpool, C., Yan, F., & Polk, B. D. (2008). Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 14(11), 1585-1596.

Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics-from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714-728.

Vemuri, R., Shinde, T., Shastri, M. D., Perera, A. P., Tristram, S., Martoni, C. J., & Eri, R. (2018). A human origin strain *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 exhibits superior in vitro probiotic efficacy in comparison to plant or dairy origin probiotics. *International Journal of Medical Sciences*, 15(9), 840-848.

W

Wang, B., Zhao, N., Li, J., Xu, R., Wang, T., Guo, L., & Wei, X. (2021). Selenium-enriched *Lactobacillus plantarum* improves the antioxidant activity and flavor properties of fermented *Pleurotus eryngii*. *Food Chemistry*, 345, 128770.

Wang, R., Jiang, L., Zhang, M., Zhao, L., Hao, Y., Guo, H., & Ren, F. (2017). The Adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a human intestinal epithelial cell line requires S-layer proteins. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.

Wang, Y. C., Yu, R. C., & Chou, C. C. (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food microbiology*, 23(2), 128-135.

Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., & Li, W. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(5), 521-535.

X

Xia, A. N., Meng, X. S., Tang, X. J., Zhang, Y. Z., Lei, S. M., & Liu, Y. G. (2021). Probiotic and related properties of a novel lactic acid bacteria strain isolated from fermented rose jam. *LWT*, 136, 110327.

Xiao, Y., Han, C., Yang, H., Liu, M., Meng, X., & Liu, B. (2020). Layer (whey protein isolate)-by-layer (xanthan gum) microencapsulation enhances survivability of *L. bulgaricus* and *L. paracasei* under simulated gastrointestinal juice and thermal conditions. *International journal of biological macromolecules*, 148, 238-247.

Y

Yang, Y., Latorre, J. D., Khatri, B., Kwon, Y. M., Kong, B. W., Teague, K. D., Graham, L. E., Wolfenden, A. D., Mahaffey, B. D., Baxter, M., Hernandez-Velasco, X., Merino-Guzman, R. Hargis, B.M., Tellez, G. (2017). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria candidates

for intestinal epithelial permeability and *Salmonella Typhimurium* colonization in neonatal Turkey poult. *Poultry Science*, 97(2), 515-521.

Yan, T., et Goldman, R. D. (2020). Les probiotiques pour la diarrhée liée aux antibiotiques chez l'enfant. *Canadian Family Physician*, 66(1), 9-11.

Z

Zeng, Y., Li, Y., Wu, Q. P., Zhang, J. M., Xie, X. Q., Ding, Y., & Wang, J. (2020). Evaluation of the Antibacterial Activity and Probiotic Potential of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Chinese Homemade Pickles. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 1-11.

Zhang, J., Zhang, X., Zhang, L., Zhao, Y., Niu, C., Yang, Z., & Li, S. (2014). Potential probiotic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Inner Mongolia "Hurood" cheese. *Journal Microbiology Biotechnol*, 24(2), 225-235.

Zhao, J., Tian, F., Zhao, N., Zhai, Q., Zhang, H., & Chen, W. (2017). Effects of probiotics on d-galactose-induced oxidative stress in plasma: A meta-analysis of animal models. *Journal of Functional Foods*, 39, 44-49.

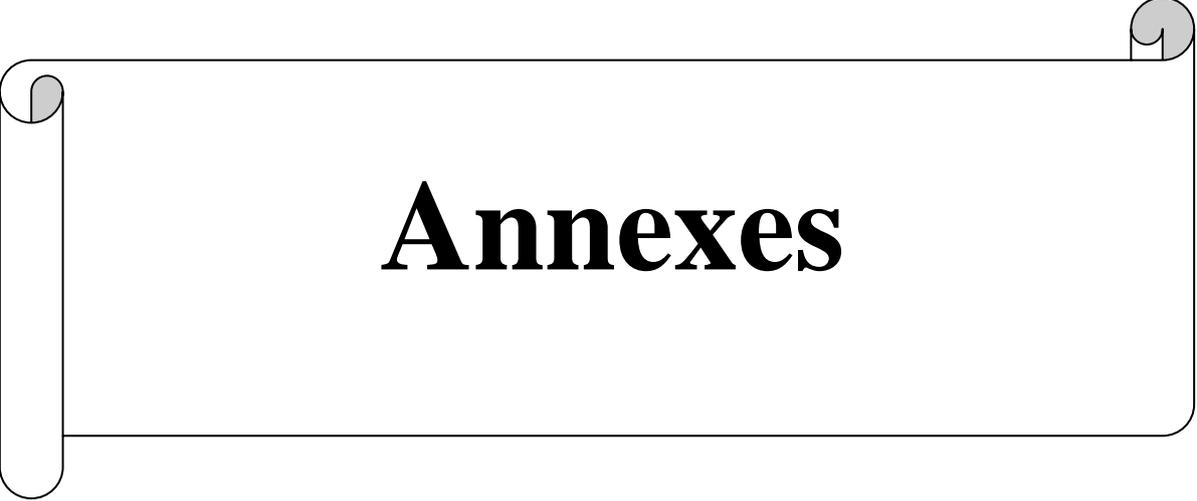
Zhang, S., Liu, L., Su, Y., Li, H., Sun, Q., Liang, X., & Lv, J. (2011). Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. *African Journal of Microbiology Research*, 5(29), 5194-5201.

Zheng, H., Gao, M., Ren, Y., Lou, R., Xie, H., Yu, W., Liu, X., Ma, X. (2017). An improved pH-responsive carrier based on EDTA-Ca-alginate for oral delivery of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. *Carbohydrate Polymers*, 155, 329-335.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782-2858.

Zhong, H., Zhang, Y., Zhao, M., Zhang, J., Zhang, H., Xi, Y., ... & Feng, F. (2021). Screening of novel potential antidiabetic *Lactobacillus plantarum* strains based on *in vitro* and *in vivo* investigations. *LWT*, 139, 110526.

Złotek, U., Mikulska, S., Nagajek, M., & Świeca, M. (2016). The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 628-633.

The word "Annexes" is centered within a decorative frame that resembles a scroll. The frame has a vertical bar on the left side and rounded corners on the right. The word is written in a bold, black, serif font.

Annexes

Annexe 1. Composition des tampons

Ingrédients	Unité
NaCl	9 g
Eau distillée	1000 ml

Tampon Phosphate Saline (PBS) pH=7.2 :

Ingrédients	Unité
K ₂ HPO ₄	1.21 g
KH ₂ PO ₄	0.34 g
NaCl	8 g
Eau distillée	1000 ml

Tampon phosphate urée magnésium pH= 7.1 :

Ingrédients	Unité
K ₂ HPO ₄	22.2 g
KH ₂ PO ₄	7.26 g
Urée	1.8 g
MgSO ₄	0.2 g
Eau distillée	1000 ml

Composition du Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960) pH 5.8 :

Ingrédients	Unité
Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
Phosphate dipotassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	0.20 g
Sulfate de manganèse	0.05 g
Eau distillée	1000 ml

Annexe 2. Résultats des aptitudes probiotiques de *L. plantarum* S10

Moyenn e ± écart type (%)	pH			Co-agrégation		
	pH 4	pH 3	pH 2	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginos</i> <i>a</i>	<i>E.coli</i>
	84.01±0.60	74.28±0.15	46.75± 0.003	57.41±0 56%	60.15±0.30 %	59.75±0.61 %
Moyenn e ± écart type (%)	Hydrophobicité				Auto- agrégation	Résistance aux sels biliaires
	Chloroforme	Xylène	Toluène	Ethyle acétate		
	74.60±0.09	95.51± 0.20	94.71±0. 08	91.92± 0.18	88.38±0.10%	44.90±0.10

❖ Résultats des aptitudes probiotiques de *L. plantarum* BCX1

Moyenn e ± écart type (%)	pH			Co-agrégation		
	pH 4	pH 3	pH 2	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginos</i> <i>a</i>	<i>E.coli</i>
	69.54±0.20	40.03±0.05	38.91±0.06	78.06±0 66%	61.93±0.53%	79.28±0.70%
Moyenn e ± écart type (%)	Hydrophobicité				Auto-agrégation	Résistance aux sels biliaire
	Chloroforme	Xylène	Toluène	Ethyle acétate		
	14.31±0.03	42.94± 0.07	44.12±0. 08	63.50± 0.10	54.17±0.05%	97.19±0.35%

❖ Activité antioxydante des souches de *L. plantarum*

	Résistance au H ₂ O ₂ (Absorbance à 620 nm)				Piégeage de radicaux hydroxyles (%)		Piégeage de radical libre DPPH (%)	
	0 mM	0.4mM	0.7mM	1mM	culot	surnageant	culot	surnageant
	S10	0.28	0.26	0.21	0.12	35.16±0.14	16±0.06	74.09±0.39
BCX1	0.24	0.19	0.17	0.15	85.36±0.57	20.34±0.15	47.03±0.34	67.09±0.15

Annexe 3. Dosages des polyphénols et flavonoïdes de fraise (jus et extrait)

	Polyphénols mg EAG/ 100ml	Flavonoïdes µg EQ/100 ml	Pouvoir réducteur du fer µg EAA/ml	Piégeage de radical libre DPPH (%)
Extrait de fraise	35.34±0.004	518.88±0.09	227.08±0.12	88.75±0.57
Jus de fraise	54.82±0.007	160.02±0.17	144.23±0.11	88.15±0.50
Trolox	/	/	30.88±0.003	80.68±0.006

Annexe 4. Quelques paramètres de fermentation de jus

❖ Evolution de nombre de cellules lors de la fermentation de jus

Nombre de cellules UFC/ml (10 ⁹)	Jus de fraise fermenté S10		Jus de fraise fermenté BCX1	
	T ₀	T _{24h}	T ₀	T _{24h}
	13.5	296	12.1	226.5

❖ Activités antioxydantes de la bactérie après 24heures de fermentation

Activité antioxydante	Résistance au H ₂ O ₂ (Absorbance à 620 nm)				Piégeage de radicaux hydroxyles (%)	Piégeage de radicaux libres DPPH (%)
	0 mM	0.4 mM	0.7 mM	1 mM		
Jus de fraise fermenté S10	0.51±0.10	0.44±0.03	0.39±0.0 2	0.30±0.11	58.60±0.11	90.67±0.06
Jus de fraise fermenté BCX1	0.28±0.00	0.26±0.22	0.22±0.0 9	0.20±0.06	90.52±0.22	73.44±0.04

Annexe 5. Digestion bucco-gastro-intestinale des souches de *L. plantarum*

Nombre de cellules UFC/ml (10^9)	Sans traitement	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale
<i>L. plantarum</i> S10	250	153	22	10
<i>L. plantarum</i> BCX1	320	260	29	5

❖ Aptitude probiotique des souches de *L. plantarum* après la digestion bucco-gastro intestinale

	pH					
	<i>L. plantarum</i> S10			<i>L. plantarum</i> BCX1		
	pH 4	pH 3	pH 2	pH 4	pH 3	pH 2
Phase orale	81.66±0.03	56.93±0.22	36.90±0.10	60.64±0.02	27.83±0.11	25.90±0.12
Phase gastrique	55.10±0.25	43.67±0.10	30.89±0.01	52.10±0.01	24.99±0.13	19.43±0.09
Phase intestinale	44.28±0.07	33.60±0.09	22.70±0.001	44.28±0.05	21.11±0.08	15.88±0.03

	Phase intestinale	
	Résistance aux sels biliaire	Auto-agrégation
<i>L. plantarum</i> S10	36.64±0.01	73.67±0.06
<i>L. plantarum</i> BCX1	66.66±0.08	34.17±0.04

❖ Activité antioxydant de *L. plantarum* après la digestion bucco-gastro-intestinale

Activité antioxydante	Résistance au H ₂ O ₂ (Absorbance à 620 nm)			
	0 mM	0.4 mM	0.7 mM	1 mM
	Phase intestinale S10	0.10±0.003	0.09±0.0006	0.06±0.002
Phase intestinale BCX1	0.13±0.01	0.10±0.005	0.07±0.001	0.03±0.004

❖ *Lactiplantibacillus plantarum* S10

Activité antioxydante S10	Piégeage de radicaux hydroxyles (%)	Piégeage de radicaux libres DPPH (%)
Phase orale	32.43±0.45	68.17±0.04
Phase gastrique	28.46±0.22	66.14±0.01
Phase intestinale	21.30±0.34	51.17±0.40

❖ *Lactiplantibacillus plantarum* BCX1

Activité antioxydante	Piégeage de radicaux hydroxyles (%)	Piégeage de radicaux libres DPPH (%)
Phase orale	76.55±0.03	84.68±0.03
Phase gastrique	62.33±0.39	57.70±0.02
Phase intestinale	45.42±0.09	49.54±0.04

	Phase intestinale			
	Hydrophobicité			
	Chloroforme	Xylène	Toluène	Ethyle acétate
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> S10	72.61±0.34	81.14±0.53	10.91±0.003	58.6±0.06
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BCX1	5.34±0.008	62.04±0.12	58.28±0.45	93.51±0.60

❖ Dosage des polyphénols et flavonoïdes après digestion bucco-gastro-intestinale

	Polyphénols mg EAG/ 100ml			Flavonoïdes µg EQ/100 ml		
	Phase salivaire	Phase gastrique	Phase intestinale	Phase salivaire	Phase gastrique	Phase intestinale
	Extrait de fraise	20.72±0.05	12.61±0.02	5.4±0.004	366.55±0.03	213.84±0.05
Culture S10+ extrait	10.61±0.02	6.62±0.06	3.79±0.01	274.88±0.20	60.55±0.70	39.41±0.03
Culture BCX1 + extrait	13.95±0.01	11.39±0.06	4.5±0.06	127.71±0.02	57.50±0.01	35.12±0.04
Jus de fraise	21.96±0.03	11.34±0.06	4.02±0.001	171.78±0.01	95.29±0.06	78.36±0.08
Culture S10+ jus	9.63±0.01	6.92±0.02	5.50±0.07	109.53±0.07	24.78±0.02	10.89±0.04
Culture BCX1 + jus	13.47±0.07	7.92±0.05	3.87±0.09	153.12±0.06	15.92±0.08	11.05±0.05

❖ Activité antioxydante d'extrait et de jus de fraise après digestion bucco-gastro-intestinale

	Pouvoir réducteur du fer µg EAA/ml			Piégeage de radicaux libres DPPH (%)		
	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale
	Extrait de fraise	11.62±0.02	3.90±0.04	3.33±0.03	54.70±0.03	40.47±0.09
Jus de fraise	18.55±0.03	13.73±0.03	8.54±0.005	54.80±0.02	43.22±0.05	29.01±0.08
Trolox	30.50±0.06	28.16±0.03	22.20±0.01	39.14±0.01	34.33±0.04	16.28±0.05

❖ Nombre de cellules viables lors de la combinaison après la digestion bucco-gastro-intestinale

	Phase Orale	Phase Gastrique	Phase Intestinale
Culture S10 seule	153	22	10
Culture S10+ extrait	258	252	43
Culture S10+ jus	448	268	145
Culture BCX1 seule	360	29	5
Culture BCX1+ extrait	249	51	39
Culture BCX1+ jus	716	580	40

❖ Aptitude probiotique des souches de *L. plantarum* lors de la combinaison (extrait/jus) après la digestion bucco-gastro-intestinale

	Phase intestinale				
	Résistance au pH (%)			Résistance aux sels biliaires (%)	Auto-agrégation (%)
	pH4	pH3	pH2		
Culture S10+extrait de fraise	68.87±0.33	68.61±0.02	60.10±0.04	37.77±0.04	88.50±0.22
Culture S10+ jus de fraise	96.51±0.08	83.54±0.01	77.45±0.12	40.62±0.08	92.78±0.12
Culture BCX1+extrait de fraise	89.18±0.44	76.25±0.02	50.22±0.09	70.33±0.01	40.22±0.34
Culture BCX1+jus de fraise	96.52±0.39	85.12±0.04	80.70±0.33	79.20±0.03	56.02±0.33

	Phase intestinale			
	Hydrophobicité			
	Chloroforme	Xylène	Toluène	Ethyle acétate
Culture S10+extrait de fraise	69.8±0.04	78±0.03	7.5±0.01	55.9±0.04
Culture S10+ jus de fraise	74±0.001	90.5±0.48	25.38±0.02	71.41±0.002
Culture BCX1+extrait de fraise	4±0.007	60.2±0.05	60.4±0.001	79.30±0.05
Culture BCX1+jus de fraise	40.44±0.001	75.35±0.04	67±0.02	87.2±0.02

	Phase intestinale		
	Co-agrégation		
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Culture S10 seule	54.41±0.03	47.67±0.07	17±0.52
Culture S10+ extrait de fraise	54.9±0.03	48.30±0.04	20.21±0.03
Culture S10+ jus de fraise	55.90±0.005	50.01±0.003	28.81±0.03
Culture BCX1 seule	21.95±0.05	47±0.23	40.18±0.32
Culture BCX1+ extrait de fraise	42.37±0.06	47.90±0.01	41.2±0.07
Culture BCX1+ jus de fraise	44.7±0.03	49±0.09	43.29±0.06

❖ Activité antioxydante de *L. plantarum* lors de la combinaison (extrait/jus) après la digestion bucco-gastro-intestinale

	Piégeage de radicaux hydroxyles (%)			Piégeage de radicaux libres DPPH (%)		
	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale
	Culture S10+ extrait de fraise	42.61±0.06	41.60±0.07	37.53±0.08	75.03±0.09	68.95±0.07
Culture S10+ jus de fraise	79.37±0.06	62.5±0.04	39.77±0.002	77.03±0.06	72.50±0.03	52.00±0.07
Culture BCX1+ extrait	78.33±0.04	69.88±0.03	53.44±0.009	86.4±0.05	64.5±0.01	54.30±0.03

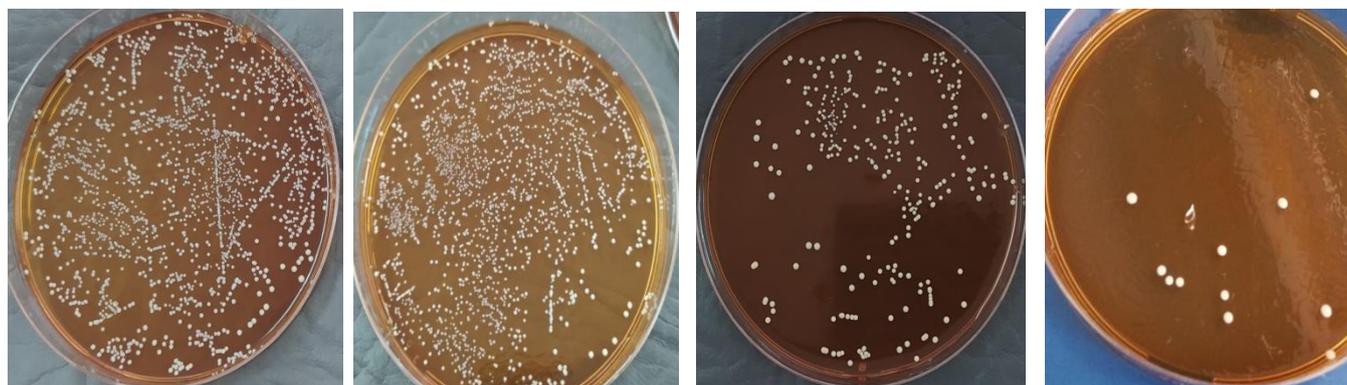
de fraise						
Culture						
BCX1+ jus de fraise	82.22±0.03	76.33±0.01	58.77±0.04	90.22±0.02	70.03±0.05	64.50±0.06

	Pouvoir réducteur du fer µg EAA/ml		
	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale
Culture S10+ extrait de fraise	29.33±0.006	18.55±0.05	12.09±0.05
Culture S10+ jus de fraise	14.56±0.007	7.28±0.03	6.69±0.01
Culture BCX1+ extrait de fraise	22.54±0.05	16.10±0.002	9.44±0.02
Culture BCX1+ jus de fraise	13.92±0.001	6.26±0.08	4.17±0.02

	Résistance au H ₂ O ₂ (Absorbance à 620 nm)			
	Phase intestinale			
	0mM	0.4mM	0.7mM	1mM
Culture S10+ extrait de fraise	0.15±0.10	0.12±0.10	0.09±0.14	0.06±0.10
Culture S10+ jus de fraise	0.17±0.009	0.13±0.06	0.09±0.16	0.06±0.03
Culture BCX1+ extrait de fraise	0.20±0.07	0.11±0.05	0.07±0.18	0.04±0.04
Culture BCX1+ jus de fraise	0.25±0.05	0.16±0.19	0.12±0.03	0.08±0.19

Annexe 6. Photos des résultats de la survie des cultures ($\times 10^9$ UFC/ml)

❖ Digestion de *L. plantarum* S10 seule

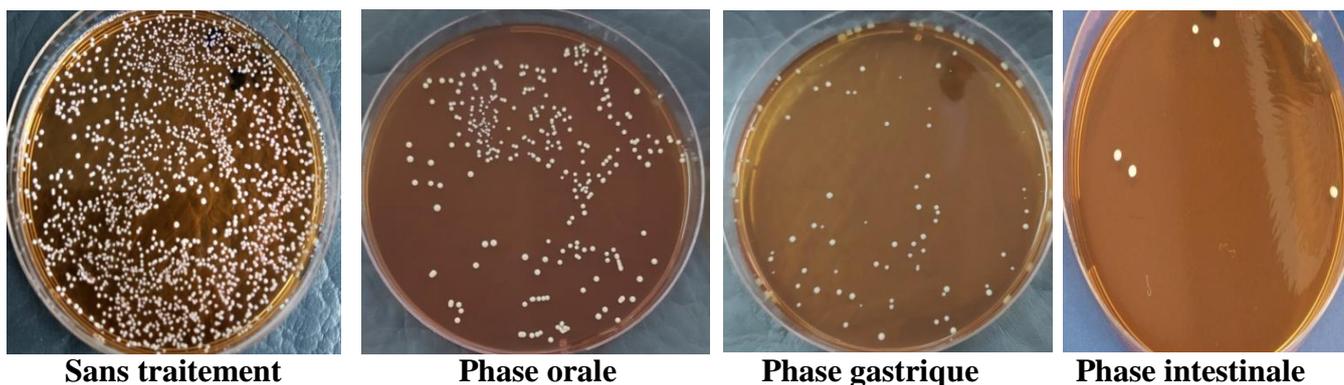
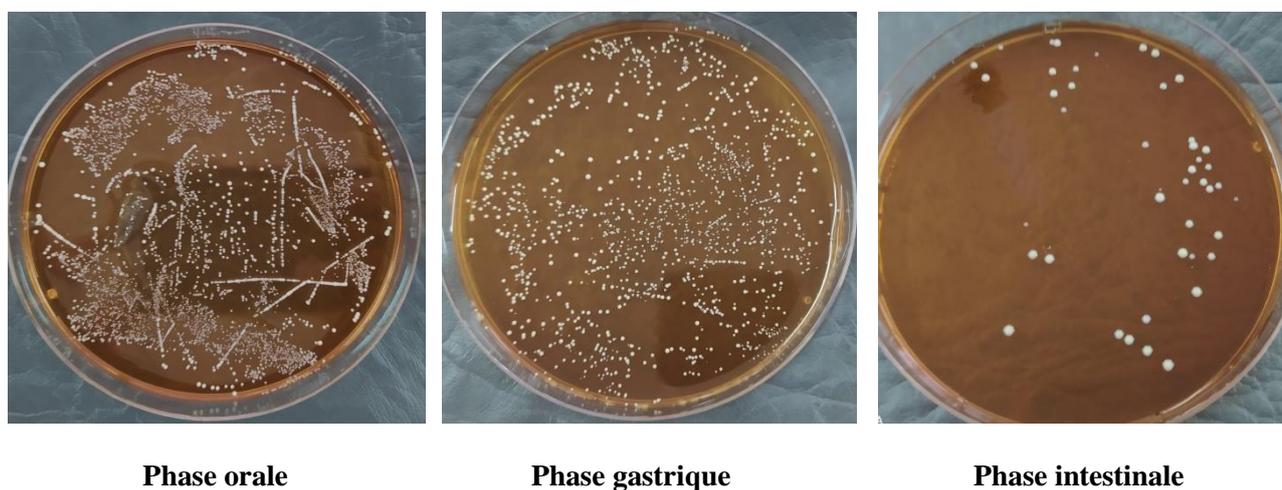
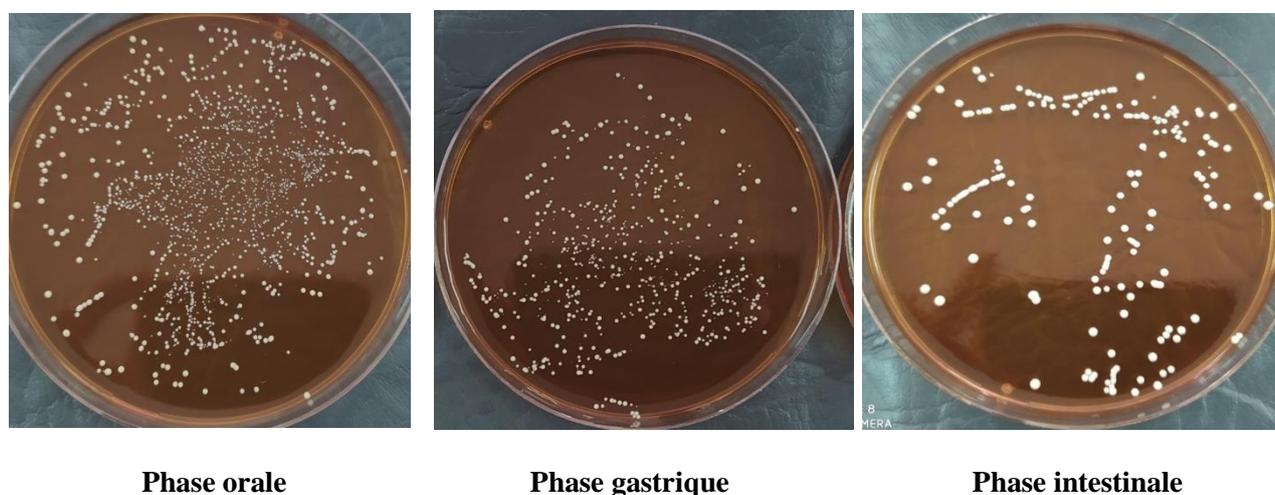


Sans traitement

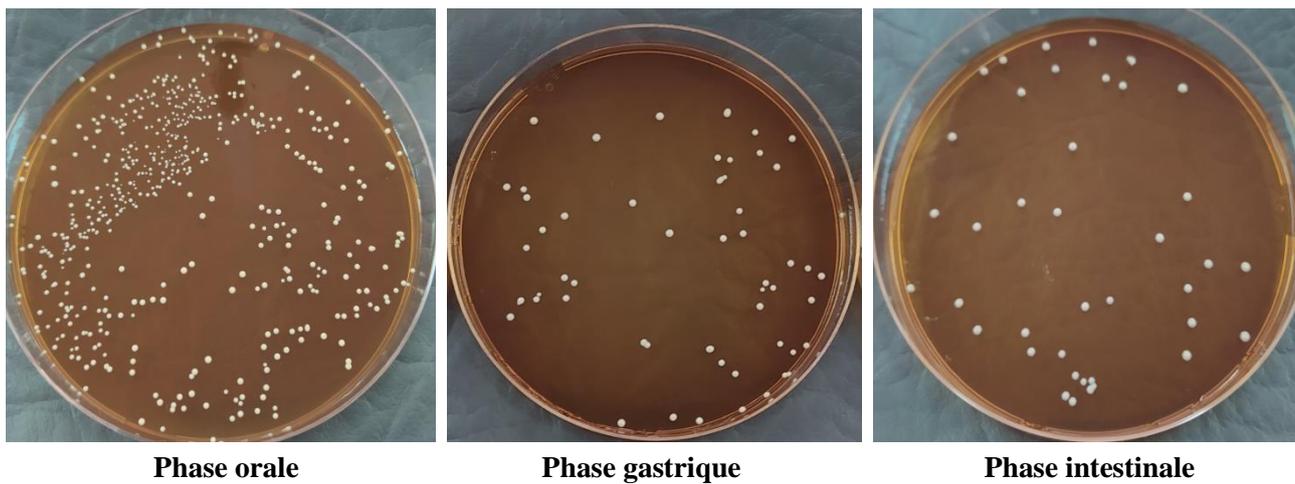
Phase orale

Phase gastrique

Phase intestinale

❖ Digestion de *L. plantarum* BCX1 seule❖ Digestion de *L. plantarum* BCX1 combinée avec l'extrait de fraise❖ Digestion de *L. plantarum* S10 combinée avec l'extrait de fraise

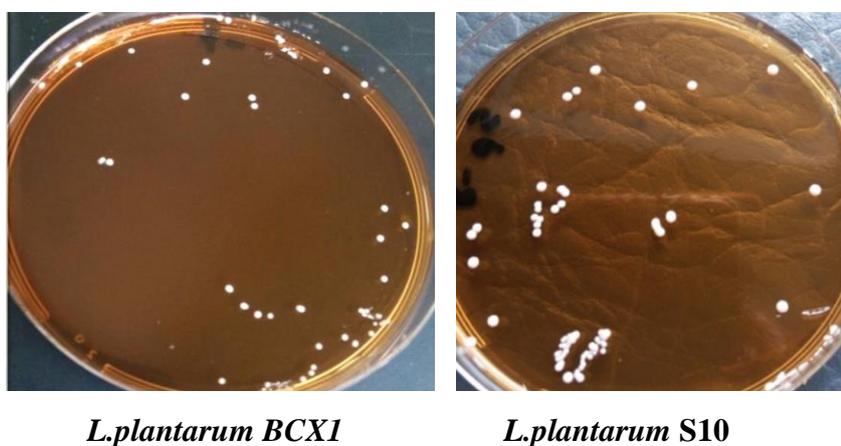
❖ Digestion de *L.plantarum* BCX1 combinée avec le jus de fraise



❖ Digestion de *L.plantarum* S10 combinée avec le jus de fraise

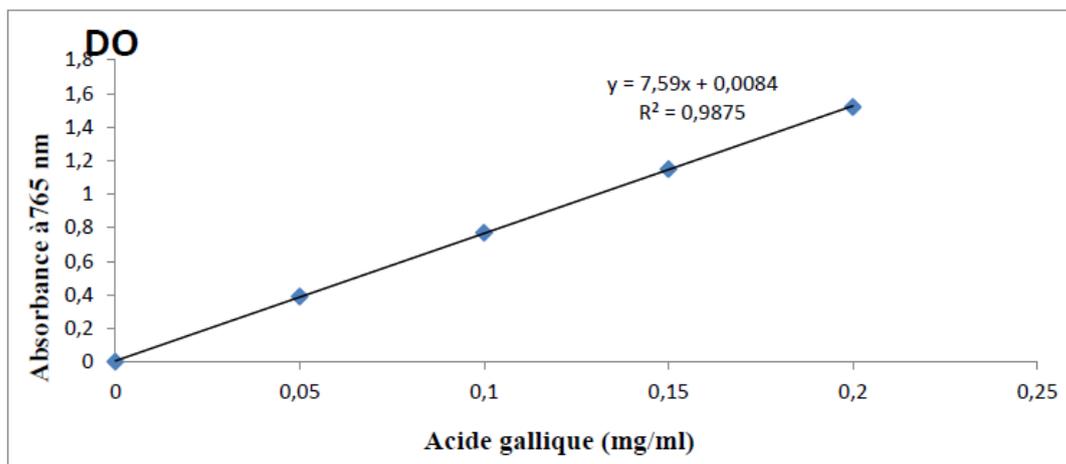


❖ Montage de digestion bucco-gastro-intestinale in vitro (nombre de cellules viables après la phase intestinale)

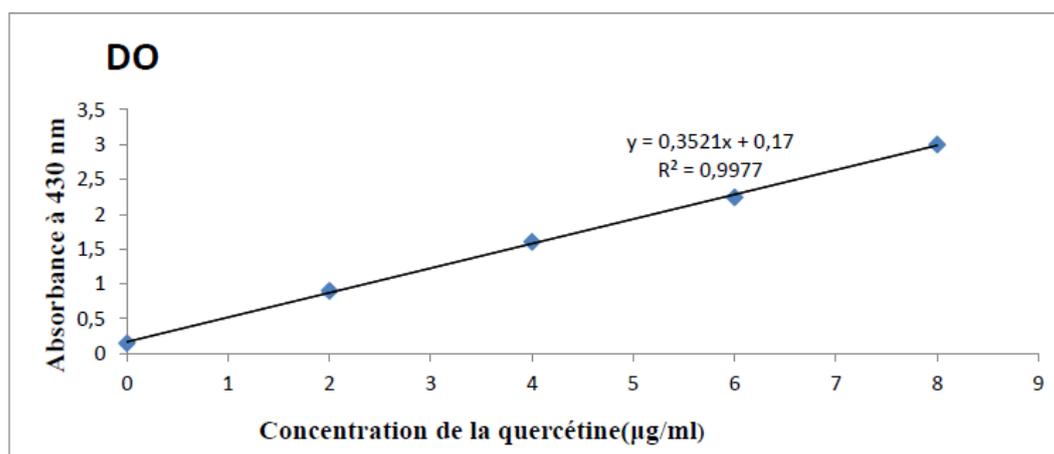


❖ Courbes d'étalonnage

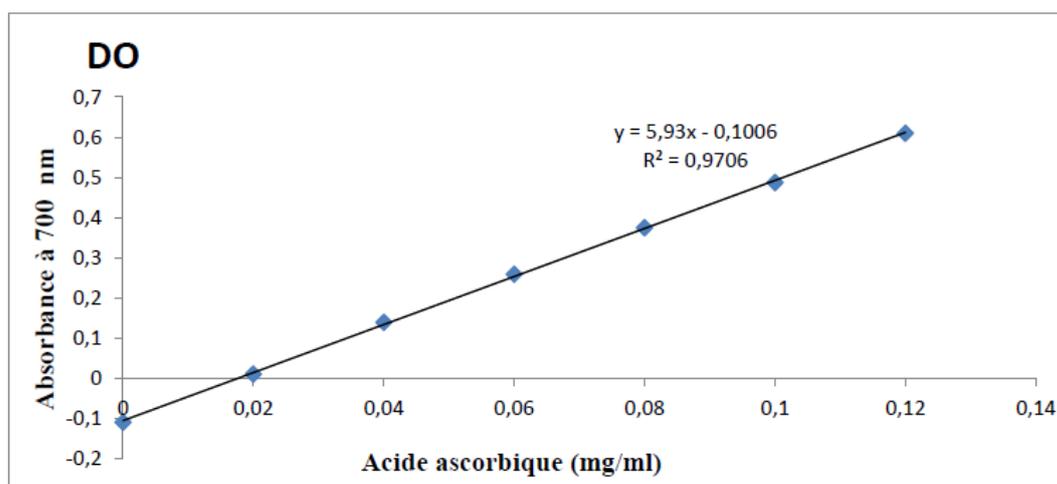
Annexe 7. Courbe d'étalonnage des composés phénoliques totaux (Acide galique)



Annexe 8. Courbe d'étalonnage des flavonoïdes (Quercétine)



Annexe 9. Courbe d'étalonnage pour le pouvoir réducteur (FRAP)



Thème : Survie et activité antioxydante de souches probiotiques dans un système simulé au tube digestif.

Réalisé par : Amel BOUMELTA
Nouraima BENFRIDJA

Encadreur : Pr. Tayeb IDOUI
Date de soutenance : 17/07/2021

RESUME

Dans cette présente étude, nous avons évalué la survie, la viabilité, les aptitudes probiotiques et l'activité antioxydante de *Lactiplantibacillus plantarum* S10 et *Lactiplantibacillus plantarum* BCX1 lors de la digestion dans des conditions simulées à celles du tractus bucco-gastro-intestinale. En outre, l'activité antioxydante de l'extrait et du jus de fraise soumis aux mêmes conditions digestive, et l'effet de la combinaison de la bactérie aux matrices végétales sur la viabilité et la survie lors de la digestion bucco-gastro-intestinale a été évaluée.

Les résultats ont montré que nos souches répondent aux critères de sélection des probiotiques avec une résistance aux conditions de la digestion. Soumis aux mêmes conditions, la matrice végétale (fraise) est considérée comme un bon véhicule pour le probiotique, la combinaison de ce dernier avec l'extrait et le jus de fraise a montré une augmentation du taux de survie et une amélioration des aptitudes probiotiques ainsi que le pouvoir antioxydant de nos souches.

Mots clés : *Lactiplantibacillus plantarum* S10 ; *Lactiplantibacillus plantarum* BCX1 ; digestion, survie, activité antioxydante, extrait, jus de fraise.

ABSTRACT

In this study, we evaluated the survival, the viability, the probiotic properties and antioxidant activity of *Lactiplantibacillus plantarum* S10 and *Lactiplantibacillus plantarum* BCX1 during digestion under conditions simulated to those of the oral-gastro-intestinal tract. In addition, the antioxidant activity of strawberry extract and juice subjected to the same digestive conditions, and the effect of the combination of the bacteria with fruit matrices on the viability and survival during oral-gastro-intestinal digestion has been evaluated.

The results showed that our strains meet the selection criteria for probiotics with resistance to digestive conditions. Subject to the same conditions, the plant matrix (strawberry) is considered a good vehicle for the probiotic, the combination of the latter with the extract and the strawberry juice has shown an increase in the survival rate and an improvement in probiotic abilities as well than the antioxidant ability of our strains.

Key words: *Lactiplantibacillus plantarum* S10; *Lactiplantibacillus plantarum* BCX1, digestion, survival, antioxidant activity, extract, strawberry juice.

ملخص

في هذه الدراسة الحالية قمنا بتقييم بقاء واستمرارية وقدرة الكائنات الحية المجهرية والنشاط المضاد للأكسدة لكل من *Lactiplantibacillus plantarum* S10 و *Lactiplantibacillus plantarum* BCX1، أثناء عملية الهضم في ظل ظروف مماثلة لتلك الخاصة بالجهاز الهضمي.

كما تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص وعصير الفراولة، اللذان يخضعان لنفس الظروف الهضمية، وتأثير مزيج البكتيريا مع الدعامة النباتية على قابلية البقاء أثناء عملية الهضم عن طريق الفم والجهاز الهضمي.

وقد بينت النتائج أن السلالتين تلبيان معايير اختيار البروبيوتيك مع مقاومة للظروف في الجهاز الهضمي. وفي ظل نفس الظروف تعتبر دعامة النبات (الفراولة) وسيلة نقل جيدة للبروبيوتيك، وكما أظهر الجمع بين هذا الأخير مع المستخلص وعصير الفراولة زيادة في معدل البقاء على قيد الحياة، وتحسناً في قدرات الكائنات الحية المجهرية وأيضاً القوة المضادة للأكسدة لهاتين السلالتين.

الكلمات المفتاحية: *Lactiplantibacillus plantarum* S10 ; *Lactiplantibacillus plantarum* BCX1 ; الهضم، القدرة الحيوية، نشاط المضاد للأكسدة، مستخلص، عصير الفراولة.