

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 والحياة
قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية وعلوم التغذية

Mémoire de Fin d'Etudes

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

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Effet de l'apport de matrices végétales (concombre, moringa) sur la survie, les propriétés probiotiques et les activités biologiques d'une culture mixte libre et encapsulé de *Lactiplantibacillus plantarum* après la digestion bucco-gastro-intestinale

Membres de Jury :

Président : D^r. M. BOUBZARI

Examineur : M^r. Y. RAHMOUNE

Encadreur : P^r. T. IDOUI



Présenté par :

M^{elle} : Asma BENSSAM

M^{elle} : Sadjia BOULAHIA

Année Universitaire 2021-2022

Numéro d'ordre (bibliothèque) :/.....



Remerciements

À travers ce modeste travail on tient à adresser nos sincères remerciements et reconnaissances.

En tout premier lieu, Nous remercions le Bon Dieu, tout puissant, de nous avoir donné la force pour survivre, ainsi qu'audace pour dépasser toutes les difficultés.

À l'honorable Professeur TAYEB IDOUI pour son encadrement, sa présence et sa bienveillance tout au long de cette expérience.

On tient particulièrement à remercier les membres du jury Dr. BOUBZARI et Mr. RAHMOUNE d'avoir accepté de juger ce travail.

Aussi, nous n'aurions jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes, dont la générosité ; la bonne humeur et l'intérêt manifestes à l'égard de notre recherche, nous ont permis de progresser.

Un très grand MERCI.



Asma et Sadjia

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

*A mon très cher **Papa***

*Que je remercie infiniment pour ses encouragements et son soutien, je
le remercie d'être à mes côtés, que Dieu le protège.*

*A ma très chère **Maman***

*Sans elle je ne serais jamais arrivée à ce que je suis maintenant, tu as
été toujours présente à mes côtés. Puisse le tout puissant te donner
santé, bonheur et longue vie.*

*A mes chères sœurs **Ibtissem et Imène***

*A mes chers frères **Anis, Youcef et Mohammed***

*A ma chère amie **Hanane***

*Pour leur compréhension, affection et patience, pour tous les bons
moments que nous avons partagés.*

*A mon binôme **Asma***

*Qui a partagé avec moi tous les moments difficiles pour réaliser ce
travail.*

Merci à toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

Sadjia

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.*

*Chers parents **Nabil et Wassila***

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects et mon amour
éternel pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour moi.
Je les remercie du fond du cœur pour leurs soutiens continus et
leurs tendresses.*

Je vous dédie ce mémoire en témoignage de ma profonde reconnaissance.

*A mes chères sœurs **Chaima et Douaa***

Un grand merci pour votre soutien, votre amour et vos encouragements.

*A mes copines **Nihed, Nada et Hala***

*Merci de m'avoir remonté le moral, m'encouragé et soutenu pendant
plusieurs années, j'ai vraiment des copines en or.*

*A mon binôme **Sadjia***

*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.*

Asma

Sommaire

Liste d'abréviations.....	i
Liste de figures.....	ii
Liste de tableaux.....	v
Introduction.....	1
Partie I. Synthèse bibliographique	
I.1. Définition des probiotiques.....	3
I.2. Microorganismes probiotiques.....	3
I.2.1. Données sur l'espèce <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	4
I.2.2. Potentiel probiotique de <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	4
I.3. Critères de sélection des souches probiotiques.....	5
I.4. Viabilité des probiotiques lors de la digestion.....	6
I.5. Maintien de la viabilité des souches probiotiques.....	7
I.5.1. Probiotiques de la première génération.....	7
I.5.2. Probiotiques de la deuxième génération.....	7
I.5.3. Probiotiques de la troisième génération.....	8
I.5.4. Probiotiques de la quatrième génération.....	8
I.6. Mécanismes d'action des probiotiques.....	8
I.7. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine.....	10
I.8. Activités biologiques des probiotiques.....	10
I.8.1. Activité antioxydante et Systèmes antioxydants enzymatiques.....	10
I.8.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	11
I.8.3. Activité biologique et microbiote intestinal.....	12
I.9. Interaction entre les probiotiques et les antioxydants des légumes.....	12
I.9.1. Polyphénols du concombre et du moringa comme antioxydants.....	12
I.9.2. Interaction entre les bactéries probiotiques et les polyphénols.....	13
I.10. Encapsulation des probiotiques.....	14
I.10.1. Définition et données sur l'encapsulation.....	14
I.10.2. Intérêt de l'encapsulation.....	15
I.10.3. Alginate comme matériel de l'encapsulation.....	15
I.10.4. Encapsulation par extrusion.....	16
I.11. Aliments fermentés aux probiotiques.....	17
I.11.1. Données sur les aliments fermentés.....	17
I.11.2. Rapport FAO/OMS évaluant la sécurité des probiotiques dans les aliments et les boissons.....	17
I.11.3. Aspects du contrôle de la qualité.....	18
I.11.4. Matrices alimentaires probiotiques.....	19
I.11.4.1. Matrices alimentaires d'origine végétale aux probiotiques.....	19

I.12. Domaines d'applications des probiotiques encapsulés	20
I.13. Défis de l'industrie des probiotiques	21
I.14. Marché actuel des probiotiques et perspectives d'avenir	21

Partie II. Etude expérimentale

II.1. Matériel.....	23
II.2. Méthodes	24
II.2.1. Revivification des souches et standardisation de l'inoculum	24
II.2.2. Test d'antagonisme	25
II.2.3. Encapsulation des souches.....	25
II.2.4. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques des souches mixtes <i>in vitro</i>	26
II.2.4.1. Résistance aux pH gastrique.....	26
II.2.4.2. Résistance aux sels biliaires	26
II.2.4.3. Hydrophobicité des surfaces cellulaires.....	27
II.2.4.4. Auto-agrégation.....	27
II.2.4.5. Co-agrégation	28
II.2.4.6. Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales	28
II.2.5. Détermination de l'activité antioxydante des souches mixtes <i>in vitro</i>	29
II.2.5.1. Résistance à la toxicité du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂ Scavenging Activity)	29
II.2.5.2. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	29
II.2.5.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles	30
II.2.6. Préparation du jus mixte, ensemencement, contrôle et activités biologiques.....	31
II.2.6.1. Préparation du jus de concombre, de l'infusion de moringa, de la mixture et ajout de probiotique.....	31
II.2.6.2. Contrôle de quelques paramètres physico-chimique des échantillons.....	31
II.2.6.2.1. pH.....	31
II.2.6.2.2. Degré Brix.....	31
II.2.6.2.3. Teneur en matière sèche (MS).....	32
II.2.6.2.4. Teneur en matière minérale (MM).....	32
II.2.6.2.5. Taux de sucres totaux.....	32
II.2.6.2.6. Teneur en polyphénols.....	33
II.2.6.2.7. Dosage des flavonoides.....	33
II.2.6.3. Activité antioxydante des échantillons	33
II.2.6.3.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	33
II.2.6.3.2. Réduction du fer (FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power).....	34
II.2.6.4. Evaluation de quelques paramètres de fermentation.....	34

II.2.6.4.1. Mesure des activités antioxydantes de jus lactofermenté.....	35
II.2.6.5. Activité Anti-inflammatoire	35
II.2.7. Effet de la digestion bucco- gastro- intestinale sur la viabilité de <i>L. plantarum in vitro</i>	36
II.2.7.1. Préparation des solutions mères des liquides simulés de la digestion	36
II.2.7.2. Protocole expérimental de la digestion bucco-gastro-intestinale <i>in vitro</i>	36
II.2.7.3. Effet de la digestion sur la survie, l'activité antioxydante et les aptitudes probiotiques <i>in vitro</i>	39
II.2.8. Effet de la digestion sur la biodisponibilité des polyphénols et des flavonoïdes <i>in vitro</i>	39
II.2.9. Effet de la digestion sur la survie, l'activité antioxydante et aptitudes probiotiques en présence de jus <i>in vitro</i>	39
II.2.10. Traitement statistique	40

Partie III. Résultats et Discussion

III.1. Pureté des souches, standardisation de l'inoculum et test d'antagonisme	41
III.2. Encapsulation des <i>L. plantarum</i> mixtes	42
III.3. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques de la culture mixte <i>in vitro</i>	42
III.3.1. Résistance au pH gastrique	42
III.3.2. Résistance aux sels biliaires	43
III.3.3. Hydrophobicité des surfaces cellulaires	44
III.3.4. Capacité d'auto-agrégation	46
III.3.5. Capacité de co-agrégation	46
III.3.6. Adhésion aux cellules intestinales et/ou mucus	47
III.4. Activité antioxydante <i>in vitro</i> des souches probiotiques.....	48
III.4.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène	48
III.4.2. Activité de piégeage des radicaux libres (DPPH)	48
III.4.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles.....	49
III.5. Paramètres physicochimiques du jus.....	50
III.5.1. pH	50
III.5.2. Degré Brix	51
III.5.3. Teneur en matière sèche	52
III.5.4. Teneur en matière minérale	53
III.5.5. Teneur en sucres totaux	54
III.5.6. Teneur en polyphénols totaux	54
III.5.7. Teneur en flavonoïdes	55
III.6. Activité antioxydante des matrices végétales.....	56
III.6.1. Piégeage de radical libre (DPPH).....	56

III.6.2. Pouvoir réducteur du fer.....	57
III.7. Evaluation de quelques paramètres de fermentation.....	58
III.7.1. pH et Acidité	58
III.7.2. Evolution du nombre de cellules viables.....	60
III.8. Activités antioxydantes de jus lactofermenté	60
III.8.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène.....	60
III.8.2. Activité de piégeage des radicaux libres (DPPH)	61
III.8.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles	62
III.9. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	63
III.10. Effet de la digestion sur la viabilité des souches <i>L. plantarum</i> mixtes	64
III.10.1. Nombre de cellules viables.....	64
III.10.2. Aptitudes probiotiques de <i>L. plantarum</i> mixte après la digestion bucco-gastro-intestinale	65
III.10.2.1. Résistance au pH gastrique	65
III.10.2.2. Résistance aux sels biliaires.....	66
III.10.2.3. Hydrophobicité	67
III.10.2.4. Auto-agrégation.....	68
III.10.2.5. Co-agrégation.....	69
III.10.3. Activité antioxydante des souches après digestion bucco-gastro-intestinale.....	70
III.10.3.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène	70
III.10.3.2. Activité de piégeage des radicaux libres de DPPH.....	70
III.10.3.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles	71
III.11. Digestion bucco-gastro-intestinale du jus mixte.....	72
III.11.1. Teneur en polyphénols	72
III.11.2. Teneur en flavonoïdes	73
III.11.3. Effet de la digestion sur l'activité antioxydante de jus mixte <i>in vitro</i>	74
III.11.3.1. L'activité de piégeage des radicaux (DPPH).....	74
III.11.3.2. Pouvoir réducteur du fer.....	75
III.12. Digestion <i>in-vitro</i> en combinant « bactéries/ jus ».....	76
III.12.1. Aptitudes probiotiques des <i>L. plantarum</i> mixte dans la matrice végétale	76
III.12.1.1. Survie et viabilité des <i>L. plantarum</i> mixtes	76
III.12.1.2. Résistance au pH gastrique	78
III.12.1.3. Résistance aux sels biliaires.....	79
III.12.1.4. Hydrophobicité	81
III.12.1.5. Capacité d'auto-agrégation	82
III.12.1.6. Capacité de la co-agrégation.....	82

III.12.2. Activité antioxydante des souches de <i>L. plantarum</i> en combinaison avec la matrice végétale.....	83
III.12.2.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène	83
III.12.2.2. Activité de piégeage de radicaln(DPPH)	84
III.12.2.3. Pouvoir réducteur du fer.....	85
III.13. Biodisponibilité des polyphénols et flavonoïdes après la combinaison des souches mixtes libres et encapsulées de <i>L. plantarum</i> avec la matrice végétale lors de la digestion....	87
III.14. Evaluation de l'activité anti inflammatoire de jus mixte combiné aux probiotiques....	89
Conclusion	91
Liste bibliographique.....	92
Annexes.....	Error! Bookmark not defined.

ANOVA : Analyse de la variance

ATCC : American Type Culture Collection

BL : bactéries lactiques

EAA : Equivalent Acide Ascorpique

EAG : Equivalent d'Acide Galique

EQ : Equivalent Quercétine

ERO : Espèces Réactives d'Oxygène

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

GPx: Glutathion peroxydase

GSH : Glutathione réduit

GSSG : Glutathion oxydé

M : Molaire

mM : millimolaire

N : Normalité

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NK : Naturel Killer

nm : nanomètre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS: Phosphate Buffered Saline

SOD: Superoxyde dismutase

TCA : Acide trichloro-acétique

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

Figure 1. Mécanismes d'action des probiotiques.....	9
Figure 2. Modulation de l'activité antioxydante par les probiotiques.....	11
Figure 3. Métabolisme microbien des composés phénoliques dans le système gastro-intestinal.....	13
Figure 4. Microcapsules probiotiques de formes et de tailles diverses.....	14
Figure 5. Micro-encapsulation des probiotiques par Extrusion.....	16
Figure 6. Évaluation globale de la sécurité et de la fonctionnalité du probiotique pour une utilisation dans des applications alimentaires.....	18
Figure 7. Schéma de la digestion bucco-gastro-intestinale <i>in vitro</i>	38
Figure 8. Aspect macroscopique de <i>L. plantarum</i>	41
Figure 9. Test d'antagonisme sur gélose MRS.....	41
Figure 10. Photographie des billes d'alginate de sodium à 2%.....	42
Figure 11. Taux de survie de la culture mixte sur des milieux aux différents pH.....	43
Figure 12. Survie de la mixture de <i>L. plantarum</i> en présence de 0.3% de sels biliaires.....	44
Figure 13. Pourcentage d'hydrophobicité des souches de <i>L. plantarum</i>	45
Figure 14. Pourcentage de co-agrégation de la culture mixte de <i>L. plantarum</i> avec les trois souches pathogènes.....	46
Figure 15. Photomicrographie de l'adhésion des souches de <i>L. plantarum</i> aux cellules épithéliales (Gx100).....	47
Figure 16. Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité des souches de la mixture.....	48
Figure 17. Capacité de la mixture de <i>L. plantarum</i> à piéger les radicaux libres de DPPH.....	49
Figure 18. Pourcentage de piégeage des radicaux hydroxyles par la culture mixte <i>L. plantarum</i> et son surnageant.....	50
Figure 19. pH de jus concombre, de l'infusion de Moringa et du mixte.....	51
Figure 20. Degré Brix de jus de concombre, de l'infusion du Moringa et du mixte.....	52
Figure 21. Matière sèche de jus de concombre, de l'infusion de Moringa et du mixte.....	53
Figure 22. Teneur en matière minérale de jus de concombre, de l'infusion de Moringa et du mixte.....	53
Figure 23. Teneur en sucres totaux de jus de concombre, de l'infusion de Moringa et du mixte.....	54
Figure 24. Teneur en polyphénols de jus de concombre, de l'infusion de Moringa et du mixte.....	55
Figure 25. Teneur en flavonoïdes de jus de concombre, de l'infusion de Moringa et du mixte.....	56
Figure 26. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des trois matrices végétales.....	57
Figure 27. Pouvoir réducteur des trois matrices végétales.....	58
Figure 28. Nombre des cellules viables dans le jus mixte de concombre-moringa après 24h de fermentation.....	60

Figure 29. Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité des souches de <i>L. plantarum</i> après 24h de fermentation.....	61
Figure 30. Pourcentage de piégeage de radicaux libre de DPPH après 24h de fermentation.	62
Figure 31. Pourcentage de piégeage de radical hydroxyle après 24h de fermentation.	62
Figure 32. Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des globules rouges traité par différents échantillons.....	63
Figure 33. Effet de la digestion sur la viabilité et la survie des cellules des souches mixte de <i>L. plantarum</i> (UFC/ml).	65
Figure 34. Taux de survie de <i>L. plantarum</i> mixte aux différents pH après la digestion bucco-gastro-intestinale	66
Figure 35. Taux de survie des souches de <i>L. plantarum</i> aux sels biliaires au niveau intestinale	67
Figure 36. Pourcentage d'hydrophobicité intestinale des souches de <i>L. plantarum</i> libre.....	68
Figure 37. Pourcentage d'auto-agrégation des souches mixtes de <i>L. plantarum</i> après la digestion bucco-gastro-intestinale	69
Figure 38. Pourcentage de la co-agrégation des souches libres de <i>L. plantarum</i> après la digestion intestinale	69
Figure 39. Résistance de <i>L. plantarum</i> mixte au peroxyde d'hydrogène après la digestion bucco-gastro-intestinale	70
Figure 40. Pourcentage de piégeage des radicaux DPPH par les souches mixtes de <i>L. plantarum</i> après digestion bucco-gastro-intestinale	71
Figure 41. Pourcentage de piégeage des radicaux hydroxyles par <i>L. plantarum</i> mixte après digestion bucco-gastro-intestinale.....	72
Figure 42. Teneur en polyphénols après la digestion bucco-gastro-intestinale.	73
Figure 43. Teneur en flavonoïdes après la digestion bucco-gastro-intestinale.	74
Figure 44. Pouvoir de piégeage des radicaux DPPH de jus mixte après la digestion bucco-gastro-intestinale	75
Figure 45. Pouvoir réducteur après la digestion bucco-gastro-intestinale.	76
Figure 46. Nombre de cellules viables de <i>L. plantarum</i> mixte combinée avec le jus mixte après la digestion.	77
Figure 47. Survie aux bas pH des souches de <i>L. plantarum</i> après la digestion (phase intestinale).....	79
Figure 48. Survie en présence de 0.3% de sels biliaires de <i>L. plantarum</i> mixte combinée aux	

matrices après la digestion (phase intestinale)	80
Figure 49. Pourcentage d'hydrophobicité intestinale des <i>L. plantarum</i> mixtes libres.....	81
Figure 50. Capacité d'auto-agrégation de <i>L. plantarum</i> mixte en présence de matrice végétale (niveau intestinal).....	82
Figure 51. Pourcentage de la co-agrégation de <i>L. plantarum</i> mixte libre après la digestion intestinale	83
Figure 52. Capacité de <i>L. plantarum</i> mixte à résister au peroxyde d'hydrogène au niveau intestinale	84
Figure 53. Piégeage de radicaux DPPH par <i>L. plantarum</i> mixte combinée avec la matrice végétale lors de la digestion.....	85
Figure 54. Pouvoir réducteur des souches mixtes libres et encapsulées véhiculées par la matrice végétale après digestion bucco-gastro- intestinale.....	86
Figure 55. Effet de la digestion <i>in vitro</i> sur la teneur en polyphénols en présence de <i>L. plantarum</i> mixte.....	88
Figure 56. Effet de la digestion <i>in vitro</i> sur la teneur en flavonoïdes en présence de <i>L. plantarum</i> mixte.....	89
Figure 57. Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des globules rouges traitées par le jus mixte combinée avec <i>L. plantarum</i> mixte	90

Tableau 1. Principales espèces utilisées comme probiotique à usage humain.....	3
Tableau 2. Les critères de sélection des probiotiques.....	5
Tableau 3. Microorganismes probiotiques micro-encapsulés utilisés dans des produits alimentaires.	21
Tableau 4. Composition des solutions simulées de la digestion	36
Tableau 5. Evolution de pH et l'acidité dans le jus mixte au cours de la fermentation.	59

Introduction

Le tractus gastro-intestinal humain héberge un réseau complexe et abondant de communauté microbienne connus sous le nom de microbiote. Ce dernier joue un rôle clé dans la résistance à la colonisation par des microbes envahisseurs (**Patel et al., 2016 ; Kim et al., 2017**).

Les probiotiques qui font partie du microbiote intestinal ont des effets positifs sur la santé de l'hôte. Ils modifient la composition de la microflore intestinale normale d'une composition potentiellement nocive vers une microflore qui a une activité bénéfique (**Ferdous et al., 2019**). Cependant, l'activité et la viabilité des probiotiques sont considérablement affectées par la complexité de l'environnement tissulaire/organique et les probiotiques ne peuvent donc pas rester stables à l'endroit ciblé. L'encapsulation des probiotiques a été développée comme un outil biotechnologique pour faire face aux problèmes technologiques dérivés de la manipulation et de l'application des probiotiques en industrie des aliments fonctionnels. L'encapsulation des probiotiques dans des biomatériaux permet non seulement de protéger la vitalité des probiotiques, mais aussi de mieux les acheminer vers leur cible (**Zhu et al., 2021**).

Le marché mondial actuel se préoccupe d'une alimentation saine et la demande des consommateurs en produits nobles tels les produits fonctionnels est en croissance permanente. Sur ce, une multitude de recherches a été menée sur le microbiote intestinal, l'effet du changement de l'alimentation sur ce dernier et le rôle des probiotiques dans le maintien de l'équilibre microbien intestinal (**Sampaio et al., 2022**).

En matière d'aliment, il a été rapporté que les légumes sont des matrices végétales non laitières très intéressantes comme vecteurs de probiotiques. Ils fournissent un environnement bénéfique et protègent la viabilité des probiotiques des facteurs de stress pendant la période de conservation du produit (**Lillo-pérez et al., 2021**).

L'objectif de ce travail consiste en premier lieu à évaluer la survie des souches mixtes de *L. plantarum* S10 et BCX1 libres et encapsulées *in vitro*, ainsi que leurs aptitudes probiotiques et leurs activité antioxydante et anti-inflammatoire avant et après le passage à travers les différents étages digestifs. En deuxième lieu, à évaluer l'activité antioxydante de jus mixte de concombre-moringa brut et fermenté et tester leurs effets sur la viabilité et l'activité antioxydante et de nos souches lors de la digestion bucco gastro-intestinale.

Ce manuscrit est composé de trois parties, la première est consacrée à la synthèse bibliographique dans laquelle nous abordons les éléments clés de la problématique, à savoir la survie des souches probiotiques, la méthode d'encapsulation et les avantages des produits

probiotiques pour la santé. Par ailleurs, nous nous sommes intéressées également aux matrices végétales, véhicules de probiotiques.

La seconde partie va regrouper les méthodes mises en œuvre pour réaliser ce travail, et la dernière va présenter les différents résultats obtenus et leur discussion. Enfin, une conclusion générale va résumer les grands axes de cette étude et la vision envisagée pour poursuivre et améliorer ce sujet de recherche.

Synthèse
bibliographique

I.1. Définition des probiotiques

Le terme probiotique est issu des termes Grec « pros » et « bios », signifiant « pour la vie » (Faure *et al.*, 2013). En 2002, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) ont adopté la définition suivante « Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte » (Markowiak et Ślizewska, 2017).

La définition officielle des probiotiques pourrait encore évoluer, car les champs de recherche pour mieux connaître et comprendre l'action de ces derniers sont encore nombreux (Yan et Goldman, 2020).

I.2. Microorganismes probiotiques

Selon la définition OMS, tous les microorganismes administrés vivants et ayant une action positive sur la santé peuvent être considérés comme probiotiques. Les plus courantes sont les *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* qui sont employés depuis longtemps comme probiotiques (Anal et Singh, 2007 ; Butel, 2014). La raison fondamentale en est, que ces deux genres sont majoritairement GRAS (Generally Regarded As Safe). Outre ces bactéries, des effets probiotiques ont été identifiés chez *Enterococcus*, *Streptococcus*, les levures (*Saccharomyces boulardii* et *Saccharomyces cerevisiae*) (Butel, 2014). Le tableau 1 regroupe les principales espèces probiotiques à usage humain.

Tableau 1. Principales espèces utilisées comme probiotique à usage humain (Markowiak et Ślizewska, 2017).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques	Autres micro-organismes
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus clausii</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	(<i>boulardi</i>)
<i>L. gasseri</i>	<i>B. breve</i>		
<i>L. helveticus</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. pentosus</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

I.2.1. Données sur l'espèce *Lactiplantibacillus plantarum*

L. plantarum est l'un des probiotiques les plus courants trouvé dans les aliments fermentés. C'est une bactérie lactique présente dans diverses niches écologiques, ce qui met en évidence ses capacités particulières d'adaptation et de plasticité génomique. Une autre fonction qui doit être soulignée est la capacité de *L. plantarum* à produire des bactériocines diverses et puissantes, qui sont des peptides antimicrobiens avec des applications possibles comme agents de conservation des aliments ou agents complémentaires des antibiotiques. L'ensemble de ces caractéristiques fait de *L. plantarum* un véritable modèle pour la recherche universitaire et un agent biologique viable aux applications prometteuses (Seddik *et al.*, 2017 ; Jiang *et al.*, 2021).

En effet *Lactiplantibacillus plantarum* est une bactérie lactique, bâtonnet, aéro-anaérobie facultative, non sporulée, mésophile, appartient au groupe B des lactobacilles (Al-Tawaha et Meng, 2018).

I.2.2. Potentiel probiotique de *Lactiplantibacillus plantarum*

Elle est l'une des espèces les plus importantes en microbiologie alimentaire et en nutrition humaine, en raison de son rôle dans la préservation des aliments ainsi que pour ses propriétés probiotiques. Elle peut tolérer l'environnement simulé du tube digestif, et la synthèse des métabolites antimicrobiens qui ont des effets inhibiteurs sur la croissance des bactéries pathogènes (Cao *et al.*, 2019).

Parmi ces métabolites, nous citons ce qui suit (Dinev *et al.*, 2018 ; De Montijo-Prieto *et al.*, 2019) :

- ✓ Les bactériocines appelées « plantaracines » appartenant à des bactériocines de classe II (bactériocines à deux peptides), qui ont une activité bactériostatique ou bactéricide ;
- ✓ Les acides organiques, tels que l'acide lactique ; l'acide acétique et l'acide propionique. Ces derniers provoquent un abaissement du pH local et inhibent la croissance des 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 sulfhydriles, entraînant la dénaturation

d'un certains nombres d'enzymes et de la peroxydation des lipides membranaires, permettant ainsi l'augmentation de la perméabilité membranaire ;

- ✓ Le dioxyde de carbone produit par *L. plantarum* peut jouer un rôle dans la création d'un environnement anaérobie qui inhibe les décarboxylations enzymatiques.

I.3. Critères de sélection des souches probiotiques

La sélection appropriée des souches probiotiques est une étape essentielle pour garantir les avantages souhaitables pour la santé. Elle doit répondre aux critères de sécurité, de fonctionnalité, de bonnes propriétés technologiques, et aux bénéfices santé revendiqués (Kareb et Aïder, 2019). Les différents critères de sélection sont groupés dans le **tableau 2**.

Tableau 2. Les critères de sélection des probiotiques (Markowiak et Ślizewska, 2017).

Critères	Propriétés requises
Sécuritaires	<ul style="list-style-type: none"> • D'origine humaine ou animale ; • Isolé du tractus gastro-intestinal d'individus en bonne santé ; • Historique d'utilisation en toute sécurité ; • Identification diagnostique précise (traits de phénotype et de génotype) ; • Absence de la capacité de couper les sels des acides biliaires. • Aucun effet indésirable ; • Absence de gènes responsables de la résistance aux antibiotiques localisés dans des éléments non stables.
Fonctionnelles	<ul style="list-style-type: none"> • Compétitivité vis-à-vis du microbiote habitant l'écosystème intestinal ; • Capacité à survivre et à maintenir l'activité métabolique et à se développer sur le site cible ; • Résistance aux sels biliaires et aux enzymes ; • Résistance au faible pH dans l'estomac ; • Compétitivité vis-à-vis des espèces microbiennes habitant l'écosystème intestinal (y compris les espèces étroitement apparentées) ; • Activité antagoniste vis-à-vis des agents pathogènes (par exemple, <i>H. pylori</i>, <i>Salmonella</i> sp., <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Clostridium</i>

difficile) ;

- Résistance aux bactériocines et aux acides produits par le microbiote intestinal endogène ;
- Adhésion et capacité à coloniser certains sites particuliers au sein de l'organisme hôte, avec un taux de survie dans le système gastro-intestinal.

Technologiques

- Facilité de la production de quantités élevées de biomasse et productivité élevée des cultures ;
- Viabilité et stabilité des propriétés souhaitées des bactéries probiotiques pendant le processus de préparation (congélation, lyophilisation), et de distribution de produits probiotiques ;
- Taux de survie élevé lors du stockage dans les produits finis (en conditions aérobies et micro-aérophiles) ;
- Garantie des propriétés sensorielles souhaitées des produits finis (dans le cas de l'industrie alimentaire) ;
- Génétiquement stable ;
- Résistance aux bactériophages.

I.4. Viabilité des probiotiques lors de la digestion

La viabilité bactérienne fait référence à la capacité d'une cellule à proliférer dans des circonstances environnementales spécifiques (Terpou *et al.*, 2019). La capacité des souches probiotiques à résister au stress gastro-intestinal est un facteur important pour la sélection des souches probiotiques. La capacité des probiotiques à survivre, à coloniser et à se multiplier à un pH faible, à un jus gastrique simulé ou en présence de sels biliaires est déterminée *in vitro* au cours du processus de sélection des produits probiotiques. L'intégration des probiotiques dans une matrice alimentaire peut protéger les cellules des conditions gastro-intestinales nocives dans ces circonstances, permettant ainsi d'augmenter le potentiel de survie et de colonisation (Arioli *et al.*, 2018).

L'une des premières barrières aux probiotiques lors de la digestion est l'estomac. Cet organe de tractus gastro-intestinal se caractérise par ses conditions acides. Sa forte acidité provient de la sécrétion d'acide chlorhydrique qui facilite la digestion des aliments et l'hydrolyse partielle des protéines. En outre, cette acidité empêche le passage pour

certaines microorganismes pathogènes, mais aussi de bactéries bénéfiques telles que les probiotiques (Jungersen *et al.*, 2014 ; Schubert, 2016 ; Castro-López *et al.*, 2022).

Au moment de l'administration, le probiotique doit être résistant aux enzymes présentes dans la cavité buccale, comme l'amylase et le lysozyme. Après l'ingestion, les cellules probiotiques sont confrontées à des facteurs antimicrobiens dans l'estomac (faible pH, suc gastrique et pepsine) et les intestins (pancréatine et sels biliaires) (de Melo *et al.*, 2018).

- ✓ **Au niveau de l'estomac** : La survie des probiotiques dépend de leur capacité à tolérer le pH faible du suc gastrique. Certaines souches tolèrent un pH très acide et peuvent rester totalement cultivables à pH=2, alors que d'autres non (Ayyash *et al.*, 2021).

- ✓ **Au niveau de l'intestin grêle** : Les microorganismes qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum et aussi avoir la capacité de se développer et proliférer en présence de ces acides biliaires (Baral *et al.*, 2021).

I.5. Maintien de la viabilité des souches probiotiques

I.5.1. Probiotiques de la première génération

Ils sont administrés sous forme de cellules bactériennes vivantes et/ou lyophilisées non recouvertes de gélules ou de microcapsules. Le taux de survie pour les souches probiotiques de la première génération était extrêmement faible, seulement 7 à 30 % (Klayraung *et al.*, 2009 ; De Vos *et al.*, 2010). Ces souches probiotiques avaient également une durée de conservation limitée (Trush *et al.*, 2020).

I.5.2. Probiotiques de la deuxième génération

Ils se présentent sous la forme lyophilisée en gélules ou en comprimés de polymères avec des charges synthétiques, semi-synthétiques ou naturelles. Le taux de survie de la souche atteint 80 %. L'ajout d'alginate de sodium comme agent gonflant au comprimé a augmenté le taux de survie des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal de 90 % ou plus dans les modèles expérimentaux, tout en prolongeant la durée de conservation à 6 mois. Le principal problème des probiotiques de la deuxième génération est la libération rapide et unique de

souches probiotiques dans le tractus gastro-intestinal proximal avant d'atteindre le côlon (Salas-Jara *et al.*, 2016 ; Trush *et al.*, 2020).

I.5.3. Probiotiques de la troisième génération

Il s'agit des souches bactériennes encapsulées dans une matrice polymère ou une microcapsule faite de polymères synthétiques, semi-synthétiques ou naturels afin d'augmenter leur longévité. Les souches probiotiques encapsulées sont libérées lors de la décomposition des microcapsules dans un état métaboliquement actif, soutenant l'activité des métabolites bactériens (Salas-Jara *et al.*, 2016).

I.5.4. Probiotiques de la quatrième génération

Les probiotiques encapsulés sont un type de cellule bactérienne qui existe sous forme de biofilms. Les probiotiques de la quatrième génération permettent une meilleure survie et une meilleure durée de conservation sans nécessiter de modifications particulières, ainsi que la libération d'une quantité importante d'UFC dans le côlon (Salas-Jara *et al.*, 2016).

I.6. Mécanismes d'action des probiotiques

Les probiotiques offrent divers avantages pour la santé grâce à leurs mécanismes biologiques dans l'organisme (Yoha *et al.*, 2021).

Les probiotiques produisent des post-biotiques tels que des acides gras à courte chaîne, des enzymes, de l'acide lactique et sécrètent également des peptides antimicrobiens dits bactériocines qui tuent les souches pathogènes. Ces bactériocines sont considérées comme des « conservateurs naturels » (Pickard *et al.*, 2017 ; Juturu et Wu, 2018). Les probiotiques sont également associés à des nutriments en compétition avec des agents pathogènes, inhibant/empêchant ainsi ces agents pathogènes d'adhérer à la lumière du côlon, améliorant la production de mucus et renforçant la barrière épithéliale de l'intestin pour stimuler le système immunitaire (Molska et Regula, 2019 ; Monteagudo-Mera *et al.*, 2019).

Les probiotiques réduisent les toxines grâce aux hydrolises des sels biliaires et augmentent la biodisponibilité des nutriments dans le corps grâce à d'autres activités enzymatiques (Allain *et al.*, 2018 ; Dubey et Patel, 2018 ; Skrypnik *et al.*, 2019). La capacité des probiotiques à adhérer à la muqueuse intestinale pour la colonisation et son

interaction avec la réponse immunitaire innée peuvent moduler la fonction de barrière des cellules épithéliales intestinales, entraînant des avantages pour la santé de l'hôte (**Bron et al., 2017 ; Suez et al., 2019**). Par conséquent, les probiotiques agissent comme adjuvants en modulant la réponse rapide de la muqueuse intestinale, renforçant ainsi le système immunitaire intestinal (**Galdeano et al., 2019**) (**Figure 1**).

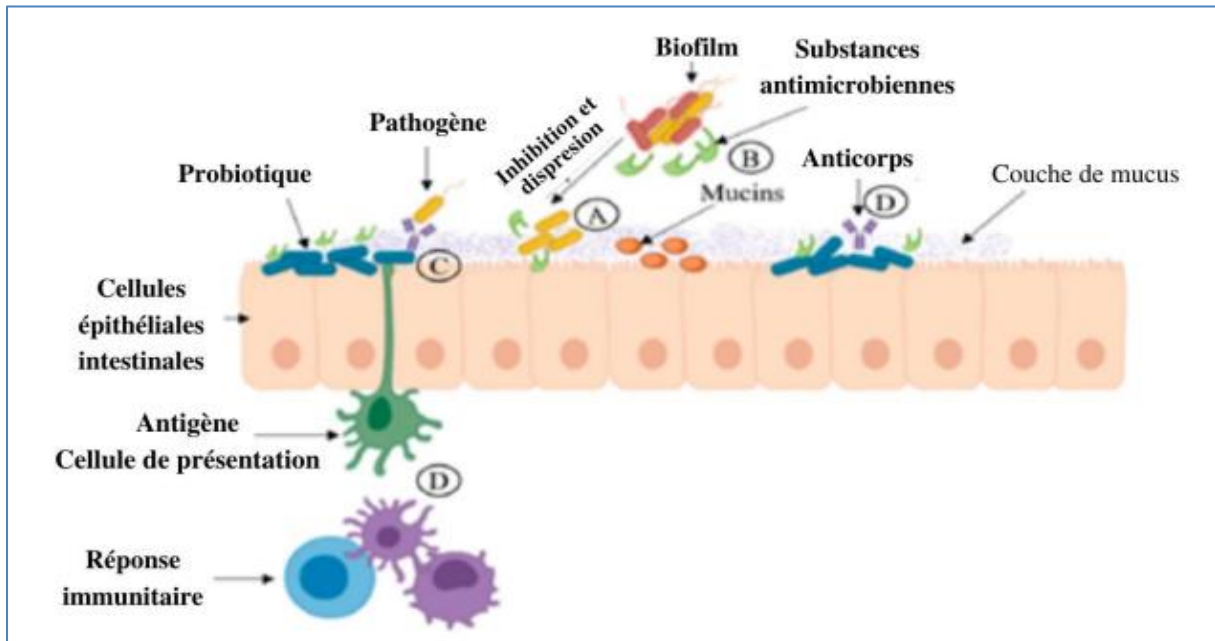


Figure 1. Mécanismes d'action des probiotiques (**Silva et al., 2020**).

(^A) Exclusion compétitive des microorganismes pathogènes. (^B) Production de substances antimicrobiennes.
 (^C) Augmentation de l'adhésion à la muqueuse intestinale et amélioration de la barrière épithéliale. (^D) Stimulation du système immunitaire.

Les bactéries probiotiques confèrent des réponses anti-inflammatoires en modulant différentes voies de signalisation. Différents effets anti-inflammatoires au niveau intestinal ont été décrits avec les probiotiques, par exemple, l'amélioration de la fonction de la barrière épithéliale dans l'intestin; l'atténuation du dysfonctionnement de la barrière dû aux cytokines pro-inflammatoires ; ou la modulation des réponses anti-inflammatoires intestinales telles que l'expansion de la réponse T-régulatrice, ce qui peut être pertinent pour son utilisation dans les maladies inflammatoires chroniques (**Piqué et al., 2019**).

Les probiotiques tels que les lactobacilles améliorent la production d'anticorps tels que les immunoglobulines de type G (IgG) et de type A (IgA), aide à prévenir l'invasion de la barrière muqueuse car les bactéries lactiques (BL) peuvent agir sur les cellules dendritiques et épithéliales intestinales ou améliorer l'expression du récepteur polymère des immunoglobulines. Les BL stimulent également la production d'IL-12 médiée par les

polysaccharides pour augmenter l'activité des tueurs naturelle (Natural Killer (NK)), ce qui améliore la défense de l'hôte. Certains probiotiques ont également démontré leur capacité à augmenter la production d'anticorps dans le but d'améliorer les défenses contre les invasions pathogènes (Ashaolu, 2020).

I.7. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine

Des études suggèrent que l'ingestion de probiotiques peut être recommandée comme approche préventive pour maintenir l'équilibre de la microflore intestinale et pour remédier à certaines maladies et troubles spécifiques (Prabhurajeshwar et Chandrakanth, 2017).

Voici quelques effets cliniques observés chez des personnes seines (Mendoza, 2019 ; Facioni et al., 2020 ; Tasdemir et al., 2020 ; Nikolova et al., 2022) :

- ✓ Agents antibactériens, antimutagènes, anticancéreux ;
- ✓ Prévenir ou réduire la prévalence des allergies dans les populations sensibles ;
- ✓ Contrôler les niveaux de cholestérol sérique ;
- ✓ Traiter la diarrhée associée à l'antibiothérapie et les infections gastro-intestinales ;
- ✓ Réduire l'intolérance au lactose ;
- ✓ Soulager les symptômes de la maladie inflammatoire de l'intestin, du syndrome du côlon irritable, de la colite, de la constipation et de la maladie alcoolique du foie ;
- ✓ Réduire le risque de cancer du côlon, du foie et du sein.

I.8. Activités biologiques des probiotiques

I.8.1. Activité antioxydante et Systèmes antioxydants enzymatiques

Nous citons ce qui suit :

- ✓ **Superoxyde dismutase (SOD)** : l'enzyme antioxydante la plus importante dans la défense contre le stress oxydatif, il empêché/ réparé les dommages oxydatifs des tissus (Sohag et al., 2019). Cette enzyme dismute l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) chez les bactéries lactiques (Ighodaro et Akinloye, 2018).
- ✓ **Catalase** : (peroxyde d'hydrogène oxydoréductase) est une enzyme importante qui se trouve dans presque toutes les cellules aérobies. Cette enzyme antioxydante responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques en formant de l'eau et de l'oxygène (Doğaç et al., 2015).

- ✓ **Glutathion peroxydase (GPX)** : est une enzyme qui appartient à la classe des composés de sélénocystéine, utilisent la forme réduite du glutathion pour réduire les peroxydes. Le cycle redox du glutathion joue un rôle clé dans la réduction des hydroperoxydes des intracellulaires (**Spyropoulos et al., 2011**). La **Figure 2**, illustre le rôle des probiotiques dans la modulation de l'activité antioxydante.

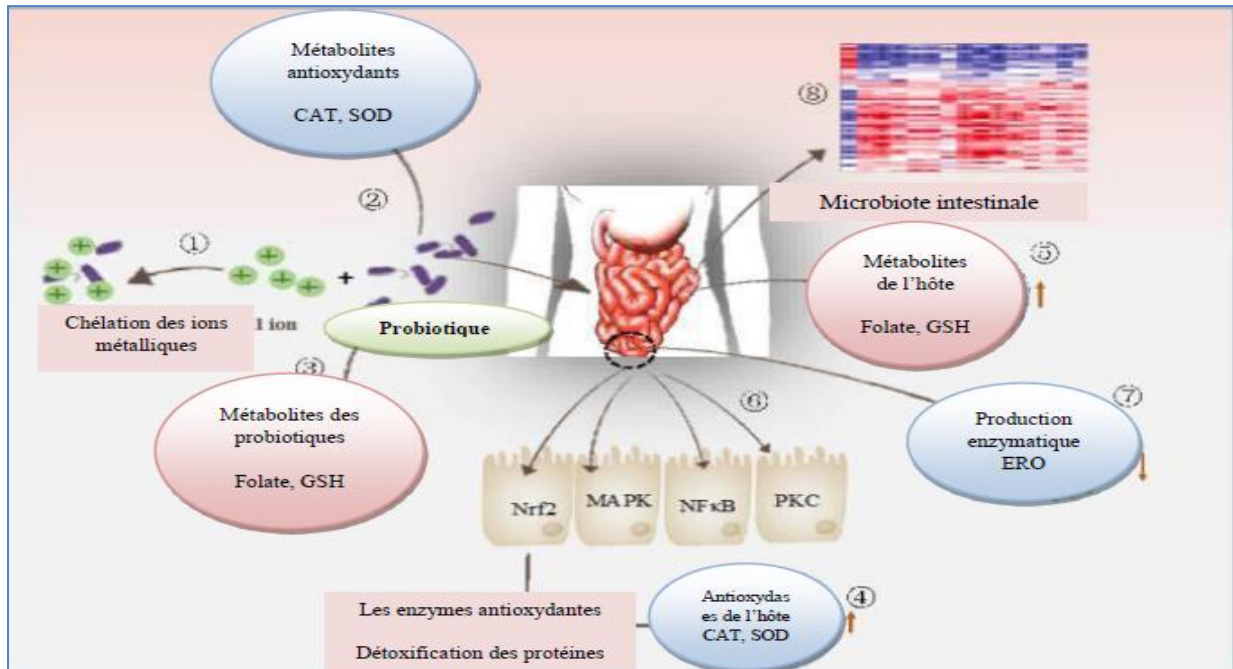


Figure 2. Modulation de l'activité antioxydante par les probiotiques (**Wang et al., 2017**).

- (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 antioxydase 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.

I.8.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Ce système renforce l'activité antioxydante des probiotiques dans les matrices alimentaires, il est composé de ce qui suit :

- ✓ **Glutathion (GSH)** : Est un antioxydant non enzymatique, également un protecteur et détoxifiant réside principalement dans sa fonction de co-substrat des glutathions peroxydases dans le cas de stress oxydant. Ce tripeptide présent sous forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG), il joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie redox intracellulaires (**Ali et al., 2020**).

- ✓ **Vitamine C** : Ou l'acide ascorbique, il est généralement considéré comme l'antioxydant hydrosoluble le plus efficace dans le plasma humain (**Kurutas, 2016**), se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire, elle capte les anions superoxydes, hydroxyles et peroxyde pour la formation de l'acide déhydro-L-ascorbique (DHA) (**Adwas et al., 2019**).
- ✓ **Vitamine E** : Ou α -tocophérol, est un liposoluble, elle se fixe aux membranes cellulaires (**Duncan et Suzuki, 2017**), elle capte les radicaux peroxydes lipidiques et le peroxyde d'hydrogène. Cette vitamine devient un radical non toxique, sa réduction est assurée par la vitamine C (**Hidalgo-Cantabrana et al., 2014 ; He et al., 2017**).

I.8.3. Activité biologique et microbiote intestinal

Les bactéries probiotiques peuvent jouer un rôle antagoniste vis-à-vis des bactéries pathogènes en produisant des composés antimicrobiens comme les acides organiques en particulier l'acide lactique, l'acide acétique et l'acide propionique, cette production peut aussi réduire le pH intestinal, qui peut diminuer le stress oxydatif afin de maintenir l'équilibre de la flore intestinale (**Wang et al., 2017**).

I.9. Interaction entre les probiotiques et les antioxydants des légumes

I.9.1. Polyphénols du concombre et du moringa comme antioxydants

La plupart des antioxydants des légumes est représenté par les polyphénols, ces derniers représentent un groupe complexe et très varié de substances naturelles d'origine végétale qui résultent des métabolites secondaires des plantes, et qui sont reconnus par une bioactivité forte, qui se traduit par une large gamme de propriétés biologiques au niveau de l'organisme (**Marin et al., 2015 ; Adriouche et al., 2017**).

Le concombre (*Cucumis sativus*) est un légume important appartenant à la famille des cucurbitacées. Des études ont démontré que le concombre contient des nutriments et des composants bioactifs comprennent la vitamine C, A, B6, le potassium, le bêta-carotène, le phosphore, le manganèse, les flavonoïdes, le magnésium, les lignanes et les triterpènes capables d'agir comme antioxydants et anti-inflammatoires (**Mandey et al., 2019**).

Les feuilles de la plante *Moringa oleifera* sont très nutritives, étant une bonne source de protéines, de β -carotène, de vitamines A, B, C et E, de riboflavine, d'acide folique, de pyridoxine, d'acide aminé, de minéraux et divers composés phénoliques. Les feuilles peuvent

être consommées fraîches ou stockées sous forme de matière séchée (Moyo *et al.*, 2012). La **Figure 3**, illustre les différentes classes des composés polyphénoliques.

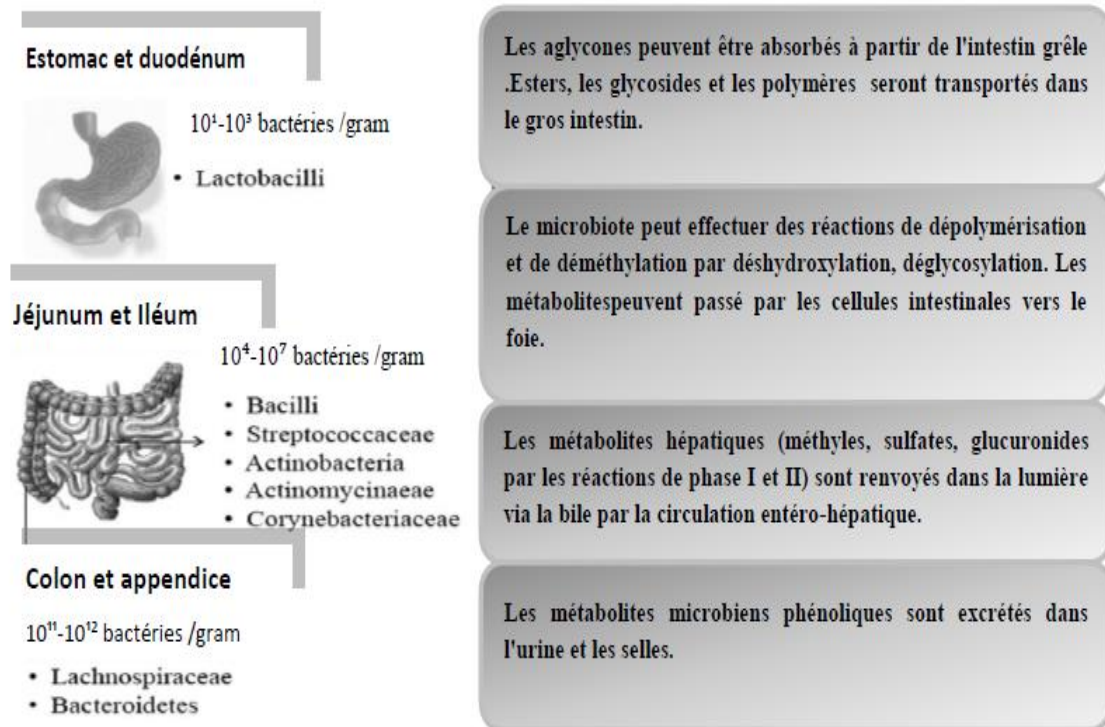


Figure 3. Métabolisme microbien des composés phénoliques dans le système gastro-intestinal. (Pathak *et al.*, 2018).

I.9.2. Interaction entre les bactéries probiotiques et les polyphénols

Il existe deux interactions réciproques principalement entre microbiote intestinal et les polyphénols :

- ✓ **Métabolisme des polyphénols par la microflore intestinale** : Les polyphénols alimentaires subissent un métabolisme complexe, en interagissant avec divers enzymes humains et microbiens incluent différentes réactions comme la déconjugaison, la déshydroxylation, la dépolymérisation, la déglycosylation et la déméthylation, ce qui entraîne une production d'un nombre énorme de métabolites de polyphénols et de produits cataboliques circulants et excrétés (Hervert- Hernandez et Goñi, 2011).
- ✓ **Modulation du microbiote intestinal** : Les polyphénols peuvent exercer deux rôles importants, en inhibant les bactéries pathogènes, et certains auteurs suggèrent que les polyphénols peuvent agir en tant que prébiotiques, stimulant les bactéries bénéfiques principalement les lactobacilles et améliorant les interactions entre l'hôte et les

microorganismes (Hervert-Hernandez et Goñi, 2011 ; Aravind *et al.*, 2021). Des études ont démontré que la catéchine stimule significativement la croissance de *Clostridium coccoïdes*, *Eubacterium recalc*, car elle inhibe de manière significative la croissance de *Clostridium histolyticum*, ensuite la croissance de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus. spp* est relativement non affectée (Pathak *et al.*, 2018).

I.10. Encapsulation des probiotiques

I.10.1. Définition et données sur l'encapsulation

La micro encapsulation est un procédé physico-chimique ou mécanique qui piège et protège un micro-organisme potentiellement sensible d'un environnement extérieur. Les cellules sont complètement enfermées dans le matériau de la paroi pendant le processus d'encapsulation (Rajam et Subramanian, 2022).

Des microcapsules probiotiques avec différentes structures sont répertoriées dans la **Figure 4**. Elles peuvent être brisées sous l'influence de la chaleur, de la solvatisation, de la diffusion et de la pression. Lorsqu'elles pénètrent dans les intestins, elles peuvent rester intactes et résister aux conditions acides tout en libérant progressivement des probiotiques ou des substances actives (Zhu *et al.*, 2021).

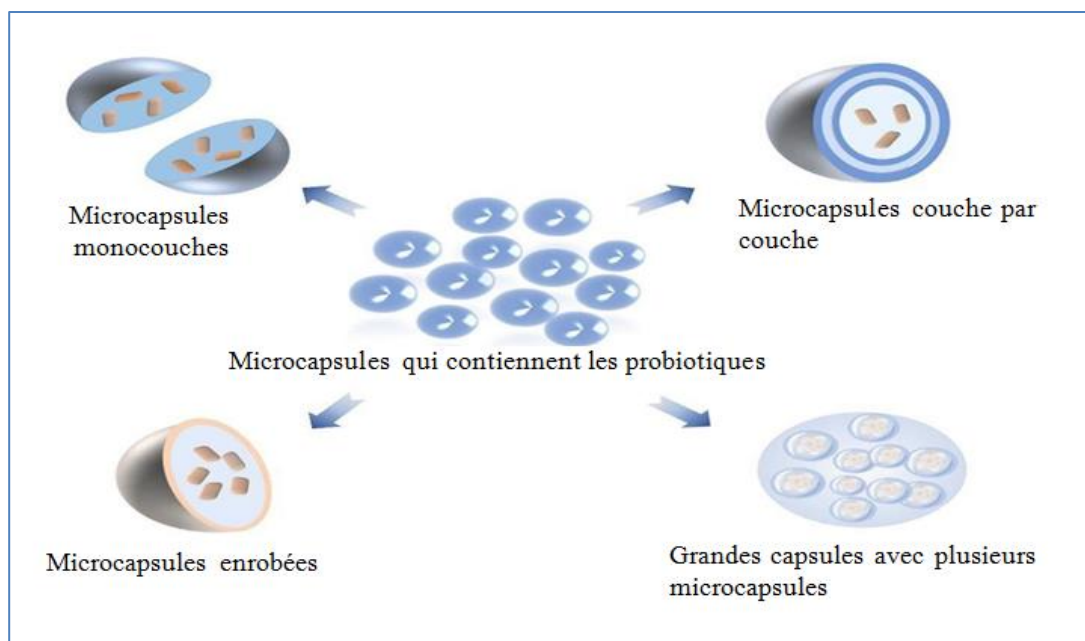


Figure 3. Microcapsules probiotiques de formes et de tailles diverses (Zhu *et al.*, 2021).

I.10.2. Intérêt de l'encapsulation

L'encapsulation réduit la perte de viabilité cellulaire en séparant les cellules bactériennes d'un environnement hostile. Il a été trouvé que les bactéries lactiques probiotiques utilisées dans les applications alimentaires et encapsulées dans des microcapsules de graisse solide conservent toute leur activité biologique (**Ghorbani et al., 2021 ; Cai et al., 2022 ; Rajam et Subramanian, 2022**).

La micro-encapsulation constitue un grand axe de recherche pour développer de nouveaux produits de l'industrie alimentaire par l'incorporation d'ingrédients actifs et fonctionnels dans les nouvelles matrices alimentaires. Les microcapsules offrent non seulement une protection et améliorent la biodisponibilité et la stabilité des substances bioactives et des colorants naturels, mais elles améliorent également la saveur en masquant le goût des aliments enrichis en vitamines et minéraux, et empêchent leur interaction avec d'autres ingrédients, facilitant ainsi leur distribution (**Reque et al., 2021 ; Zhang et al., 2022**).

Une stratégie d'encapsulation doit tenir compte des facteurs suivants afin de préserver les caractéristiques des probiotiques (**Yoha et al., 2021**) :

- ✓ **Stabilité des probiotiques** : assurance d'une rétention accrue de la viabilité des bactéries probiotiques encapsulées ;
- ✓ **Fonctionnalité des probiotiques** : après encapsulation, les propriétés fonctionnelles telles que l'adhérence au mucus, l'agrégation, la résistance aux acides gastriques, aux sels biliaires et aux enzymes digestives, ainsi que l'action antibactérienne contre d'éventuels agents pathogènes, doivent être conservées ;
- ✓ **Sécurité et efficacité** : la souche probiotique doit être sûre, non contaminée, et conserver son pouvoir thérapeutique après encapsulation ;
- ✓ **Capacité de ciblage** : une meilleure tolérance au stress environnemental et capacité de se concentrer sur le côlon pour l'amélioration de la flore intestinale et les effets positifs sur la santé.

I.10.3. Alginate comme matériel de l'encapsulation

L'alginate est une substance biopolymère biodégradable, d'un prix raisonnable et non toxique. Les alginates sont généralement extraits d'algues brunes (Phaeophyceae). Elle possède deux unités structurales constituées d'acide L-guluronique et d'acide D-mannuronique formés à partir d'ions calcium (Ca^{2+}). L'utilisation de l'alginate comme

matériau d'encapsulation a des effets protecteurs et augmente la viabilité des probiotiques. Il a été démontré que l'encapsulation par l'alginate maintient les bactéries vivantes à 51,29 % au maximum, alors que les bactéries libres ne pouvaient survivre qu'à 27,16 % (Adilah *et al.*, 2022).

I.10.4. Encapsulation par extrusion

Dans le secteur alimentaire, plusieurs techniques d'encapsulation ont été développées avec succès au fil du temps. La **Figure 5** illustre celle dite encapsulation par extrusion.

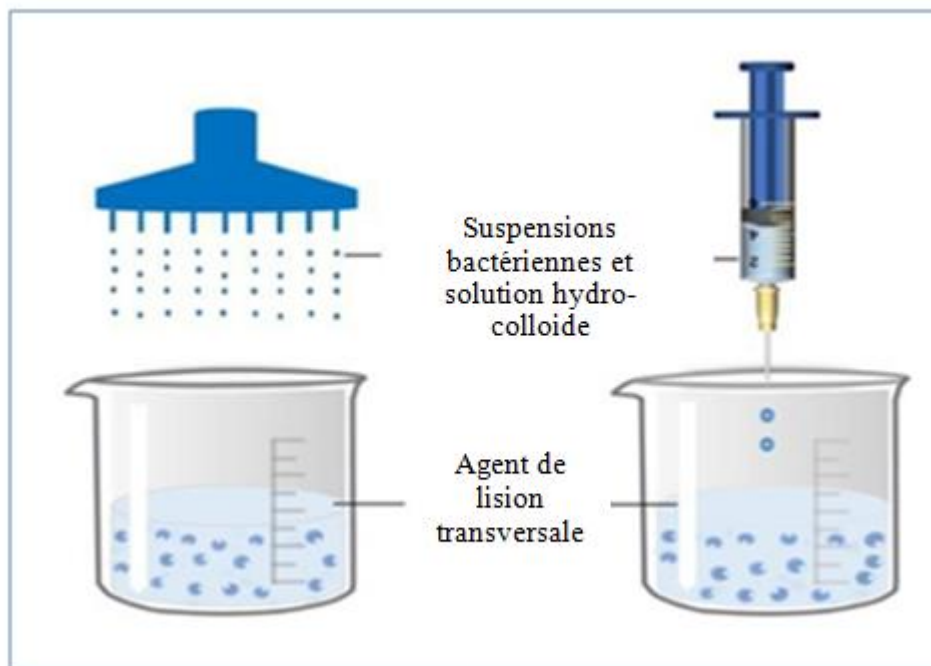


Figure 4. Micro-encapsulation des probiotiques par Extrusion (Zhu *et al.*, 2021).

La méthode d'extrusion est une méthode simple et polyvalente pour l'encapsulation stable des cellules vivantes en raison de son faible coût, de ses dommages minimes et de son taux de survie élevé. Le processus de préparation consiste à ajouter des cellules probiotiques à une solution hydrocolloïde et à ajouter des gouttelettes à l'aide d'un pulvérisateur à buse ou d'une simple aiguille. Ensuite, les gouttelettes tombent dans la solution de durcissement (généralement une solution de CaCl_2) pour obtenir des treillis tridimensionnels, dans lesquels les cellules sont piégées par le polymère. Cette méthode est douce, ce qui peut réduire les dommages aux probiotiques et améliorer l'efficacité de l'encapsulation. Le diamètre peut être ajusté en modifiant des paramètres, notamment le type, la viscosité et la concentration de la solution, ainsi que la distance entre l'aiguille et la solution (Zhu *et al.*, 2021). L'inconvénient de cette technique est qu'elle est

difficilement utilisable pour une production à grande échelle en raison de la formation lente de microbilles (Jacobsen *et al.*, 2020).

I.11. Aliments fermentés aux probiotiques

I.11.1. Données sur les aliments fermentés

Les aliments fermentés sont des réservoirs de microorganismes potentiellement probiotiques qui possèdent des caractéristiques technologiques encore meilleures que celles des microorganismes probiotiques d'origine humaine, et mieux adaptés aux conditions hostiles rencontrées dans la matrice alimentaire. Dans ce contexte, le lait et les produits laitiers fermentés sont les réservoirs de probiotiques les plus étudiés et les plus connus, mais les aliments fermentés non laitiers sont également apparus comme des véhicules de microorganismes potentiellement probiotiques. De plus, la grande diversité microbienne de ces aliments fermentés offre de nouvelles possibilités de recherche de nouvelles souches présentant des caractéristiques technologiques et favorables à la santé. La recherche portant sur de nouveaux aliments fonctionnels aux probiotiques ne cesse de s'élargir en raison de l'impact de l'alimentation sur la santé (Tripathi et Giri, 2014 ; Fusco *et al.*, 2022).

Dans la majorité des cas, les probiotiques sont utilisés comme des aliments fonctionnels ou sont utilisés sous forme de compléments alimentaires (Boudouhi *et al.*, 2005) :

- ✓ **Les compléments alimentaires :** Les compléments alimentaires sont des denrées alimentaires, leur but est de compléter le régime alimentaire normal et d'assurer un effet nutritionnel ou physiologique. Ils constituent une source concentrée de nutriments, vitamines ou d'autres substances et sont commercialisés sous forme de doses (gélules, pastilles, comprimés, sachets de poudre ou ampoule) ;
- ✓ **Les aliments fonctionnels :** Ils sont considérés comme des aliments courants destinés à être consommés dans le cadre d'une alimentation équilibrée et variée et qui contiennent des composés biologiquement actifs qui exercent un effet bénéfique sur l'organisme, au-delà des effets nutritionnels de base, de manière à améliorer la santé et le bien-être et/ou à réduire le risque de maladie.

I.11.2. Rapport FAO/OMS évaluant la sécurité des probiotiques dans les aliments et les boissons

Le consortium conjoint FAO/OMS, qui s'est réuni à Cordoba (Argentine) du 1er au 4 octobre 2001, a reconnu la demande croissante du marché pour les aliments et les boissons à base de

probiotiques qui doit être rationalisée par des directives appropriées, une approche systématique et une évaluation de la sécurité des probiotiques avant qu'ils n'atteignent les consommateurs. Le groupe de consultation a également défini les méthodes d'évaluation des probiotiques dans les aliments qui apporteront d'autres avantages pour la santé (**Figure 6**).

L'objectif du groupe de travail spécialisé était de déterminer et d'énoncer les normes minimales pour les probiotiques dans les aliments qui doivent être présentes pour qu'un article puisse porter la désignation " aliment probiotique " (**FAO/OMS, 2002**).

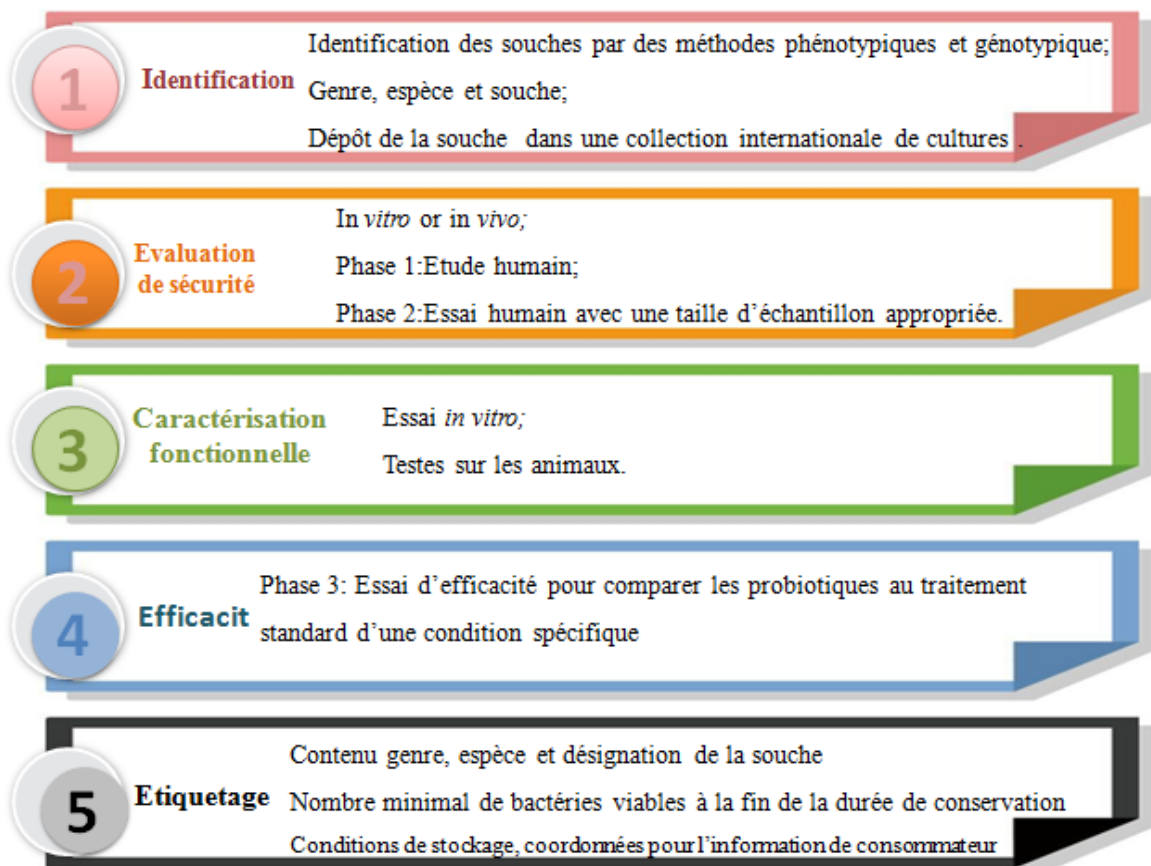


Figure 5. Évaluation globale de la sécurité et de la fonctionnalité du probiotique pour une utilisation dans des applications alimentaires (**Koirala et Anal, 2021**).

I.11.3. Aspects du contrôle de la qualité

Les probiotiques ne sont généralement pas faciles à utiliser dans les milieux industriels. Les articles largement répandus destinés à l'utilisation humaine sont préparés par le processus de fermentation ou sous forme de poudres ou de comprimés. Ces capsules et comprimés ne sont pas destinés à un usage médical (**Das et al., 2022**).

La souche probiotique doit respecter des paramètres de qualité communs conçus par la FAO et l'OMS, tels que (a) l'identification génétique des souches probiotiques revendiquées, (b) une croissance élevée en nombre, c'est-à-dire en unités formatrices de colonies (UFC) par gramme des produits finaux de chaque souche, (c) la stabilité et la viabilité, (d) la pureté de la souche sélectionnée, (e) et un étiquetage approprié des produits probiotiques fournissant des informations précieuses sur leur valeur nutritive, la date de production de ces aliments et la date d'expiration(**Das et al., 2022**).

I.11.4. Matrices alimentaires probiotiques

Le marché des aliments probiotiques croît très rapidement en raison de la demande accrue des consommateurs à cause de l'influence des aliments fonctionnels sur leur santé et leur forme physique, ainsi les produits probiotiques représentent 60 à 70 % de l'ensemble du marché des aliments fonctionnels (**Tripathi et Giri, 2014**).

Les produits alimentaires laitiers ont été traditionnellement considérés comme les meilleurs vecteurs de microorganismes probiotiques. Néanmoins, récemment, des aliments non laitiers alternatifs ont été utilisés pour la séparation d'isolats probiotiques possibles pour la fabrication d'aliments probiotiques non laitiers innovants, et d'autre part, il a été démontré que les produits probiotiques non laitiers sont plus attrayants (**Min et al., 2019 ; Aspri et al., 2020**).

I.11.4.1. Matrices alimentaires d'origine végétale aux probiotiques

Les légumes peuvent être des vecteurs de probiotiques en raison de leur teneur élevée en glucides, vitamines et minéraux. Les légumes sont également riches en phytochimiques et en phytonutriments, et leur composition physique offre un environnement protecteur aux probiotiques. Les légumes fermentés ou peu transformés sont des alternatives pour le développement de produits à base de plantes. Ces produits ont suscité un intérêt en tant que porteurs de probiotiques et comprennent, entre autres, la betterave, la carotte, le chou, le brocoli, l'aloevera, le soja, l'amande et la noix (**Ranadheera et al., 2017**).

Le moringa est une culture nutritive et riche en antioxydants, et ses feuilles sont principalement commercialisées sous forme de poudre, car elles constituent une source complète de protéines. (**Lillo-Pérez et al., 2021**). Il est riche en macro et micronutriments et autres composés bioactifs qui sont importantes pour le fonctionnement normal du corps et la prévention de certaines maladies. Feuilles, fleurs, graines et presque tout certains parties de

cet arbre sans comestibles et ont d'immenses propriétés thérapeutiques, notamment antidiabétiques, anticancéreuses, antimicrobiennes, et antioxydant. La plupart des études récentes ont suggéré que le moringa devrait être utilisé comme ingrédient fonctionnel dans les aliments (**Islam et al., 2021**).

Le concombre est très faible en calories et riche en fibres alimentaires. Il n'a pas aucun cholestérol et bon pour les patients cardiaques.

Il peut prévenir de nombreux problèmes digestifs comme l'acidité. Le jus de concombre est une source de carbone et sous utilisée avec des nutriments bénéfiques. Ce jus végétale peut être exploité pour ses bienfaits thérapeutiques (**Soundara Rajan et al., 2018**).

Les fruits étant des aliments importants en raison de leur contenu nutritionnel élevé et de leur fonction essentielle dans le maintien de la santé humaine. Plusieurs études ont examiné la viabilité de divers jus de fruits comme substrats véhiculant les probiotiques. Ainsi, plusieurs produits à base de fruits ont été développés, notamment l'ananas, la mangue, le raisin, l'orange, les baies, la pêche, la banane, le fruit de la passion, la pastèque et la cerise (**Lillo-Pérez et al., 2021**).

I.12. Domaines d'applications des probiotiques encapsulés

La plupart des aliments fonctionnels disponibles sur le marché mondial sont enrichis en micro-organismes probiotiques libres, tandis que seule une faible partie utilise leur forme micro-encapsulée. Les principaux produits alimentaires fonctionnalisés par l'ajout de microcapsules probiotiques sont les produits laitiers (yaourt et fromage), de boulangerie (pain, gâteaux, biscuits), la viande (saucisses fermentées) et les jus (fruits et légumes) (**De Prisco et Mauriello, 2016**).

Tableau 3. Microorganismes probiotiques micro-encapsulés utilisés dans des produits alimentaires (Reque et Brandelli, 2021).

Produit alimentaire	Probiotique	Matériau de revêtement	Encapsulation
Jus de fruits	<i>Lb. plantarum</i> et <i>B. longum</i>	Alginate	Extrusion
Jus de carotte	<i>Lb. acidophilus</i>	Alginate	Extrusion
Kéfir	<i>B. animals</i>	Alginate	Extrusion
Cheddar fromage	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. infantis</i>	Alginate	Emulsion
Crème glacée	<i>Lb. casei LC-01</i> <i>B. lactis BB12</i>	Alginate	Emulsion

I.13. Défis de l'industrie des probiotiques

Les fruits, les légumes, les céréales et les produits à base de légumineuses représentent un support prometteur pour les bactéries probiotiques ayant de bons composants nutraceutiques. Cependant, il existe certaines limites qui pourraient empêcher la production de probiotiques non laitiers au niveau industriel, comme les caractéristiques sensorielles, l'acceptation générale et, surtout, la survie des probiotiques tout au long du stockage (Perricone *et al.*, 2015). Pour conquérir ces avantages pour la santé, la viabilité des probiotiques dans différents milieux acides/basiques/salés après consommation est cruciale. Les micro-organismes sélectionnés doivent posséder la capacité de tolérer la bile et l'acide, la colonisation dans l'intestin humain, l'affection aux cellules épithéliales des personnes ; de bonnes caractéristiques de croissance, non pathogènes, GRAS et un bon impact sur la santé des personnes (Tripathi et Giri, 2014).

I.14. Marché actuel des probiotiques et perspectives d'avenir

Le marché des bactéries probiotiques a connu une croissance significative ces dernières années. Outre la perception positive des consommateurs en raison de leurs propriétés saines, la prescription de probiotiques par les professionnels de santé après une intervention chirurgicale ou après la prise d'antibiotiques contribue à l'augmentation de la consommation d'aliments fonctionnels et de compléments contenant des probiotiques. En conséquence, et selon l'étude réalisée par Fortune Business Insights le marché mondial des probiotiques a

atteint 48,88 milliards de dollars US en 2019 et devrait atteindre 94,48 milliards de dollars US en 2027. Dans l'industrie des aliments et des boissons, ainsi que dans les compléments alimentaires les souches les plus utilisées pour les ingrédients probiotiques en 2022 seront *Lactobacillus*, suivies de *Bifidobacterium* et *Streptococcus*. Les préoccupations croissantes des consommateurs en matière de santé ont entraîné une augmentation de la demande de produits alimentaires sains. (Chávarri *et al.*, 2022).

Etude Expérimentale

Notre travail a été réalisé dans laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, durant la période **Mai - Juin 2022**.

II.1. Matériel

- ✓ **Souches bactériennes** : Au cours de cette étude, nous avons utilisé deux souches de bactéries lactiques fournies par Mr. Khennouf, il s'agit de *Lactiplantibacillus plantarum* codée S10 isolée du rumen de chèvre de race local et *Lactiplantibacillus plantarum* codée BCX1, cette dernière a été isolée du beurre de chèvre.
- ✓ Nous avons également utilisé deux souches à Gram⁻ et une à Gram⁺ pour effectuer le test de la co-agrégation avec les souches lactiques *in vitro*, il s'agit de *Staphylococcus aureus* ATCC 29522(A), *Escherichia coli* ATCC 3569 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2753.
- ✓ **Cellules épithéliales intestinales** : Elles ont été préparées au niveau du laboratoire à partir de l'intestin de l'espèce *Gallus gallus*. Elles vont servir pour le test d'adhésion.
- ✓ **Matrices végétales** : Un légume, le concombre et une plante Moringa ont été acheté du marché pour la préparation de jus et des infusions.
- ✓ **Produits chimiques et réactifs** : Pour la réalisation de notre travail, nous nous sommes servis de ce qui suit :
 - **Sels** : Chlorure de calcium (CaCl₂), Chlorure de potassium (KCl), Chlorure de sodium (NaCl), Carbonate de sodium, Chlorure d'aluminium (AlCl₃), Ferricyanure de potassium (K₃Fe (CN)₆).
 - **Acides, bases et alcool** : HCl, NaOH, Sels biliaires, Acide gallique, Acide ascorbique, Acide trichloro- acétique (TCA), Ethanol.
 - **Réactifs** : phénolphtaléine, Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2-diphényl-2 picryle hydrate de hydrazyl), Peroxyde d'hydrogène, Alginate de sodium.
 - **Tampons** : Tampon phosphate salin (PBS).
 - **Colorants** : Violet de Gentiane, Lugol, Fushine, Cristal violet.
 - **Milieux de culture** : Un seul milieu de culture a été utilisé : milieu Man-Rogosa et Sharp MRS avec les deux formes, bouillon et gélose.
 - **Enzymes et autres** : il s'agit de la pepsine (2000U/ml) de l' α -amylase (75U/ml) et de la pancréatine (100U/ml), Alginate de sodium.

- ✓ **Appareillage** : La réalisation du travail a nécessité ce qui suit :
- Bec Bunzen.
 - Autoclave (Slli AVX électrique), Four pasteur (Memmert), Etuve (Memmert).
 - Centrifugeuse (Hettich EBA 20).
 - Spectrophotomètre optique (Specord plus).
 - PH mètre (HANNA).
 - Balance électronique (Kern EMB 600-2), Balance analytique.
 - Réfractomètre.
 - Agitateur magnétique chauffant (Heidolph MR 3002), Vortex (VWR).
 - Réfrigérateur (ENIEM).
 - Microscope à caméra, Microscope optique.

II.2. Méthodes

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

L. plantarum S10 et BCX1 ont été cultivées dans le bouillon (MRS), puis 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. En vue de confirmer cette pureté, une observation macroscopique (aspect des colonies) et microscopique (coloration de Gram) ont été faite 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, nous avons appliqué la même technique, avec les mêmes conditions et le même milieu de culture pour la standardisation de l'inoculum des souches.

Un volume de 1ml de chaque 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^{-8} . La gélose MRS a été ensemencée à partir des dilutions 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} et le dénombrement a été effectué après une incubation à 37°C pendant 48h. Le nombre de cellules vivantes par ml de culture est exprimé en UFC/ml selon la formule suivante (**Wang et al., 2021**).

$$\text{Nombre (UFC/ml)} = \Sigma C / V (n_1 + 0,1n_2) \times d$$

Avec :

- C** : Nombre de colonies sur boîtes de chaque dilution retenue.
- V** : Volume de la suspension bactérienne déposée sur boîte (ml).
- n₁** : Nombre de boîtes correspondant à la plus faible dilution.
- n₂** : Nombre de boîtes correspondant à la plus forte dilution.
- d** : Correspond à la plus faible dilution.

II.2.2. Test d'antagonisme

Le pouvoir antagoniste des souches *L. plantarum* mixtes S10 et BCX1 a été testé pour leur compatibilité par la méthode des stries croisées afin de déterminer si les deux souches sont capables de croître sans effets inhibiteurs (symbiose). À l'aide d'un écouvillon stérile, la première culture jeune a été striée verticalement et laissée sécher puis la deuxième souche a été striée horizontalement sur gélose MRS (le test est répété, inversant les positions des souches). Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 48 h à 28°C et l'apparition d'une zone d'inhibition autour des points de croisement est considérée comme une activité antagoniste positive (**Hadi et al., 2021**).

II.2.3. Encapsulation des souches

La méthode décrite par **Yuan et al. (2022)** avec quelques modifications a été utilisée ; 1g de l'alginate de sodium a été solubilisé dans 45 ml de l'eau distillée préalablement autoclavée à concentration finale de 2%, puis agité à 1200 rpm et à 23°C jusqu'à dissolution complète de l'alginate de sodium. Ensuite 5 ml de la suspension bactérienne a été doucement ajoutée et homogénéisée avec un barreau magnétique à la solution d'alginate. Les billes d'alginate de sodium à *L. plantarum* ont été formées par addition goutte à goutte à l'aide d'une seringue à une solution de chlorure de calcium CaCl₂ (0.05M) stérile avec une agitation douce et constante. Toutes ces opérations ont été réalisées aseptiquement. Les billes obtenues ont été laissées dans la solution de CaCl₂ durant 30 min afin de compléter la réaction de gélification. Les billes ont été filtrées sur une membrane puis rincées avec l'eau distillée stérile et conservées dans l'eau physiologique à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Pour confirmer la réussite du procédé de micro encapsulation, et que chaque bille contient un nombre de cellules, nous avons réalisé une coupe fine d'une capsule prélevée au hasard et coloré par le violet de gentiane.

Pour une estimation du nombre de cellules par capsule, nous avons prélevé une capsule au hasard. Après la lyse dans le tampon phosphate, et à partir de cette solution, des micro-dilutions ont été effectuées. Le nombre de cellule a été estimé par usage de la cellule de Mallassez.

Pour déterminer le nombre de cellules viables du *L. plantarum* micro encapsulé, 1 g de capsule a été remis en suspension dans 10 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4), puis agité doucement pendant 30 min à température ambiante. La viabilité des cellules a été déterminée par étalement sur gélose MRS en plaçant les dilutions en série 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} incubée pendant 48 h à 37°C.

II.2.4. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques des souches mixtes *in vitro*

Cette partie consiste à évaluer la pharmacocinétique de *L. plantarum* mixte « S10 et BCX1 » dans des conditions similaires à celles du transit digestif et d'étudier quelques propriétés probiotiques.

II.2.4.1. Résistance aux pH gastrique

La capacité de souche à survivre dans un milieu acide, a été étudiée en se référant au protocole modifié décrit par **Riane et al. (2019)**. En bref, 0.5ml d'une culture jeune (18h) de mixte *L. plantarum* (S10 et BCX1) libre et 10 mg de la culture encapsulé a été introduit dans 5 ml de bouillon MRS déjà ajusté à pH2, pH3 et pH4. La résistance a été estimée par la lecture de la densité optique à 620 nm après 2 h d'incubation à 37°C. Le pourcentage de survie a été calculé par la comparaison des valeurs de la DO de culture dans le bouillon MRS aux différents pH :

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

Avec : pH acide*: pH2, pH3 et pH4.

II.2.4.2. Résistance aux sels biliaires

La méthode utilisée pour réaliser ce test est celle décrite par **Riane et al. (2019)**. Avant de réaliser ce test, une étape de récupération de culot bactérien a été effectuée par une centrifugation à 5000 rpm/10min de la culture jeune pour la culture mixte libre, suivie de deux lavages par le PBS. Le culot bactérien final est suspendu dans un volume du même tampon (PBS), ensuite un 1 ml de la culture bactérienne (*L. plantarum* mixte libre) et 10mg

de culture mixte encapsulé a été inoculé dans 6ml du bouillon MRS à 0.3 % de sels biliaires, suivi d'une incubation à 37°C pendant 4h. Un témoin a été préparé dans les mêmes conditions.

Le taux de survie a été déterminé par la mesure de la DO à 620 nm, en comparant les valeurs de la DO de la culture sur bouillons MRS avec et sans sels biliaires. L'équation suivante a été appliquée :

$$\% \text{ survie} = (\text{DO}_{\text{sels biliaires}} / \text{DO}_{\text{témoin}}) \times 100$$

II.2.4.3. Hydrophobicité des surfaces cellulaires

L'hydrophobie a été déterminée selon la méthode décrite par **Bouridane et al. (2016)**. La culture jeune (*L. plantarum* mixte libre) a été récoltée par centrifugation à 12 000 rpm pendant 15 min, lavée deux fois et remise en suspension dans 1.2 ml de tampon phosphate magnésium (pH 7.0). L'absorbance initiale (DO initiale) de la suspension cellulaire a été ajustée à environ 0.7 à 450 nm. Chaque 3 ml de suspension bactérienne, a reçu soit 0.6 ml du xylène, 0.6 ml de chloroforme, 0.6 ml de toluène ou 0.6 ml d'éthyle d'acétate. Les suspensions ont été incubées à 37°C pendant 10 min, puis agitées au vortex pendant 2 min. La couche des hydrocarbures a été laissée remonter complètement, puis après 15 min, la phase aqueuse a été soigneusement éliminée à l'aide d'une pipette Pasteur et l'absorbance finale (DO finale) a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm.

La diminution de l'absorbance a été considérée comme une mesure de l'hydrophobie de la surface cellulaire (% H) calculée avec l'équation suivante :

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

II.2.4.4. Auto-agrégation

La capacité d'auto-agrégation des souches a été réalisée en suivant la procédure décrite par **Sakoui et al. (2022)** avec des modifications mineures. Les cultures de nuit (*L. plantarum* mixte libre) ont été centrifugées à 12.000 rpm pendant 15 min. Le culot cellulaire a été lavé deux fois par du PBS (pH 7.4) et remis en suspension dans le même tampon. La suspension cellulaire a été agitée au vortex, ensuite l'absorbance a été mesurée (A_0) puis incubée à 37°C pendant 4 h. L'absorbance a été déterminée à une longueur d'onde de 620nm.

Le pourcentage d'auto-agrégation a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Auto-agrégation (\%)} = (\text{Abs}_0 - \text{Abs}_t / \text{Abs}_0) \times 100$$

Avec : A_t : DO à t heure d'incubation, A_0 : DO à t_0 .

II.2.4.5. Co-agrégation

Le test de co-agrégation a été réalisé avec la méthode décrite par **Dias et al. (2013)** contre *Escherichia coli* ATCC 3569, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC2753(C) et *Staphylococcus aureus* ATCC29522 (A). *L. plantarum* (mixte S10 et BCX1) libre a été cultivé dans un bouillon MRS, tandis que les souches pathogènes ont été cultivées sur le bouillon nutritif. Les cultures de nuit des souches testées ont été récoltées par centrifugation à 5000rpm/15min, lavées deux fois avec du PBS et leurs absorbances à 620 nm ont été ajusté à 0.7. Dans un tube à essai, une suspension d'agent pathogène (0.5 ml) et une suspension comparable (0.5 ml) d'isolats de test ont été combinées et vigoureusement mélangées par vortex. Après 4 h d'incubation à 37°C, l'absorbance de l'échantillon (A_{mix}) a été mesurée à 620 nm.

Le pourcentage de co-agrégation a été déterminé comme suit :

$$\text{Co-agrégation \%} = [(A_{\text{mixte (S10+BCX1)}} + A_{\text{pathogène}}) - A_{\text{mix}}] / [(A_{\text{Lactobacillus}} + A_{\text{pathogène}})] \times 100$$

II.2.4.6. Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales

La capacité des souches libres mixtes d'adhérer aux cellules épithéliales a été évaluée selon la méthode décrite par **Lin et al. (2007)** avec des modifications mineures. Cette technique a été appliquée selon les étapes suivantes :

- ✓ **Préparation de cellules épithéliales** : Un segment de l'iléon 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. Ensuite les cellules sont 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** : Les cellules de la culture bactérienne de 18h ; ont été récupérées par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 min. Le culot bactérien a subi un lavage par du PBS puis récupéré et dilué dans 2ml du même tampon.
- ✓ **Réalisation de test** : 1ml de la dilution 10^{-4} des cellules épithéliales est mélangé avec 1ml de la culture bactérienne, l'incubation est faite à 37°C pendant 45 min. Après incubation, un frottis est préparé et coloré en coloration simple au cristal violet 0.1% pendant 5min, ce dernier permet la différenciation des cellules bactériennes des tissus. L'adhésion est évaluée par examen au microscope optique à caméra (Gx100). Le test est considéré positif si le nombre de cellules adhérees est supérieur à 15.

II.2.5. Détermination de l'activité antioxydante des souches mixtes *in vitro*

L'activité antioxydante des isolats probiotiques a été évaluée à l'aide de trois méthodes différentes, le test catalase (peroxyde d'hydrogène : H₂O₂), le piégeage des radicaux DPPH et l'estimation de pouvoir réducteur.

II.2.5.1. Résistance à la toxicité du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ Scavenging Activity)

Pour étudier la résistance des souches *L. plantarum* mixtes (S10 et BCX1) à la toxicité du peroxyde d'hydrogène, nous avons opté pour la technique décrite par **Mu et al. (2018)** avec des modifications mineures. Une culture d'une nuit a étéensemencée à raison 1% (V/V) dans le bouillon MRS. Ce dernier contenant trois concentrations du peroxyde d'hydrogène (0.4 ; 0.7 et 1 mM). Un témoin a été préparé dans les mêmes conditions. Le tout a été incubé à 37°C pendant 6h. La croissance cellulaire a été mesurée à une longueur d'onde de 620nm.

Le taux de survie (%) des souches de lactobacilles endommagées par l'H₂O₂ a été calculé comme suit :

$$\text{Taux de survie (\%)} = (A_e / A_t) \times 100$$

Avec :

A_e : L'absorbance de l'échantillon ;

A_t : L'absorbance du témoin.

II.2.5.2. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Préparation de la suspension bactérienne et son surnageant : Les cellules bactériennes (culture de 18 h) ont été récupérées par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 min, suivi d'un lavage puis reprise en suspension dans le Tampon Phosphate Salin (PBS). Le nombre de

bactéries dans le culot cellulaire a été ajusté à une absorbance de 0.8 (environ 10^8 UFC/ml). Alors que le surnageant a été obtenu par centrifugation de la culture à 5000 rpm pendant 10 min (Das et Goyal, 2015).

Réalisation du test : Le test a été réalisé selon la méthode décrite par Wang *et al.* (2021) avec des modifications mineures. Pour chaque 500 μ l de chaque préparation bactérienne (ou surnageant), nous avons rajouté 3 ml d'une solution fraîchement préparée de 2,2-diphényl-2-picrylhydrazate de hydrazyl (DPPH) (0.05 mM). Le mélange a été incubé en obscurité pendant 30 min et l'absorbance a été mesurée à 517nm. Le contrôle comprenait le PBS et la solution de DPPH-méthanol. Le groupe témoin (le blanc) contenait les cellules et l'éthanol.

Le pourcentage d'activité de piégeage des radicaux est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{(Scavenging activity (\%))} = [1 - (A_{\text{échantillon}} - A_{\text{blanc}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

II.2.5.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles

La suspension bactérienne et son surnageant ont été préparés selon la méthode déjà décrite en (II.2.5.2.). 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 FeSO₄ (0.75 mM), 1ml d'H₂O₂ (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 :

- As : Absorbance d'échantillon ;
- A0 : Absorbance du témoin ;
- A : Absorbance du blanc.

II.2.6. Préparation du jus mixte, ensemencement, contrôle et activités biologiques

II.2.6.1. Préparation du jus de concombre, de l'infusion de moringa, de la mixture et ajout de probiotique

Pour la préparation de jus de concombre, nous avons adopté la méthode décrite par **Breidt et Caldwell (2011)**. Un poids de 2 kg de concombre a été soigneusement lavé puis coupés et broyés par le mixeur. Un volume d'eau stérile (1 Litre) a été ajouté au jus avant de le congelé pendant toute une nuit. La réalisation d'une centrifugation nous a permis de clarifier le jus filtré qui est mis dans des flacons stériles.

Pour la préparation de l'infusion de moringa, nous avons adapté la technique décrite par **Yeoh et al. (2021)** : La poudre de moringa (60g) a été homogénéisée dans 600ml d'eau stérile à l'aide d'un homogénéisateur. Après incubation d'une nuit dans un bain Marie à 70°C, une centrifugation pendant 15min à 2000 rpm a été effectuée. Le surnageant clair a été récupéré et dilué 2 fois avec de l'eau distillée.

Pour la préparation de jus mixtes « concombre et moringa », nous avons mélangé 3 parts de jus de concombre et 1 part de l'infusion moringa déjà préparés. Des aliquotes de 100 ml de mélange obtenu ont été mis dans des bouteilles en verre stérilisées et pasteurisés à 90° C/ 20 min. Après la pasteurisation, le produit a été refroidi et stocké à 8°C (**de Oliveira et al., 2021**).

Pour l'ajout de probiotiques dans le jus mixte, les cultures probiotiques de *L. plantarum* (S10 et BCX1) ont été utilisées. La préparation des cultures probiotiques et leur ajout au jus mixte a été réalisée comme décrit par **Breidt et Caldwell (2011)**, où, chaque flacon de jus a été ensemencé à raison de 5% soit par la culture mixte, libre ou encapsulée. Ensuite, les jus ont été remués manuellement et incubés à 37° C pendant 24 h. Les produits obtenus ont été stockés à 8°C.

II.2.6.2. Contrôle de quelques paramètres physico-chimique des échantillons

II.2.6.2.1. pH

Le pH des échantillons (jus de concombre, moringa, le mixte) a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre (HANNA) préalablement étalonné. L'électrode du pH mètre est plongé dans 20 ml de chaque échantillon et la valeur affichée sur l'écran a été notée (**Kumari et al., 2022**).

II.2.6.2.2. Degré Brix

Il est déterminé à l'aide d'un réfractomètre selon le protocole de **Bhukya et al. (2021)**. Une goutte de chaque échantillon a été mise sur la plaque du réfractomètre préalablement nettoyée avec l'eau distillée et séchée. Le degré Brix a été lu directement sur l'échelle à l'intersection de la limite entre la frange claire et la frange foncée. Les mesures ont été effectuées en triplicata à température ambiante.

II.2.6.2.3. Teneur en matière sèche (MS)

10g de chaque échantillon (concombre, moringa et le mixte) ont été pesés dans des creusets de porcelaine préalablement tarés, ces derniers ont été placés dans l'étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante.

L'équation suivante a été appliquée (**Lecoq, 1965**) :

$$MS (\%) = [X / Y] \times 100$$

Avec :

MS : matière sèche ;

X : poids de l'échantillon en gramme après étuvage ;

Y : poids de l'échantillon en gramme avant étuvage.

II.2.6.2.4. Teneur en matière minérale (MM)

10g de chaque échantillon ont été pesés dans des creusets préalablement tarés. Ces derniers ont été placés dans le four à moufle à 550°C jusqu'à l'obtention d'une couleur grise à blanche. La teneur en matière minérale a été déterminée par l'équation suivante (**AOAC, 2000**) :

$$MM (\%) = [X / Y] \times 100$$

Avec :

MM : matière minérale ;

X : poids de l'échantillon en gramme après étuvage ;

Y : poids de l'échantillon en gramme avant étuvage.

II.2.6.2.5. Taux de sucres totaux

1 ml de chaque échantillon a été mis chacun dans un tube à essai avec 50 µL de phénol à 75 %. Ensuite, 2.5 ml d'acide sulfurique ont été ajoutés rapidement à chaque tube à essai et les mélanges ont été agités immédiatement par le vortex. La réaction étant exothermique donc une importante chaleur se forme au sein de chaque tube, il est donc nécessaire de refroidir le

mélange avant l'incubation à 30 °C pendant 10min. L'absorbance a été mesurée à 485 nm (Tajini et al., 2020).

Les teneurs en sucres totaux sont déterminées en référence à une gamme de concentration de glucose selon la formule suivante :

$$ST = [(X.V. D/P)] \times 100$$

Avec :

- ST : Taux de sucres totaux (%) ;
- X : Quantité de sucres calculée à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml) ;
- D : Facteur de dilution ;
- V : Volume de la solution analysée (ml) ;
- P : poids de la prise d'essai(g).

II.2.6.2.6. Teneur en polyphénols

La méthode décrite par Jablonska-Rys (2016) a été utilisée pour l'estimation de la teneur en polyphénols totaux. Brièvement, 200 µl de chaque échantillon a été introduit dans des tubes à hémolyse en verre et complété par 1 ml de réactif de Folin Ciocalteu (dilué 10 fois). Après 5 min de repos, chaque tube reçoit 800 µl de carbonate de sodium à 7.5 %. Les tubes sont agités et incubés à l'obscurité et à température ambiante pendant 1 h. L'absorbance est lue à 765 nm. Un blanc a été préparé de la même manière en remplaçant les échantillons (jus de concombre, infusion, mixte) par le solvant d'extraction (méthanol) et la teneur en composés phénoliques de chaque échantillon a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

II.2.6.2.7. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été déterminée en suivant le protocole décrit par Benhamada et Idoui (2020). 1ml de chlorure d'aluminium (2%) a été additionné à 1ml de chaque échantillon déjà mis dans des tubes à essais. Les tubes ont été incubés à température ambiante à l'obscurité pendant 10min, et la densité optique a été mesurée à 430nm.

La teneur en flavonoïdes a été déterminée graphiquement par la courbe d'étalonnage de la quercétine.

II.2.6.3. Activité antioxydante des échantillons

II.2.6.3.1. Piégeage du radical libre DPPH

La capacité de captation des radicaux libres le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) a été déterminée en utilisant la méthode décrite par Yan et al. (2020). En bref, 1 ml de chaque échantillon (jus de concombre, moringa, le mixte), a été mélangé avec 1 ml de solution

éthanolique de radicaux DPPH (0.2 mM) ou d'éthanol (groupe témoin). La solution réactionnelle a été mélangée et incubée à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 min. Le DPPH piégé a été déterminé en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm. Le pourcentage d'activité de piégeage a été évalué par comparaison avec un témoin contenant uniquement le DPPH et l'éthanol et un contrôle qui a été réalisé en remplaçant le jus par le trolox comme un antioxydant de référence.

La capacité de piégeage a été calculée comme suit :

$$(\text{Scavenging activity (\%)} = [1 - (\text{A échantillon} - \text{A Blanc}) / \text{A control}] \times 100$$

II.2.6.3.2. Réduction du fer (FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power)

Le pouvoir antioxydant réducteur ferrique a été évalué selon le protocole décrit par **Bentabet et al. (2014)**. 1ml de jus a été mélangé avec 2.5ml d'une solution tampon phosphate 0.2mol/L (pH 6.6) et 2.5ml de Ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1% ont été additionnées. Après incubation à 50°C pendant 30min au bain Marie ; 2.5ml de l'acide trichloracétique ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) à 10% ont été additionnés pour stopper la réaction. Le tout a été centrifugé à 3000 rpm/10 min. Par la suite, 2.5ml du surnageant a été combiné avec 2.5ml de l'eau distillée et 0.5ml de chlorure ferrique ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 0.1%. L'absorbance a été mesurée à 700nm contre un blanc contenant les mêmes réactifs en remplaçant le jus par le méthanol.

L'expression des résultats est définie en suivant une courbe d'étalonnage préparée avec l'acide ascorbique.

II.2.6.4. Evaluation de quelques paramètres de fermentation

Lors de la fermentation, nous avons procédé à l'évaluation des paramètres suivants :

Mesure du pH : Le pH des échantillons a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre (HANNA) (**Kumari et al., 2022**).

Acidité titrable totale : La procédure de titrage a été réalisée avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) (0.1N), en utilisant la phénolphthaléine comme indicateur pour déterminer la présence et la concentration d'acides organiques (acide citrique) (**de Oliveira et al., 2020**).

L'équation suivante a été appliquée :

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

Comptage des cellules viables : La méthode de numération sur milieu solide (gélose MRS) a été appliquée lors de la fermentation de jus mixte. Pour se faire, des dilutions décimales (jusqu'à 10^{-8}) 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^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8}) a été fait. 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 :

$$\text{Nombre UFC/ml} = \Sigma C / V (n_1 + 0,1n_2) d$$

II.2.6.4.1. Mesure des activités antioxydantes de jus lactofermenté

Après 24 h de fermentation, l'activité antioxydante des cellules *L. plantarum* mixtes libres et encapsulées a été évaluée. Les mêmes tests déjà décrits en (II.2.6.3.) Ont été appliqués.

II.2.6.5. Activité Anti-inflammatoire

Le test de l'étude de l'activité anti-inflammatoire a été réalisé selon la méthode d'**Aidoo et al. (2021)**.

Le sang recueilli a été mélangé à un volume égal de solution d'Alsever stérilisée (2 % de glucose, 0.8 % de citrate de sodium, 0.5 % d'acide citrique et 0.42 % de chlorure de sodium dans de l'eau distillée). Le sang a été centrifugé à 3000 rpm /10 min et les cellules récupérées ont été lavées trois fois avec l'eau physiologique. Le volume du sang récupéré a été ensuite reconstitué sous forme de suspension à 10 % (v/v) avec l'eau physiologique.

Le mélange réactionnel contenant 1 ml de la solution déjà préparé et 1 ml de chaque échantillon (jus de concombre, moringa, le mixte (concombre-moringa) et le mixte lactofermenté par la souche mixte libre a été mis en incubation à 56°C pendant 30 min. Par la suite, les tubes ont été centrifugés à 2500 rpm pendant 10 min. Le surnageant a été recueilli et l'absorbance de chaque solution a été mesurée à 560 nm (longueur comme indicateur du degré d'hémolyse). Le contrôle a été préparé dans les mêmes conditions avec l'eau physiologique.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de l'hémolyse} = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

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 solution préparée a été autoclavée à 120°C pendant 15 min.

Tableau 4. Composition des solutions simulées de la digestion (Minekus *et al.*, 2014).

	Solution mère ajoutée pour préparer	Solution mère ajoutée pour préparer	Solution mère ajoutée pour préparer
	500ml (LS)	500ml (LG)	500ml (LI)
KCl (0.5M)	15.1ml	6.9ml	6.8ml
KH ₂ PO ₄ (0.5M)	3.7ml	0.9ml	0.8ml
NaHCO ₃ (1M)	6.8ml	12.5ml	42.5ml
NaCl (2M)	/	11.8ml	9.6ml
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ (0.15M)	0.5ml	0.4ml	1.1ml
NH ₄ (CO ₃) ₂ (0.5M)	0.06ml	0.5ml	/
HCl (6M)	0.09ml	1.3ml	1.4ml

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

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

La mise en œuvre de ce protocole implique l'utilisation de la méthode recommandée par Ydjedd *et al.* (2017) dont l'objectif de cette partie est de tester ce qui est mentionné ci-dessous (Figure 7) :

- ✓ Survie et viabilité des souches *L. plantarum* (mixte S10 et BCX1) libres et encapsulées ;
- ✓ Effet de jus mixte comme véhicule probiotique sur la survie et la viabilité des souches mixtes (S10 et BCX1) libres et encapsulées lors de passage gastro-intestinale ;
- ✓ Effet de la combinaison de jus mixte avec la bactérie sur les aptitudes de survie ;

- ✓ Effet de la combinaison de jus mixte avec la bactérie sur l'activité antioxydante et anti-inflammatoire ;
- ✓ Bio-accessibilité des composés phénoliques de jus mixte dans les mêmes conditions de digestion.

Sur ce, trois étapes essentielles du processus de digestion orale-gastro-intestinale *in vitro* ont été réalisées :

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

Digestion gastrique : Cette étape consiste à mélanger 35 ml de la phase orale avec 35 ml de liquide gastrique (pepsine (2000U/ml)) dont le pH a été ramené à 3 avec HCl (6M). Le mélange a été incubé sous agitation à 37°C pendant 2 heures. Une fois la digestion gastrique terminée, 25 ml ont été prélevés pour les différents tests énumérés 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, le mélange résultant a été incubé pendant 2 heures supplémentaires. Après le temps de digestion, la phase intestinale a été récupérée afin d'examiner la viabilité et la survie des cellules ainsi que d'évaluer l'activité antioxydante (piégeage des radicaux hydroxyles, piégeage des radicaux libre de DPPH).

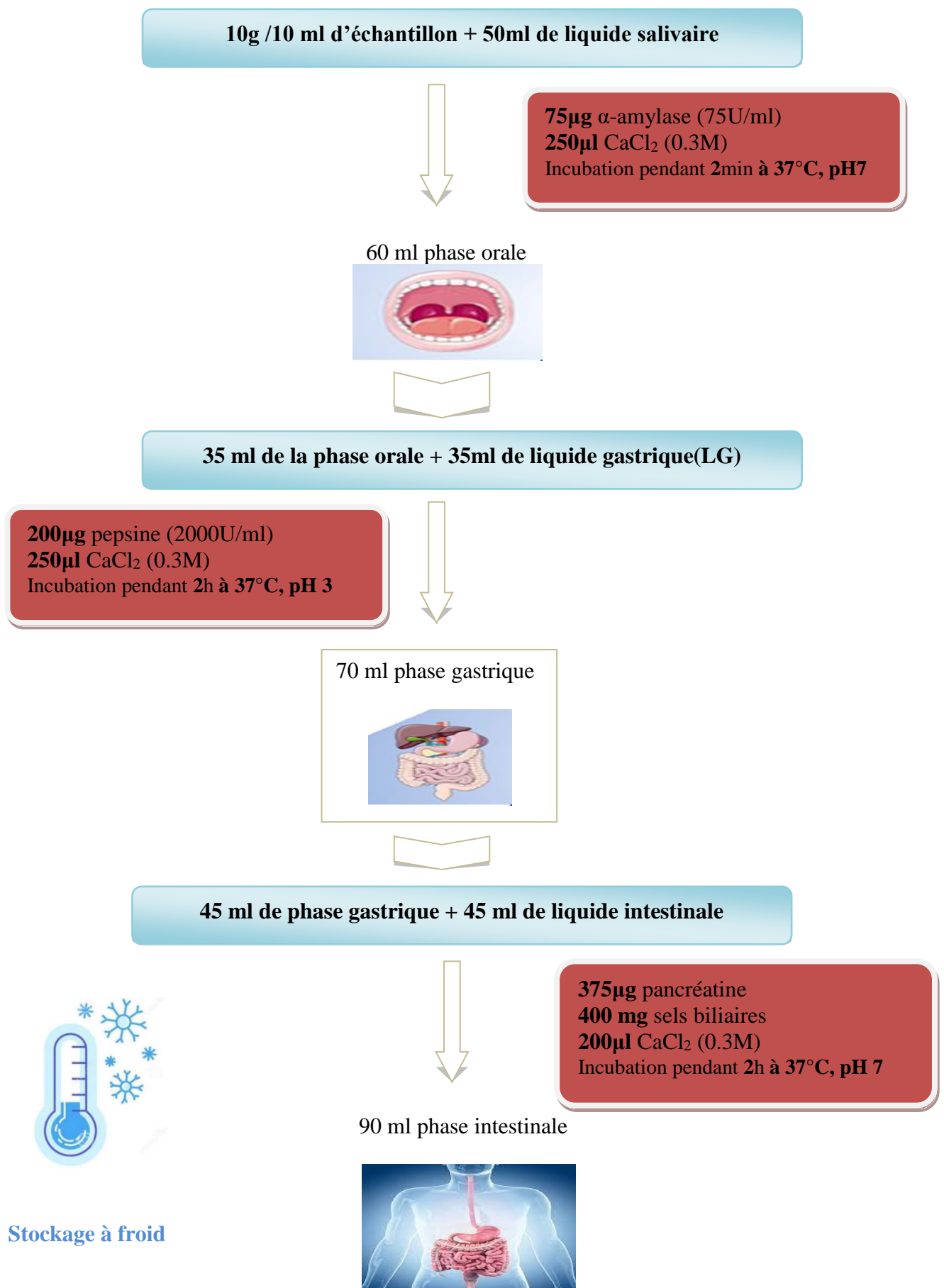


Figure 6. Schéma de la digestion bucco-gastro-intestinale *in vitro* (Ydjedd et al., 2017).

II.2.7.3. Effet de la digestion sur la survie, l'activité antioxydante et les aptitudes probiotiques *in vitro*

Pour la survie et la viabilité des cellules : La survie a été déterminée en comparant le nombre de bactéries viables après chaque phase de digestion au nombre initial. La démonstration des résultats du comptage des cellules viables a été réalisée par deux expériences :

- ✓ La mesure de la DO à 620 nm : des lectures spectrométriques ont été effectuées à 620 nm pour chaque échantillon de chaque étape de digestion.
- ✓ Le dénombrement sur gélose : l'échantillon prélevé de chaque étage (buccale, stomacale ou intestinal) a été bien homogénéisé et des dilutions en cascades ont été préparées (1ml d'échantillon dans 9 ml de l'eau physiologique stérile) jusqu'à 10^{-8} . Un volume de 100 μ l des différentes dilutions de chaque étage a été ensemencé par étalement sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose MRS. Le comptage cellulaire a été effectué après 48 heures d'incubation à 37°C.

Pour l'évaluation des aptitudes probiotiques : Après chaque phase de digestion (buccale, gastrique, intestinale), les tests probiotiques déjà décrits précédemment ont été appliqués (**Partie II.2.4**).

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante : L'évaluation de cette activité après la phase orale, gastrique et intestinale a été faite par l'application des mêmes tests mentionnés (**Partie II.2.5**).

II.2.8. Effet de la digestion sur la biodisponibilité des polyphénols et des flavonoïdes *in vitro*

Ce test a été réalisé sur le jus mixte par le dosage des polyphénols et des flavonoïdes après chaque phase de digestion. Les mêmes méthodes décrites en (**II.2.6.2.6; II.2.6.2.7**) ont été appliquées.

II.2.9. Effet de la digestion sur la survie, l'activité antioxydante et aptitudes probiotiques en présence de jus *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.2.4; II.2.5.1 ; II.2.6.3**).

Dans le même objectif, un dosage des polyphénols et des flavonoïdes après chaque phase de digestion a été effectué avec usage des mêmes protocoles utilisés précédemment (**II.2.6.2.6; II.2.6.2.7**).

II.2.10. Traitement statistique

L'analyse statistique des résultats de différents paramètres est faite pour des expériences réalisées au moins deux fois. 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).

($P < 0.05$) : effet significatif *.

($P < 0.01$) : effet très significatif **.

($P < 0.001$) : effet hautement significatif ***.

Résultats et Discussion

III.1. Pureté des souches, standardisation de l'inoculum et test d'antagonisme

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. En ce qui concerne l'observation microscopique, les cellules étaient à Gram⁺, de forme bâtonnet disposées en paires (**Figure 8**).



Figure 7. Aspect macroscopique de *L. plantarum*.

Les résultats de la standardisation de l'inoculum ont montré qu'un ml de la culture mixte de *L. plantarum* (S10, BCX1) obtenu après 24h d'incubation à 37°C, donne une moyenne de 3.2×10^8 UFC.

Les résultats du test d'antagonisme entre les deux souches illustrées par la **Figure 9**, ont révélé l'absence de zones d'inhibition au niveau des intersections entre les deux souches, ce qui confirme une synergie entre BCX1 et S10.

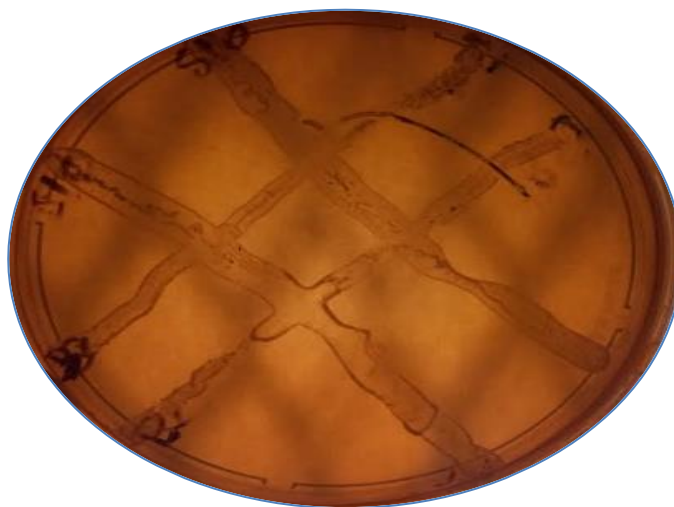


Figure 8. Test d'antagonisme sur gélose MRS.

III.2. Encapsulation des *L. plantarum* mixtes

La culture mixte de *L. plantarum* (S10 et BCX1) a été encapsulée dans l'alginate de sodium dont la forme des billes est de type sphérique ou ovale. La **Figure 10**, illustre une masse des billes obtenues. Après libération des cellules emprisonnées, nous avons obtenu une concentration finale estimée à 2.42×10^8 cellules/bille. Le poids d'une bille est en moyenne de 6.03 mg, le diamètre est en moyenne de 0.2 mm.



Figure 9. Photographie des billes d'alginate de sodium à 2%.

III.3. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques de la culture mixte *in vitro*

III.3.1. Résistance au pH gastrique

La résistance à l'acidité de l'estomac constitue l'un des principaux critères de sélection des souches probiotiques. Le pH de l'estomac humain varie de pH 1 à pH4.5, la digestion des aliments peut prendre jusqu'à 3h. Un test de tolérance à un faible pH est essentiel pour prédire la survie des souches probiotiques dans l'environnement de l'estomac (**Kusharyati et al., 2020**).

Les résultats de la résistance de *L. plantarum* mixte à l'acidité simulée à celle de l'estomac sur des milieux aux 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, les isolats de *L. plantarum* ont montré une survie négligeable à pH 2, mais à pH 3 et 4, une augmentation du taux de survie a été observée, et la tolérance à l'acidité était variable entre la souche libre et la souche encapsulée.

La culture mixte de *L. plantarum* libre a montré un taux de survie de 78.28 ± 0.04 % et 64.28 ± 0.14 % à pH 4 et 3 respectivement, en revanche la culture encapsulée a présenté aux mêmes valeurs de pH, le meilleur taux de survie avec 92.22 ± 0.05 % et 79.44 ± 0.03 % respectivement.

Par ailleurs, une diminution du taux de survie en fonction de l'abaissement de pH jusqu'à atteindre un minimum respectif de 53.36 ± 0.04 % et 41.71 ± 0.03 % de viabilité à pH 2 pour la culture encapsulée et libre a été enregistré. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux d'**Anandharaj et al. (2015)**, qui ont obtenu un taux de survie allant de 34.41 à 45.22 % à pH 2. En ce qui concerne la survie sur le milieu à pH 4, **Divyashree et al. (2021)** ont obtenu un taux de survie de 75 à 81 % avec différentes souches de genre *Lactiplantibacillus*. Les résultats ont démontré que l'encapsulation protège les probiotiques dans des conditions gastriques simulées.

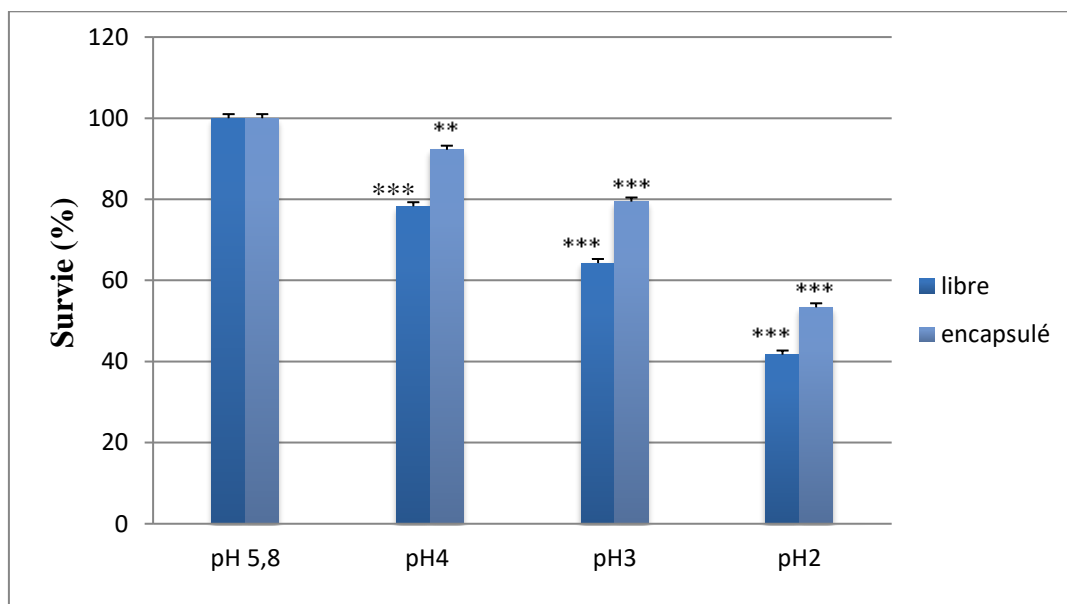


Figure 10. Taux de survie de la culture mixte sur des milieux aux différents pH.

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

** : Différences très significatives ($p < 0.01$).

III.3.2. Résistance aux sels biliaries

La tolérance aux sels biliaries est un facteur essentiel car elle détermine la survie des probiotiques au niveau du duodénum. Les sels biliaries présents dans le tractus intestinal perturbent la membrane cellulaire des bactéries, cependant, les probiotiques ont la capacité de tolérer 0.05 à 0.3 % de bile (**Hassan et al., 2020**).

Au reflet de la **Figure 12**, nous remarquons que les souches mise au test ont un taux de survie de $74.68 \pm 0.12\%$ et $86.66 \pm 0.14\%$ ($p < 0.001$) pour la culture libre et encapsulée respectivement, ce qui indique, une très bonne résistance aux sels biliaries après un temps d'exposition de 4h dans un milieu simulant les conditions du duodénum à une concentration de 0.3% de sels biliaries. Nos résultats sont identiques à ceux de **Wang et al. (2020)**, qui ont obtenu un pourcentage de tolérance variable entre 74.84 à 89.34% en présence de 0.3% de sels biliaries avec *L. plantarum*. La viabilité des probiotiques libres était significativement plus faible que celle des probiotiques micro-encapsulés, car la matrice d'alginate pouvait protéger les probiotiques de l'agressivité des sels biliaries dans une certaine mesure (**Wang et al., 2022**).

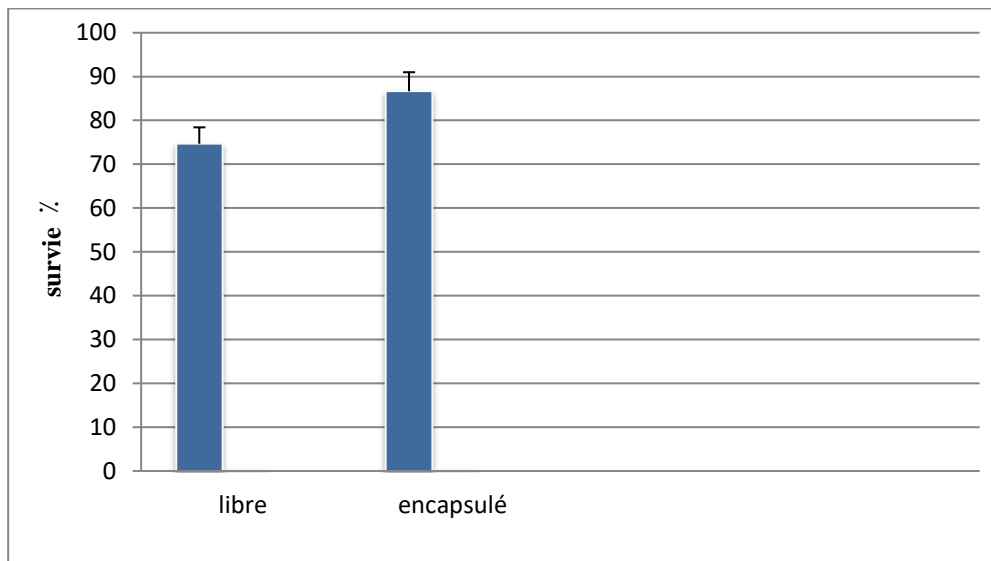


Figure 11. Survie de la mixture de *L. plantarum* en présence de 0.3% de sels biliaries.

III.3.3. Hydrophobicité des surfaces cellulaires

L'hydrophobie des souches a été testée par leur capacité à adhérer aux différents solvants : xylène, toluène, chloroforme et éthyle acétate. Dans l'étude actuelle, le pourcentage d'hydrophobie dépendait des solvants testés. La mixture des souches a montré un pourcentage d'hydrophobie significatif ($p < 0.001$) au xylène, suivi par le toluène et l'éthyle acétate alors qu'une hydrophobicité modérée a été obtenue avec le chloroforme (**Figure 13**). L'hydrophobie des souches aux solvants (xylène, toluène, éthyle acétate, chloroforme) était respectivement de $88.34 \pm 0.05\%$, $77.55 \pm 0.08\%$, $64.17 \pm 0.03\%$ et $52 \pm 0.07\%$.

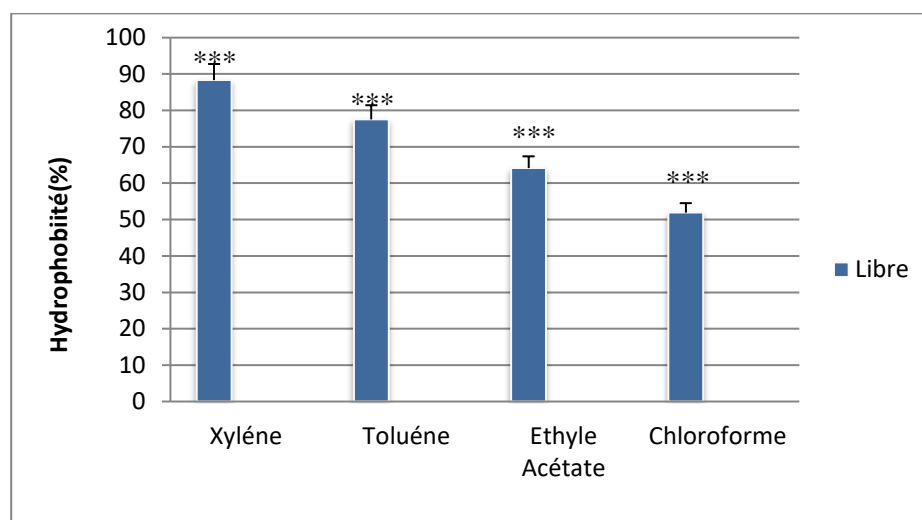


Figure 12. Pourcentage d'hydrophobicité des souches de *L. plantarum*.

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

Les résultats de l'étude menée par **Sakoui et al. (2022)** sont proches des nôtres, ces auteurs ont trouvé également que l'hydrophobie des souches était de 60.92 % pour le chloroforme et de 66.14 % pour l'acétate d'éthyle. Les souches *L. plantarum* dans une autre étude ont montré un degré variable d'hydrophobie autour de 78.9% et 83.5% pour le xylène (**Darmastuti et al., 2021**). D'après plusieurs études, les niveaux d'hydrophobie variaient selon les souches, la durée du temps de culture, la composition du milieu, l'âge de la bactérie, la structure de la surface cellulaire, la présence d'acides et le type de solvant (**Panjaitan et al., 2018 ; Krausova et al., 2019**).

L'hydrophobicité est mieux définie comme la plus grande tendance d'un microorganisme à adhérer à des substrats hydrocarbonés ou non polaires (hydrophobines) qu'à l'eau (**Ren et al., 2018**). L'hydrophobicité est une propriété qui reflète l'affinité des composants de la surface cellulaire du microbe pour l'eau et elle est calculée en estimant l'affinité des surfaces cellulaires pour les substances hydrophobes comme les colonnes hydrophobes, les solvants ou les billes de polystyrène (**Vij et al., 2020**).

D'après **Ekmekci et al. (2009)**, l'hydrophobicité des lactobacilles est classée comme faible si le pourcentage d'affinité est entre 0 et 35%, modérée entre 36 et 70% et forte entre 71-100%. Sur cette base, nous pouvons dire que les surfaces de *L. plantarum* mixte sont hautement hydrophobes.

III.3.4. Capacité d'auto-agrégation

L'auto-agrégation des probiotiques empêche la colonisation de micro-organismes nuisibles et contribue également à fournir une extrusion compétitive pour l'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte (Krausova *et al.*, 2019). Le résultat de l'auto-agrégation a révélé que la culture mixte de *L. plantarum* avait une forte capacité d'auto-agrégation avec un pourcentage de 87.93 ± 0.06 % après 3 heures d'incubation. Dans une étude similaire menée sur deux souches de *L. plantarum* (MYSRD 108 et MYSRD 71), Divyashree *et al.* (2021) ont montré un fort pourcentage d'auto-agrégation de 89.2% et 88.5 % respectivement.

III.3.5. Capacité de co-agrégation

La co-agrégation est considérée comme une propriété clés des probiotiques qui peuvent prévenir la colonisation du tractus gastro-intestinal par des agents pathogènes. Ceci est dû à la formation de biofilms de bactéries auto-agrégantes sur la muqueuse intestinale et à l'adhésion intercellulaire entre les bactéries co-agrégantes et les pathogènes microbiens (Dowdell *et al.*, 2021).

Nos résultats ont montré que la culture mixte de *L. plantarum* avait une meilleure capacité de co-agrégation avec *E. coli* et *S. aureus* avec un pourcentage respectif de 54.68 ± 0.09 % et 48.92 ± 0.06 %. En revanche, un pourcentage que nous considérons comme modéré de 45.25 ± 0.10 % a été obtenu avec *P. aeruginosa*. Nos résultats sont similaires à ceux de Madjirebaye *et al.* (2022) ; ayant obtenu un pourcentage de co-agrégation de 54.92% (*L. plantarum* - *E. coli*) de 59.71% avec *Staphylococcus aureus*.

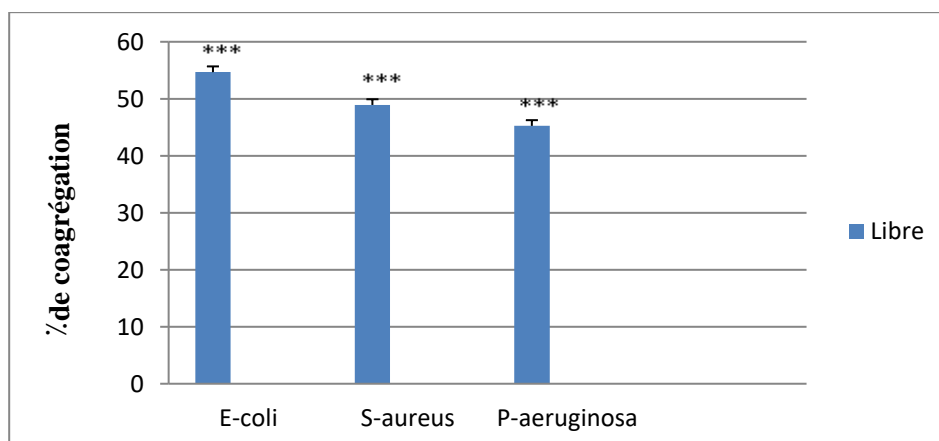


Figure 13. Pourcentage de co-agrégation de la culture mixte de *L. plantarum* avec les trois souches pathogènes.

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

III.3.6. Adhésion aux cellules intestinales et/ou mucus

La capacité d'adhésion intestinale des bactéries probiotiques est un critère important dans la sélection des souches candidates. La première étape de l'adhésion intestinale des probiotiques est la liaison physique, impliquant des interactions hydrophobes, entre la surface des bactéries probiotiques et les cellules épithéliales intestinales (Monteagudo-Mera *et al.*, 2019 ; Kwon *et al.*, 2021). L'adhésion a été réalisée en utilisant des cellules épithéliales d'origine animale (tissus de poulet) et avant de mettre les cellules bactériennes en contact avec les cellules épithéliales, un test de confirmation de l'absence de contaminants microbiens a été réalisé.

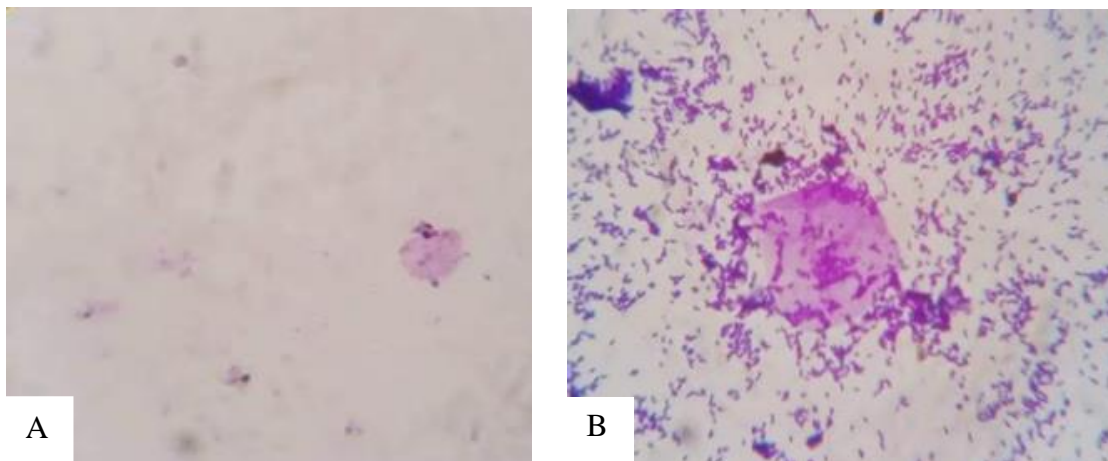


Figure 14. Photomicrographie de l'adhésion des souches de *L. plantarum* aux cellules épithéliales (Gx100).

(^A) : Cellules épithéliales saines, (^B) : Cellules épithéliales (adhésion positive).

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

Ce processus d'adhésion de *Lactiplantibacillus* s'effectue essentiellement en deux étapes, l'une est une adhésion spécifique par immobilisation directe d'adhésines (protéines, polysaccharides ou lipophosphates), et l'autre peut être une adhésion non spécifique, caractérisée par les différentes interactions physico-chimiques possibles entre *Lactiplantibacillus* et la muqueuse, en particulier les forces de Van Der Waals, les forces électrostatiques et la liaison hydrogène (Mittelviehhaus *et al.*, 2019 ; Trush *et al.*, 2020).

III.4. Activité antioxydante *in vitro* des souches probiotiques

III.4.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène

Les résultats de la résistance des bactéries lactiques étudiées au peroxyde d'hydrogène sont représentés dans la **Figure 16**, où l'analyse statistique révèle des différences hautement significatives ($p < 0.001$).

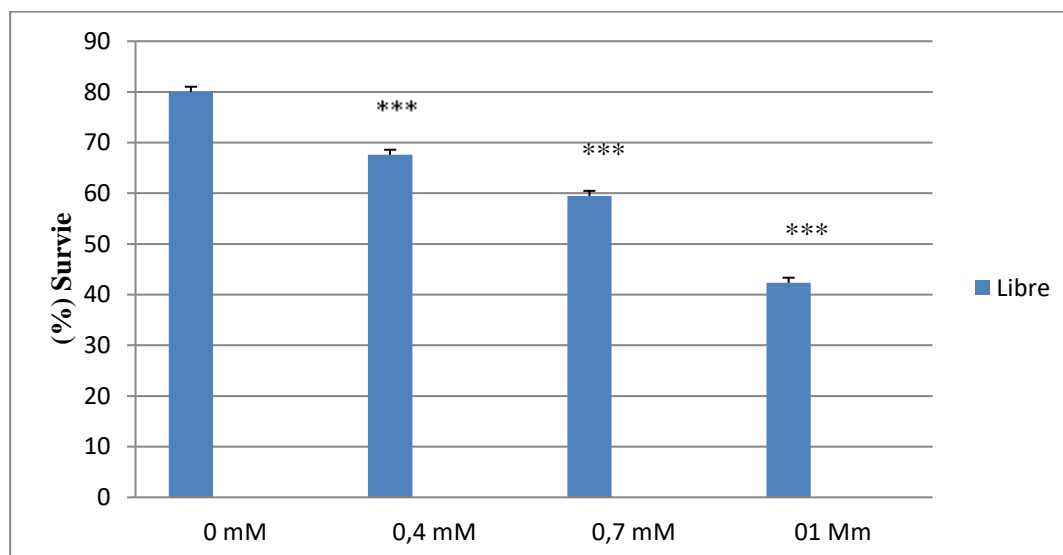


Figure 15. Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité des souches mixtes.

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

Comme nous pouvons le voir sur **la Figure 16**, la culture mixte de *L. plantarum* a une bonne capacité de résistance au peroxyde d'hydrogène. La survie variait entre $67.59 \pm 0.34\%$ et $59.48 \pm 0.40\%$ lorsque les souches étaient exposées à 0.4 et 0.7 mM H_2O_2 respectivement. Lors d'une exposition à 1.0 mM H_2O_2 , le taux de survie était de $42.34 \pm 0.06\%$. Une étude de **Mu et al. (2018)** a montré que différentes concentrations d' H_2O_2 pouvaient inhiber la croissance des souches de *Lactiplantibacillus*. En fait, la survie variait entre 30 % et 50 % pour les souches exposées à 1.0 mM H_2O_2 . On peut remarquer que la survie est affectée par la présence de ce composé, ce qui suggère que la présence de peroxyde d'hydrogène peut endommager les cellules bactériennes entraînant une croissance réduite (**Wang et al., 2006**).

III.4.2. Activité de piégeage des radicaux libres (DPPH)

Les antioxydants sont des composés qui inhibent, préviennent ou ralentissent les dommages cellulaires causés par les radicaux libres et les molécules instables présents dans les cellules humaines. Ils sont considérés comme des agents antioxydants naturels qui jouent des rôles importants dans le corps humain en contrecarrant les processus d'oxydation et en prévenant ou

en ralentissant les maladies liées au stress oxydatif (Wang *et al.*, 2017 ; Kim *et al.*, 2021).

Les résultats obtenus sont illustrés par la **Figure 17**, où le surnageant de la culture mixte de *L. plantarum* a révélé une capacité de piégeage des radicaux libre de DPPH plus élevée avec un taux d'inhibition de $85.94 \pm 0.04\%$; alors que la suspension a montré une capacité de rétention estimée à $51.64 \pm 0.05\%$. Les résultats de l'expérience menée par Tang *et al.* (2017) ont indiqué que le surnageant à un taux d'inhibition plus important (85.57 %) par rapport à celui du culot bactérien (40.42 %).

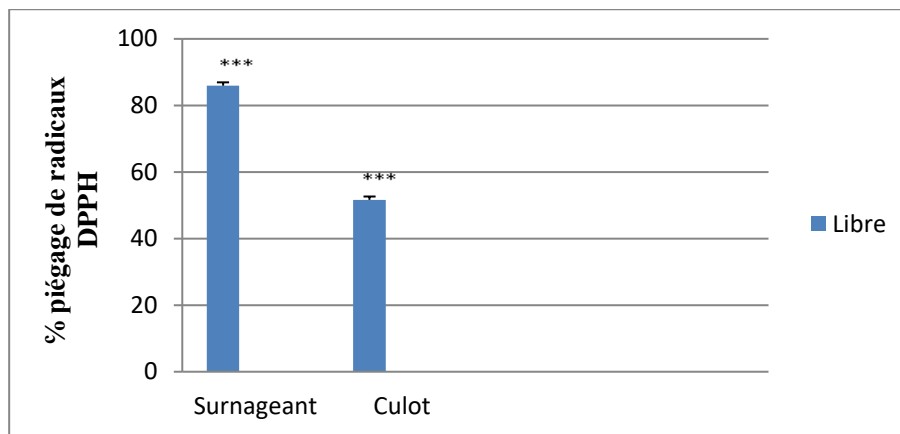


Figure 16. Capacité de la mixture de *L. plantarum* à piéger les radicaux libres de DPPH.

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

Les composés antioxydants des bactéries lactiques sont des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase), des coenzymes (NADH et le NADPH), des ions métalliques, des composés bioactifs (comme le glutathion) et des exopolysaccharides. Par conséquent, les bactéries lactiques productrices d'antioxydants ont été considérées comme des candidats potentiels pour la production d'aliments fonctionnels ou de suppléments d'antioxydants naturels (Buatong *et al.*, 2022).

III.4.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles

Les radicaux hydroxyles sont les principales espèces réactives de l'oxygène qui provoquent la peroxydation des lipides et d'autres dommages biologiques massifs aux cellules humaines (Hazra *et al.*, 2008).

Sur la **Figure 18**, les résultats de piégeage du radical hydroxyle montrent une différence remarquable entre la culture cellulaire et son surnageant. La culture mixte de souches avait

une capacité modérée de piégeage des radicaux hydroxyles, avec un taux d'inhibition de $51.23 \pm 0.04\%$, tandis que, le surnageant de la culture a montré une capacité plus faible avec un taux d'inhibition de $29.87 \pm 0.01\%$.

D'après les résultats de **Das et Goyal (2015)**, *L. plantarum* DM5 a présenté un taux de piégeage des radicaux hydroxyles de 48.7%, cette activité est inférieure à celle de notre mixture de *L. plantarum*.

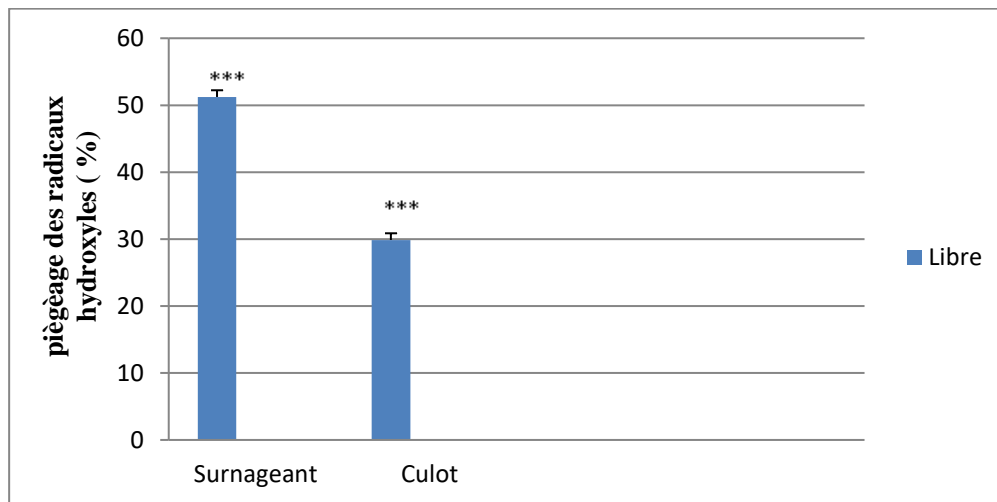


Figure 17. Pourcentage de piégeage des radicaux hydroxyles par la culture mixte *L. plantarum* et son surnageant.

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

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

III.5. Paramètres physicochimiques du jus

III.5.1. pH

Le potentiel d'hydrogène et l'acidité sont parmi les paramètres les plus importants pour caractériser les propriétés des milieux dans le but d'évaluer la qualité des denrées alimentaires. Les résultats issus de cette étude (**Figure19**) donnent une indication sur la qualité physicochimique des trois échantillons analysés.

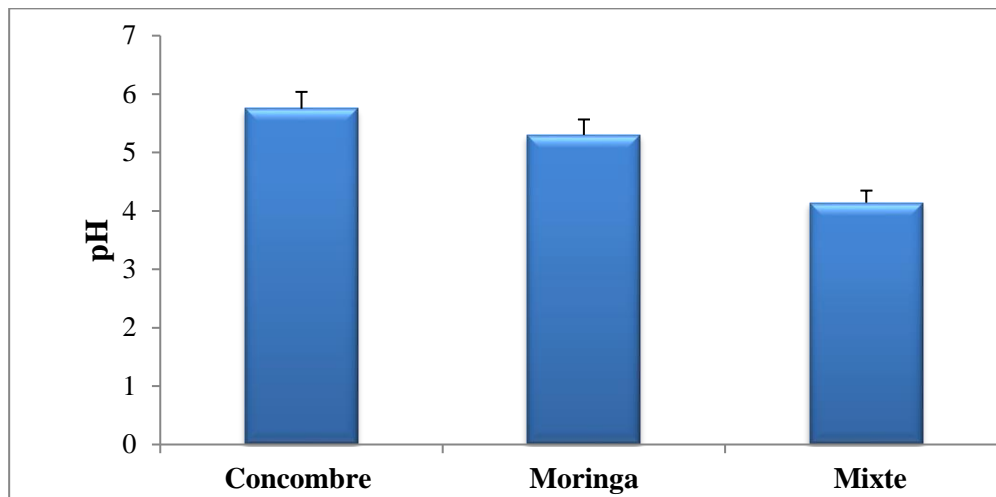


Figure 18. pH de jus concombre, de l'infusion de Moringa et du mixte.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que le pH de jus de concombre est de 5.75 ± 0.07 . Les résultats trouvés par **Olayinka et Etejere (2018)**, ont montré un pH de 5.75 pour la pulpe de concombre et un pH de 5.55 pour l'écorce du même légume. Des études réalisées par **Liu et al. (2016)** ont montré que le pH du jus de concombre avant et après ultrafiltration était de 5.69 et 5.74 respectivement.

Par ailleurs, le pH de l'infusion du Moringa était de 5.30 ± 0.01 . Les résultats d'une étude menée par **Kharode et al. (2019)**, sont proches de la nôtre, ces auteurs ont trouvé que le pH de l'infusion du moringa était de 5.50. Une étude menée par **Aftab et al. (2016)**, a indiqué que l'infusion de poudre de Moringa est légèrement acide en raison de la présence d'acide oxalique, phénolique et chlorogénique.

Lorsque le concombre a été mélangé avec du Moringa, le pH a diminué 4.14 ± 0.01 (le mixte est vraiment à caractère acide).

III.5.2. Degré Brix

Le degré Brix représente les solides solubles dans l'eau. Les résultats de l'évolution du degré Brix des trois échantillons sont illustrés sur la **Figure20**.

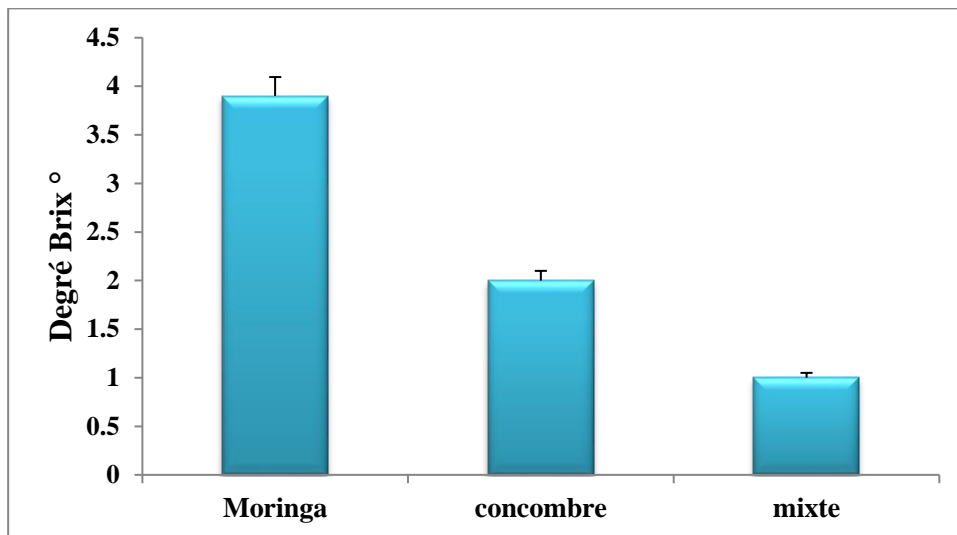


Figure 19. Degré Brix de jus de concombre, de l'infusion du Moringa et du mixte.

D'après cette **Figure (20)**, nous remarquons que le degré Brix de l'infusion du moringa est plus élevé comparativement à celui des deux échantillons, il est de $3.9 \pm 0.06^\circ\text{B}$, cette valeur est proche de celle obtenue par **Noaman et al. (2022)**, qui ont obtenu un Brix de 4° . Cependant, le jus de concombre avait un Brix de $2 \pm 0.05^\circ$. Les résultats de l'étude menée par **Liu et al. (2016)** sont proches des nôtres, ces auteurs ont trouvé que le degré Brix de jus de concombre avant et après ultrafiltration étaient respectivement de 2.63° et 2.13° . Lorsque les deux échantillons ont été mélangés, le degré Brix obtenu était de $1^\circ \pm 0.04\text{B}$.

III.5.3. Teneur en matière sèche

Les résultats de la teneur en matière sèche du jus de concombre, de l'infusion de moringa et le mixte sont regroupés dans la **Figure 21**.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que le jus de concombre présente une forte teneur en matière sèche estimée à $2.7 \pm 0.10\%$. Les résultats de l'étude menée par **Lu et al. (2002)** sont supérieurs à la nôtre (teneur en matière sèche varient entre 4.34 et 5.01% selon l'échantillon de concombre). L'infusion de Moringa possède une teneur de $1.7 \pm 0.02\%$, alors que, le mixte à la teneur la plus faible ($1.3 \pm 0.04\%$).

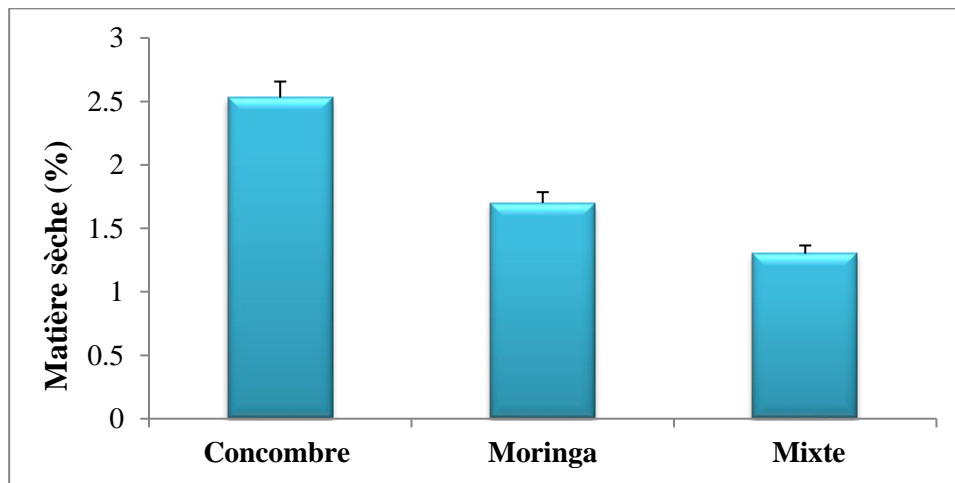


Figure 20. Matière sèche de jus de concombre, de l'infusion de Moringa et du mixte.

III.5.4. Teneur en matière minérale

Les résultats obtenus pour la teneur en matière minérale après l'obtention d'une couleur grise à blanche sont présentés sur la **Figure 22**.

D'après cette figure, nous remarquons que la teneur en matière minérale de jus de concombre est la plus élevée par rapport aux autres échantillons, elle est de $1.16 \pm 0.07\%$. Nos résultats sont meilleurs par rapport à ceux trouvés par **Olayinka et Etejere (2018)**, qui ont étudié la composition minérale du concombre et ils ont trouvé que la matière minérale variait entre 0.073 et 0.131% pour l'écorce, 0.070 et 0.138% pour la pulpe. Par ailleurs, le Moringa avait une teneur de $0.9 \pm 0.04\%$. La teneur en matière minérale a légèrement diminué $0.33 \pm 0.01\%$ lorsque le concombre a été mélangé avec du moringa.

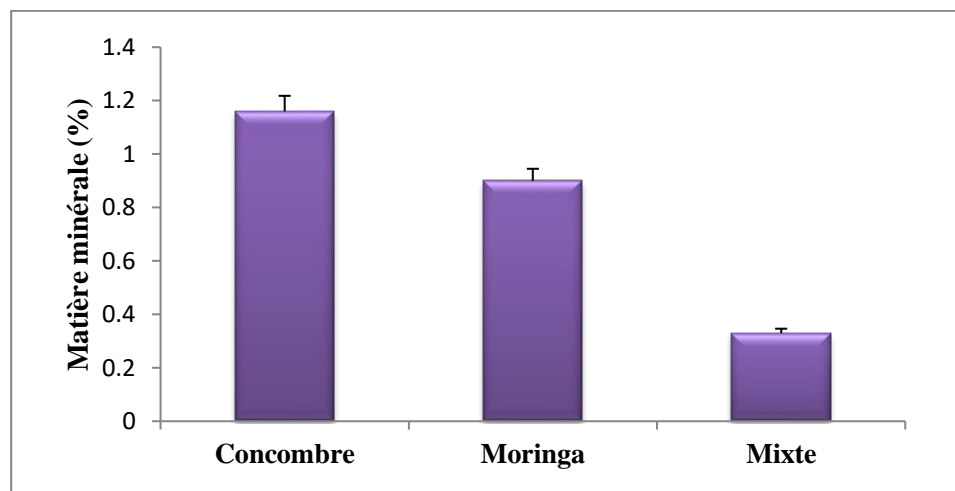


Figure 21. Teneur en matière minérale de jus de concombre, de l'infusion de Moringa et du mixte.

III.5.5. Teneur en sucres totaux

La détermination de la teneur en sucres totaux a été réalisée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de glucose. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure 23**.

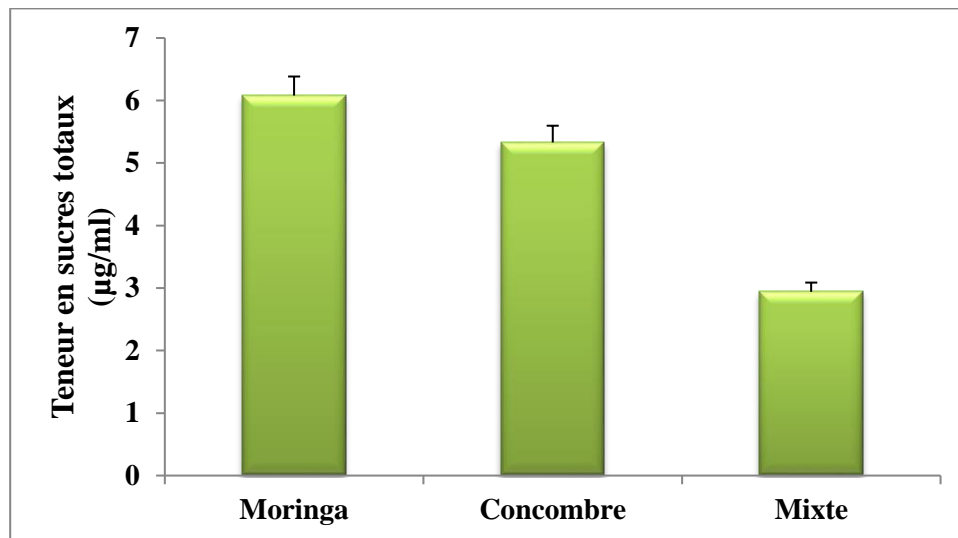


Figure 22. Teneur en sucres totaux de jus de concombre, de l'infusion de Moringa et du mixte.

D'après l'histogramme illustré dans la **Figure 23**, la teneur en sucres totaux était importante dans l'infusion de Moringa, estimée à $6.08 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$. Les résultats de l'étude menée par **Gharsallah et al. (2021)** ont montré que la teneur en sucres totaux de la plante *Moringa oleifera* était de 10.13%. D'autre part, le jus de concombre renfermait une teneur de $5.33 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$. Cette teneur est légèrement diminuée pour le jus mixte, estimée à $2.94 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$.

III.5.6. Teneur en polyphénols totaux

Les composés phénoliques réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu en donnant une coloration bleu proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel.

La détermination de la teneur en polyphénols totaux a été réalisée à partir l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage équivalent d'acide gallique ($y=7.59 X + 0.0084$ et $R=0.98$) et exprimées en mg EAG /100ml. Les résultats sont illustrés dans la **Figure 24**.



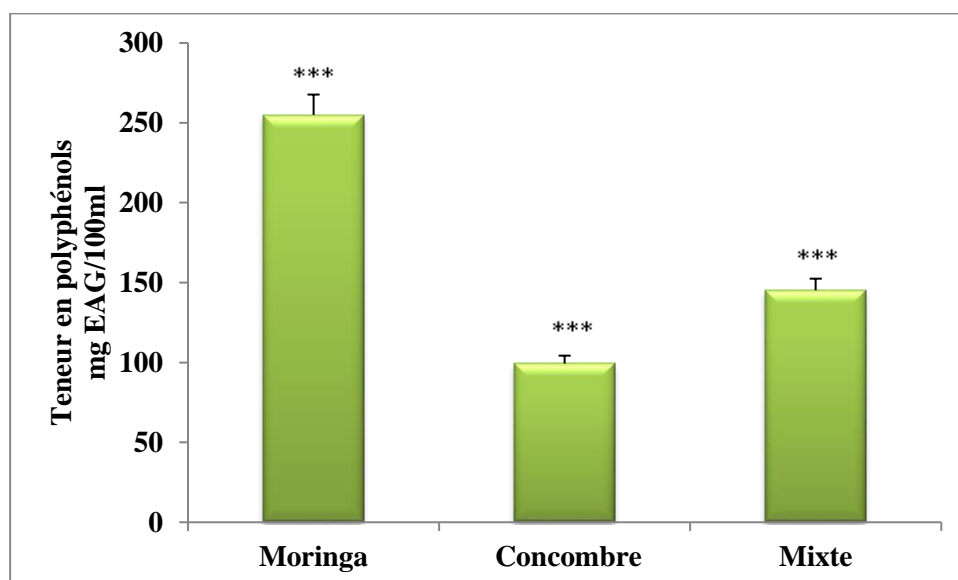


Figure 23. Teneur en polyphénols de jus de concombre, de l'infusion de Moringa et du mixte.

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

D'après cette **Figure (24)**, nous remarquons que le Moringa possède la teneur la plus importante en polyphénols totaux égale à 254.95 ± 0.21 mg EAG/100ml, supérieure à celles trouvées pour le concombre et le mixte qui étaient de 99.32 ± 0.02 mg EAG/100ml et 145.2 ± 0.14 mg EAG/100ml respectivement.

Nos résultats sont supérieurs de ceux trouvés par **Preciado-Rangel et al. (2019)** qui ont obtenu une teneur en polyphénols totaux variant entre 105 et 168.7 mg/100g dans les différentes concentrations de concombre. Ils sont également proches de ceux trouvés par **Nwidu et al. (2018)** qui ont obtenu une teneur en polyphénols dans le moringa de 223.2 mg EAG/ml. **Hamed et al. (2020)** ont rapporté que la variation était en fonction du traitement thermique, dont la température la plus élevée (80°C) a donné une teneur de 161.48 mg d'AG/g supérieur à celle de la plus basse (20°C) (128.15 mg d'AG/g). Cette différence est dû au fait que l'augmentation de la température d'extraction peut augmenter le taux de diffusion et la solubilité des composés phénoliques.

III.5.7. Teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des différents échantillons a été déterminée graphiquement par la courbe d'étalonnage de la quercétine. D'après les résultats illustrés dans la **Figure 25**, nous remarquons que le Moringa présente une forte teneur en flavonoïdes (153.8 ± 0.07 μg EQ/100 ml). Par ailleurs, **Coz-Bolaños et al. (2018)**, ont trouvé une teneur totale en composés

flavonoïdiques de 127.1 $\mu\text{g EQ}/100\text{ml}$.

Cependant, la teneur en flavonoïdes de jus de concombre et le jus mixte a été de $82.3 \pm 0.28 \mu\text{g EQ}/100\text{ml}$ et $109.5 \pm 0.14 \mu\text{g EQ}/100\text{ml}$ respectivement. Plusieurs auteurs ont trouvé des résultats inférieurs aux nôtres. Ces différences peuvent être dues aux différences de climat et de composition des sols. Il a été rapporté par **Ademiluyi et al. (2018)** que le traitement thermique entraîne la dégradation des flavonoïdes dans les légumes.

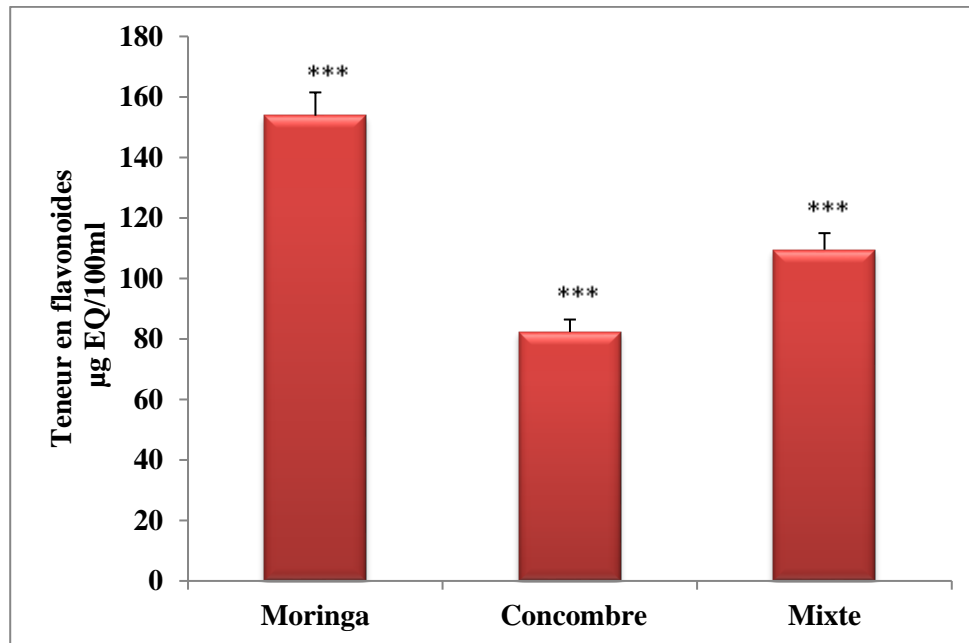


Figure 24: Teneur en flavonoïdes de jus de concombre, de l'infusion de Moringa et du mixte.

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

III.6. Activité antioxydante des matrices végétales

III.6.1. Piégeage de radical libre (DPPH)

D'après les résultats illustrés dans la **Figure 26**, il est remarquable que le Moringa ait une capacité anti-radicalaire peu faible estimée à $65.1 \pm 0.01\%$ comparativement à celle de l'antioxydant utilisé comme standard (trolox 70%), en revanche, cette capacité anti-radicalaire est plus importante comparativement à celles trouvées avec le jus de concombre et le mixte avec des taux d'inhibition respectifs de $18.3 \pm 0.01\%$ et $35.07 \pm 0.02\%$.

Nos résultats sont proches de ceux trouvés par **Pangestuti et al. (2016)**, qui ont obtenu une capacité de piégeage des radicaux libres avec le concombre estimé à 13.14%. Une autre étude menée par **Jang et al. (2021)**, a montré également que l'activité de piégeage des radicaux

libres DPPH du concombre était de 13.89%. Les résultats de l'étude menée par **Wanna (2019)** sont supérieurs aux nôtres, l'auteur a trouvé une capacité anti-radicalaire du concombre de 24.08%.

Par ailleurs, **Ilyas et al. (2015)**, ont trouvé que la poudre de feuilles de Moringa avait une capacité anti-radicalaire de 87.02%, alors que pour la poudre de graines de Moringa l'activité était de 34.05%. L'étude réalisée par **Hossain et al. (2020)**, a montré que la capacité anti-radicalaire de Moringa dans l'extrait de méthanol variait entre 46.32 et 58.09%, et celle l'extrait de l'éthanol variait entre 56.76 et 69.72%.

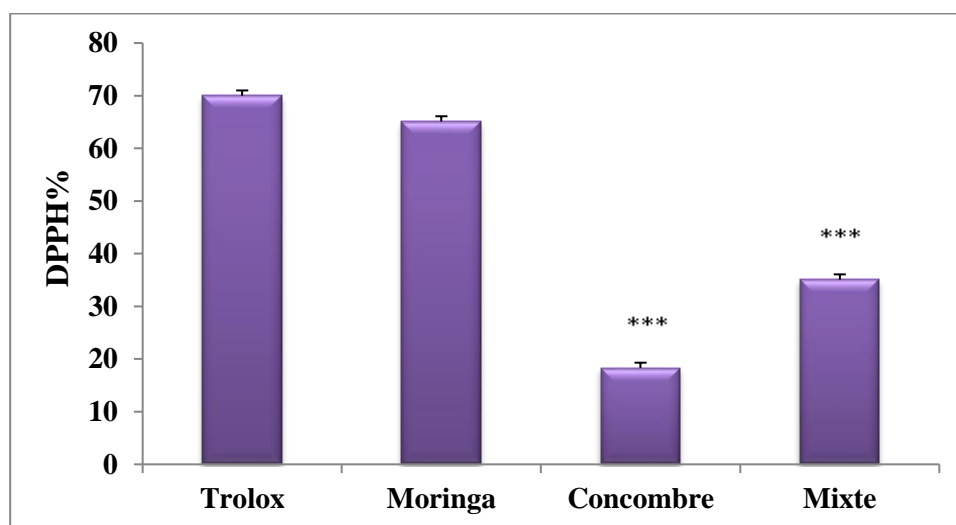


Figure 25. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des trois matrices végétales.

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

III.6.2. Pouvoir réducteur du fer

La **Figure 27**, représente l'évolution du pouvoir réducteur de l'extrait de Moringa, le jus de concombre et le mélange des deux échantillons exprimés en μg équivalent d'acide ascorbique/ml.

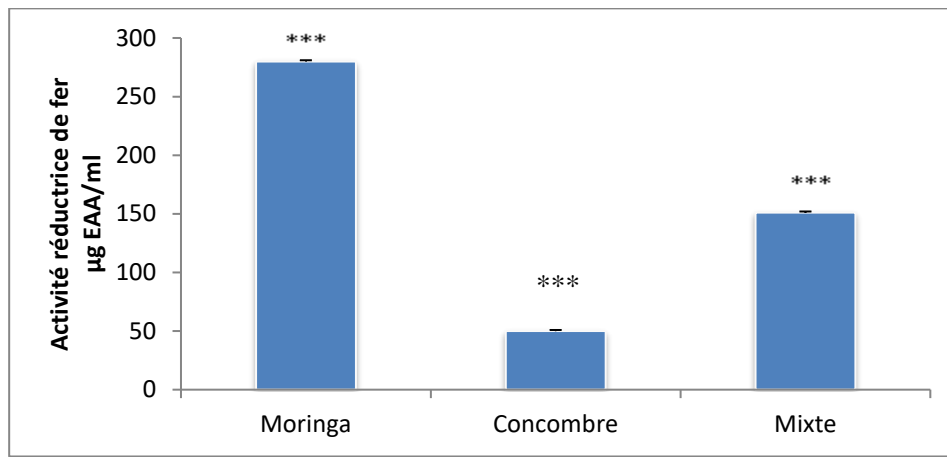


Figure 26. Pouvoir réducteur des trois matrices végétales.

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

D'après les résultats obtenus, l'extrait de Moringa exerce la meilleure capacité à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) avec $280 \pm 0.02 \mu\text{g EAA/ml}$. Une étude menée par **da Silva et al. (2022)**, a montré que le pouvoir réducteur du fer par Moringa était de $265 \mu\text{g EAA/ml}$. Les résultats de celle réalisée par **Karim et al. (2018)** sont supérieurs aux nôtres, ces auteurs ont obtenu une capacité à réduire le fer ferrique en fer ferreux par moringa estimée à $305 \mu\text{g EAA/ml}$.

La capacité de jus de concombre à réduire le fer ferrique en fer ferreux était de $49.89 \pm 0.07 \mu\text{g EAA/ml}$. Tandis que, la capacité du mixte était de $151 \pm 0.04 \mu\text{g EAA/ml}$. L'étude menée par **Khojah et al. (2021)**, a montré que le concombre a une capacité réductrice de fer de $58 \mu\text{g EAA/ml}$. De même, l'étude réalisée par **Oboh et al. (2016)**, a montré également que la capacité de réduire le fer par le concombre était de $79 \mu\text{g EAA/ml}$.

III.7. Evaluation de quelques paramètres de fermentation

III.7.1. pH et Acidité

Avant de lancer la fermentation, le mixte de concombre-Moringa avait un pH de 4.14, ce résultat est proche de celui obtenu par **Babajide et al. (2013)**, ces auteurs ont trouvé que le pH du jus concombre-ananas était de 4.41.

Après l'ensemencement du jus mixte par les souches mixtes libres et encapsulées, nous avons remarqué une diminution progressive des valeurs du pH tout au long de la période de fermentation. Le **tableau 4** représente l'évolution du pH et l'acidité dans le produit.

Tableau 5. Evolution de pH et l'acidité dans le jus mixte au cours de la fermentation.

Jus mixte	pH		Acidité (acide citrique %)	
	T ₀	T ₂₄	T ₀	T ₂₄
	4.14±0.02		0.5±0.02	
Jus lactofermenté (Souche mixte libres)	3.7±0.14	3.33±0.01	1.2±0.28	2.5±0.14
Jus lactofermenté (Souche mixte encapsulées)	4.14±0.01	4.00±0.14	0.5±0.01	2±0.08

Après inoculation de jus mixte de concombre-Moringa par les souches mixtes de *L. plantarum* (S10 et BCX1) libres, une diminution progressive du pH jusqu'à atteindre une valeur de 3.7±0.14 a été notée. Par contre, l'ensemencement de jus mixte par les mêmes souches encapsulées (T=0h), n'avait aucune influence sur la valeur du pH.

Après 24h de fermentation, nous remarquons une diminution progressive du pH de jus mixte ensemencé par les souches mixtes libres pour atteindre un pH de 3.33±0.01. L'abaissement de pH est dû à des réactions biochimiques se produisant dans le jus par les souches mixtes de *L. plantarum* (S10 et BCX1), ces derniers ont pu transformer les composants de jus mixte en acides organiques qui agissent directement sur le potentiel d'hydrogène du produit.

Une faible diminution du pH de jus mixte ensemencé par les souches encapsulées, peut être due à la faible concentration des cellules dans le jus mixte car les billes ne libèrent pas toutes les bactéries encapsulées en ces conditions.

Pour l'acidité du jus et d'après les résultats illustrés sur le **Tableau 4**, nous avons trouvé que l'acidité (% acide citrique) de jus mixte brut de concombre-Moringa était de 0.5±0.02%. Les résultats d'une étude menée par **Babajide et al. (2013)**, sont inférieurs aux nôtres, ces auteurs ont trouvé que l'acidité de jus mixte brut de concombre-ananas était de 0.21%. L'acidité a évolué à 1.2±0.28% après ensemencement de jus par les souches mixtes libres et reste inchangée après ensemencement par les souches mixtes encapsulées. Après 24h de fermentation, cette valeur augmente progressivement pour atteindre une valeur de 2.5±0.14% et 2±0.08% de jus fermenté par les souches libres et encapsulées respectivement. L'étude menée par **Malik et al. (2019)**, a montré que le pH des jus diminue et l'acidité augmente au cours de la fermentation.

III.7.2. Evolution du nombre de cellules viables

Au cours de la fermentation du jus mixte de concombre-moringa par les souches mixtes de *L. plantarum* (S10 et BCX1) libres et encapsulées, le nombre de cellules viables a été suivi et calculé en utilisant le dénombrement direct sur boîte de Pétri (UFC/ ml).

D'après l'histogramme illustré sur la **Figure 28**, nous remarquons que le nombre de cellules viables après ensemencement par les souches mixtes de *L. plantarum* libres et encapsulées dans le jus mixte est égal à 9.25 log UFC/ml et 6.69 log UFC/ml respectivement. Ce nombre a augmenté au cours de la fermentation pour atteindre 10.44 log UFC/ml pour les souches libres et 8.42 log UFC/ml pour les souches encapsulées.

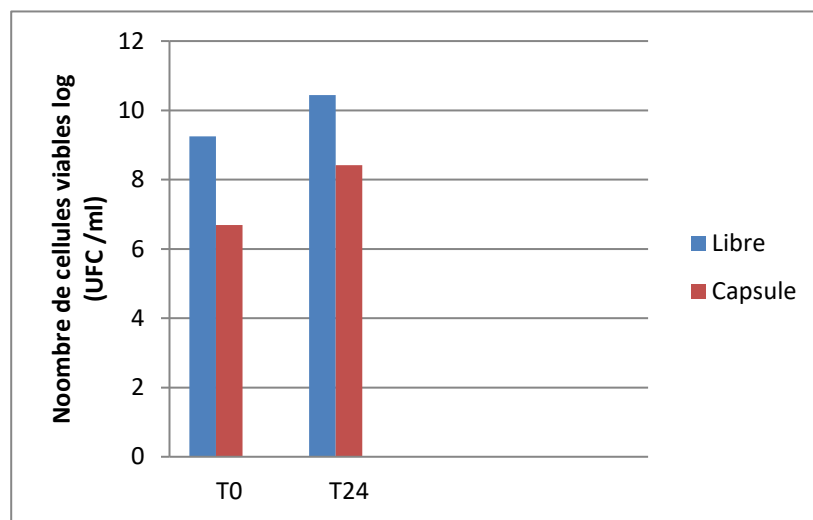


Figure 27. Nombre des cellules viables dans le jus mixte de concombre-moringa après 24h de fermentation.

Les résultats obtenus ont montré que nos souches mixtes ont une capacité de survivre dans le jus mixte fermenté (concombre-moringa) où le pH était bas et l'acidité était élevée. L'étude menée par **Reddy et al. (2015)** a montré l'augmentation du nombre de bactéries lactiques au cours de la fermentation des fruits et légumes.

III.8. Activités antioxydantes de jus lactofermenté

Ce test a pour objectifs, la vérification de la perte ou non des activités antioxydantes de la souche véhiculée par une matrice végétale fermentée.

III.8.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène

L'effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité des souches (*L. plantarum* mixte) après 24h de fermentation dans le jus mixte est représenté sur la **Figure 29**.

D'après les résultats obtenus, on trouve qu'il y a une amélioration de la résistance de la culture mixte de *L. plantarum* après 24 heures de fermentation vis-à-vis des différentes concentrations d' H_2O_2 comparativement au témoin. Ainsi, la meilleure résistance est observée dans le jus mixte lactofermenté par les souches libres comparativement à celles encapsulées.

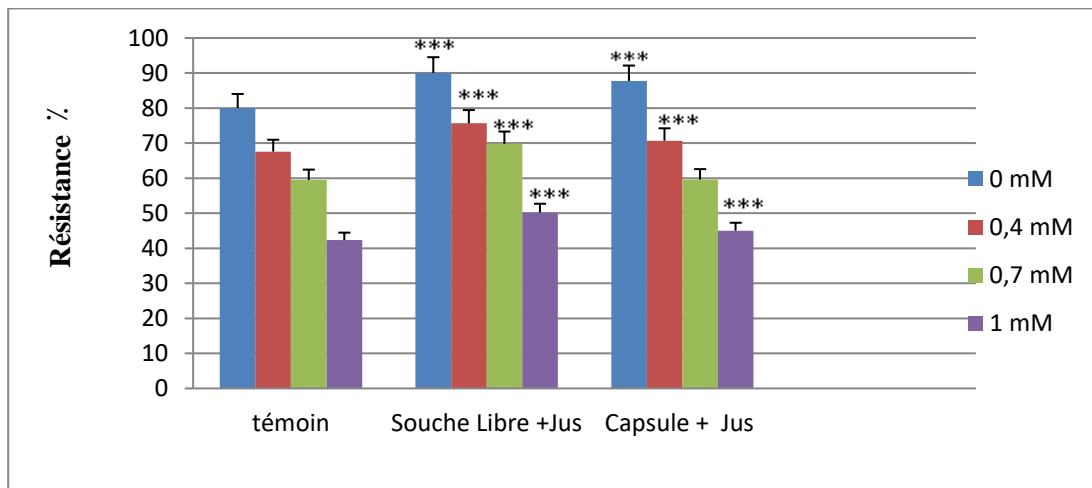


Figure 28. Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité des souches de *L. plantarum* après 24h de fermentation.

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

III.8.2. Activité de piégeage des radicaux libres (DPPH)

Les résultats des pourcentages de piégeage des radicaux libres de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl après 24 heures de fermentation de jus par les souches mixtes de *L. plantarum* libres et encapsulées sont illustrés dans la **Figure 30**. L'analyse statistique des résultats révèle une différence significative ($p < 0.001$).

La lecture des résultats obtenus, a montré que les souches libres dans le jus mixte donnent une meilleure activité d'inhibition avec un pourcentage de piégeage des radicaux libres de $90.92 \pm 0.02\%$ alors que les souches encapsulées ont donné une capacité de piégeage des radicaux de $77.18 \pm 0.02\%$. En revanche, la culture témoin a donné le plus faible pourcentage d'activité anti radicalaire.

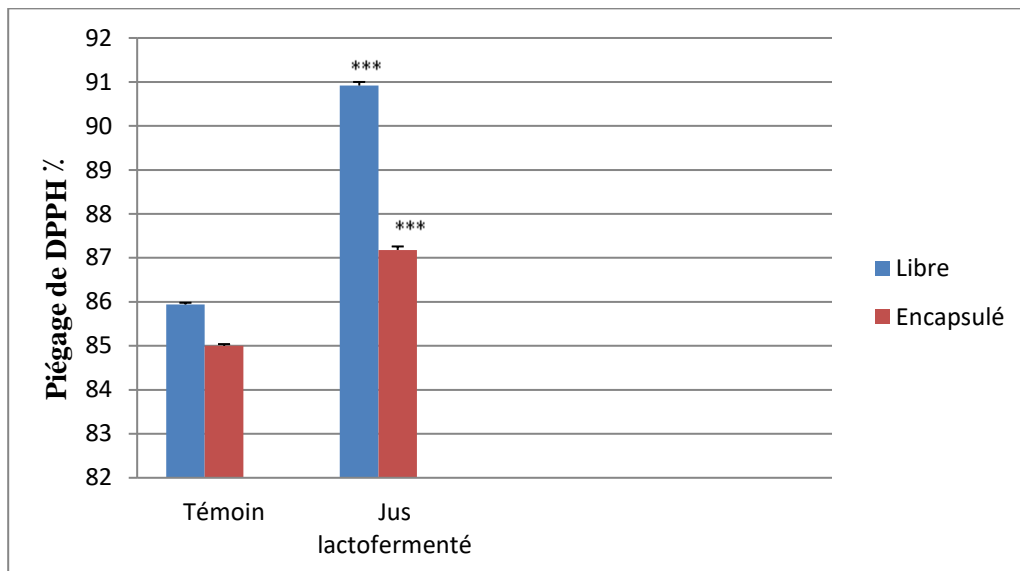


Figure 29. Pourcentage de piégeage de radicaux libre de DPPH après 24h de fermentation.

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

III.8.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles

Les résultats des pourcentages de piégeage des radicaux hydroxyles après 24 heures de fermentation des jus par les souches mixtes de *L. plantarum* libres et encapsulées sont groupés sur la **Figure 31**.

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 $51.76 \pm 0.04\%$ pour la culture encapsulée dans le jus mixte et $77.24 \pm 0.02\%$ pour la culture libre de la même matrice.

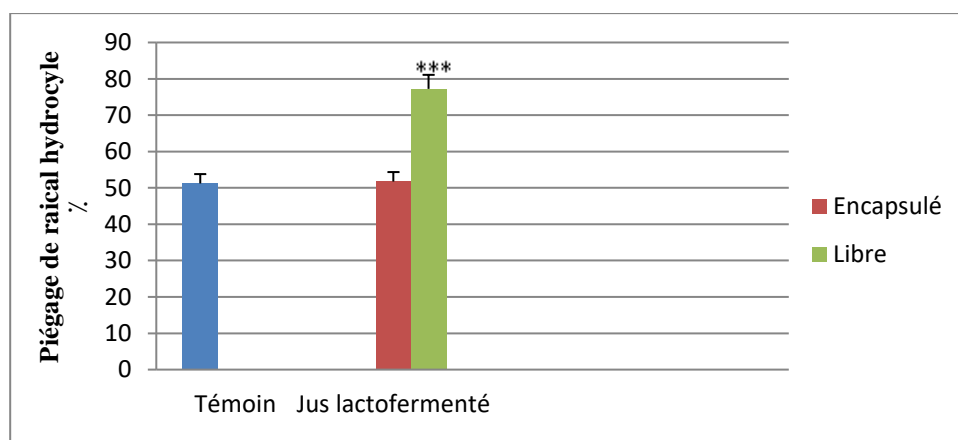


Figure 30. Pourcentage de piégeage de radical hydroxyle après 24h de fermentation.

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

L'augmentation des activités antioxydantes des deux bactéries peut être due aux augmentations du nombre des cellules au cours de la fermentation (24heures) avec une contribution probable des composés contenus dans le jus.

Selon certains auteurs, le métabolisme des composés phénoliques conduit souvent à une augmentation de l'activité antioxydante du produit fermenté. Cependant, la formation d'exopolysaccharides, de glutathion, de superoxyde dismutase et de catalase peut être impliquée dans l'augmentation de l'activité antioxydante pendant la fermentation lactique. En outre, les capacités antioxydantes totales des matières végétales sont principalement attribuables aux composés polyphénoliques totaux et à l'acide ascorbique (Filannino *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2019).

III.9. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de nos échantillons (jus de concombre, moringa, le mixte et le mixte fermenté) a été évaluée en provoquant l'hémolyse par une solution hypotonique qui induit la désorganisation de la membrane et la libération d'hémoglobine.

Les résultats des pourcentages de stabilisation de la membrane des globules rouges sont représentés dans la **Figure 32**.

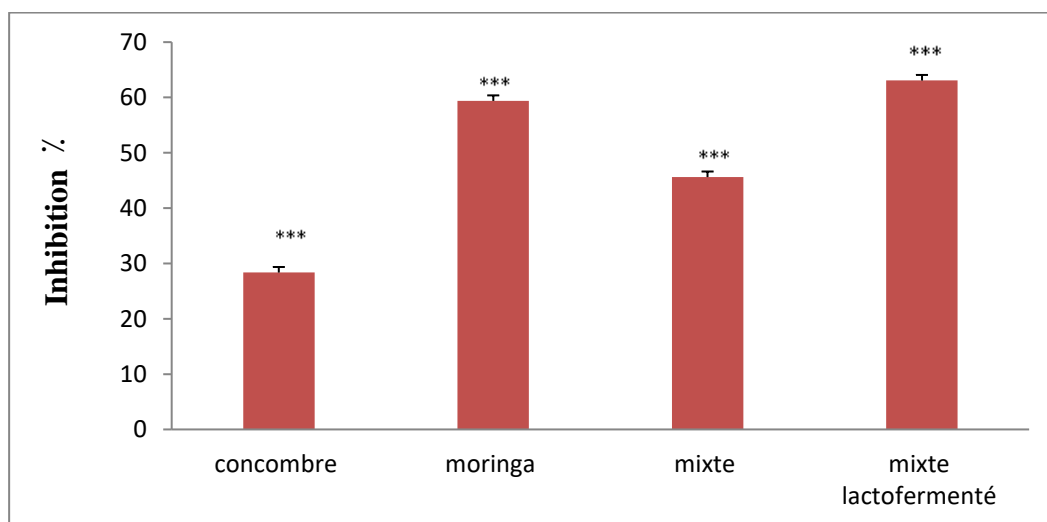


Figure 31. Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des globules rouges traités par différents échantillons.

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

A partir des résultats mentionnés dans l'histogramme (**Figure 32**), on observe que l'étude du pouvoir inhibiteur de l'hémolyse des échantillons a montré qu'ils possèdent tous une activité inhibitrice de l'hémolyse.

Ce résultat confère à la plante un mécanisme d'action anti inflammatoire et pourrait s'expliquer par la présence des composés bioactifs tels que les composés phénoliques et les saponines. De nombreuses études ont montré que les polyphénols et leurs métabolites inhiberaient les activités enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique et réduiraient la production des médiateurs de l'inflammation tels que l'acide arachidonique, des monoxydes d'azote, de prostaglandines et de leucotriènes. Les polyphénols sont donc responsables des activités anti-inflammatoires d'où leur utilisation comme des agents chimio préventifs (John et Shcherazade, 2021).

D'après les résultats, il apparaît que le mixte fermenté possède la meilleure activité de l'inhibition hémolytique, dépassant celle du témoin (mixte), ce qui prouve l'intérêt de la consommation des produits lactofermentés. Cependant le moringa est classé en deuxième position avec une activité de $59.38 \pm 0.02\%$, une preuve pratique de son utilisation en médecine traditionnelle et l'intérêt que portent les scientifiques à cette plante.

III.10. Effet de la digestion sur la viabilité des souches *L. plantarum* mixtes

III.10.1. Nombre de cellules viables

L'effet de la digestion bucco-gastro-intestinale sur la viabilité de mixture de *L. plantarum* libre et encapsulée est groupé sur la **Figure 33**.

D'après la représentation graphique, nous remarquons que les souches étudiées sont résistantes aux conditions similaires de la digestion orale (présence d' α -amylase et à pH7) après 2 minutes d'incubation avec un pourcentage de survie de 76.78% (10.33 log UFC/ml), 80% (8.32 log UFC/ml) pour *L. plantarum* libre et encapsulé 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 log 8.95 log UFC/ml (*L. plantarum* mixte libre) et log 7.11 log UFC/ml (*L. plantarum* mixte encapsulé). Ceci indique que le nombre de cellules est abaissé mais la survie reste toujours.

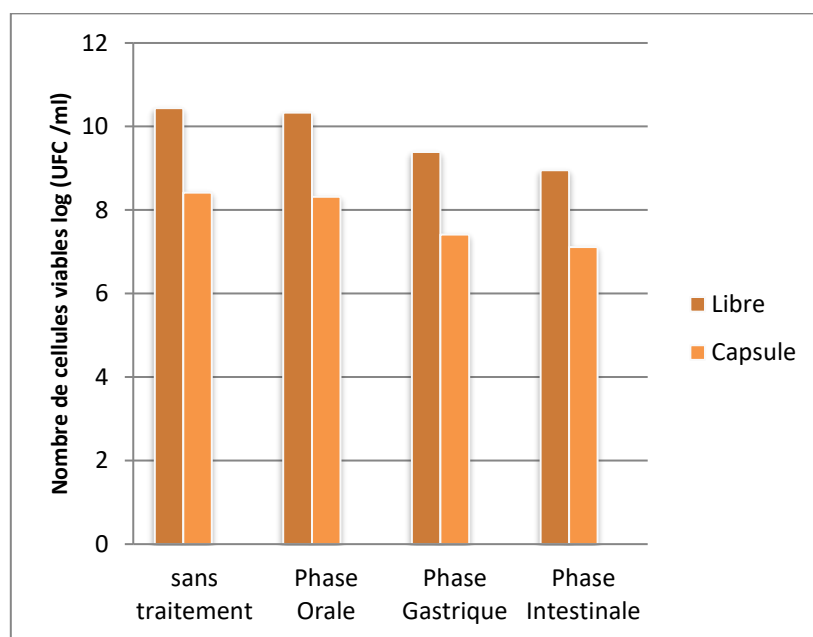


Figure 32. Effet de la digestion sur la viabilité et la survie des cellules des souches mixtes de *L. plantarum* (UFC/ml).

L'addition de la pepsine aux conditions acides de l'estomac a provoqué une perte plus ou moins importante de la viabilité bactérienne. **Vamanu (2017)**, 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.10.2. Aptitudes probiotiques de *L. plantarum* mixte après la digestion bucco-gastro-intestinale

III.10.2.1. Résistance au pH gastrique

Afin d'exercer un effet positif sur l'hôte, les micro-organismes probiotiques doivent conserver leur forme active pendant le processus de digestion, être capables de survivre à l'action d'une enzyme lytique et à un pH défavorable jusqu'à atteindre le point cible.

La figure ci-dessous (**Figure 34**) 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 (**Figure11**), nous remarquons que le taux de survie des 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* mixte libre $45.17 \pm 0.02\%$, $31.13 \pm 0.02\%$, $27.88 \pm 0.04\%$, et de $59.12 \pm 0.02\%$, $42.51 \pm 0.02\%$ et $32.02 \pm 0.04\%$ pour *L. plantarum* mixte encapsulée.

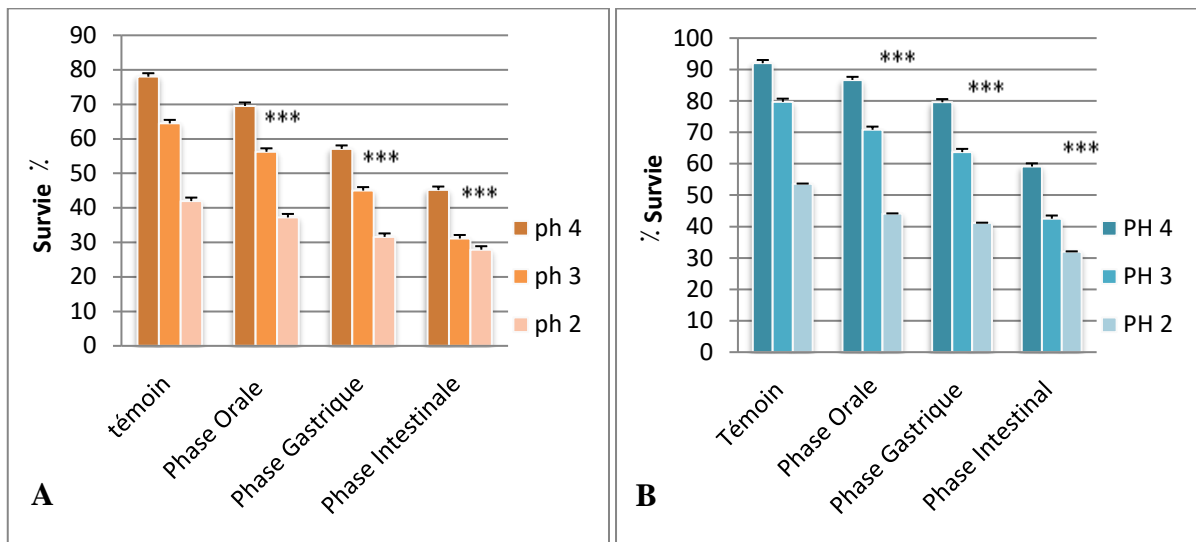


Figure 33. Taux de survie de *L. plantarum* mixte aux différents pH après la digestion bucco-gastro-intestinale.

(A) : *L. plantarum* mixte libre, (B) : *L. plantarum* mixte encapsulée.

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

Il a été rapporté que l'encapsulation des microorganismes probiotiques peut assurer leur plus grande survie dans les environnements gastrique et intestinal. Il a également été démontré par plusieurs auteurs, et partiellement confirmé dans la présente étude, que la protection des probiotiques par les capsules est une méthode permettant d'améliorer leur viabilité dans les aliments fonctionnels, puis dans les conditions défavorables du tractus gastro-intestinal (Fijałkowski *et al.*, 2016).

Une étude similaire a été conduite par Gheziel *et al.* (2019), ils ont testé la tolérance de six souches de *L. plantarum* aux stress buccaux - gastriques et intestinaux, les résultats publiés ont montré que la viabilité des souches n'était pas affectée par le stress oral, 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*.

III.10.2.2. Résistance aux sels biliaries

L'effet des sels biliaries sur les deux souches mixtes de *L. plantarum* au niveau intestinal est représenté dans la Figure 35. Les *L. plantarum* encapsulées ont présenté une viabilité de 69.43 ± 0.09 % après avoir été exposées à des phases gastro-intestinales simulées. De même, les cellules non encapsulées ont montré une viabilité similaire (51.72 ± 0.07 %).

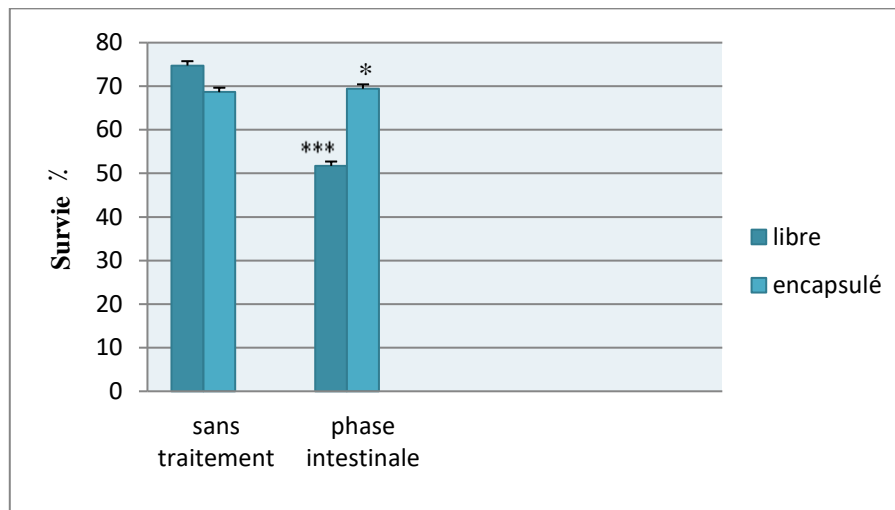


Figure 34. Taux de survie des souches de *L. plantarum* aux sels biliaires au niveau intestinale.

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

Après la phase intestinale simulée, la viabilité a diminué pour les cellules encapsulées et libres, respectivement. En raison de la présence de sels biliaires et d'enzymes pancréatiques, une réduction significative de la viabilité dans la phase intestinale a été observée par **Boricha et al. (2019)**.

Les micro-organismes probiotiques doivent être intrinsèquement tolérants aux facteurs de stress prévalant dans le tractus gastro-intestinal afin de garantir des avantages pour la santé du consommateur. Parmi les différents facteurs de stress, le pH et les sels biliaires sont les plus préjudiciables à la viabilité des probiotiques. Pour cette raison, le pH acide et les sels biliaires sont utilisés dans les études *in vitro* pour le dépistage du potentiel probiotique (**Dos Santos et al., 2021**).

III.10.2.3. Hydrophobicité

L'hydrophobie mesure directement la capacité d'adhésion des *L. plantarum* aux lignées cellulaires entérocytaires, ce qui est une propriété les plus souhaitables pour les bactéries probiotiques. Par conséquent, l'hydrophobie a été considérée comme le principal critère de sélection des bactéries probiotiques (**Dowarah et al., 2018**). D'après les résultats illustrés dans la **Figure 36**, une différence hautement significative a été trouvée ($p < 0.001$).

Nous remarquons que les pourcentages d'hydrophobicité sont variables d'un solvant à l'autre ; il est compris entre $60.08 \pm 0.05\%$ et $80.05 \pm 0.07\%$ pour *L. plantarum* mixte libre. Nos résultats

sont similaires à ceux trouvés par **Lin et al. (2020)** qui ont évalué certains isolats de *L. plantarum* pour leur capacité à se lier aux différents solvants organiques dont les résultats publiés ont montré un pourcentage variant de 74.57% à 90.11%.

Les différences d'hydrophobie de la surface cellulaire pourraient être attribuées à des différences dans la composition des polymères de surface impliqués dans l'interaction hydrophobe, qui influence la force de l'adhésion (**Kumari et al., 2022**).

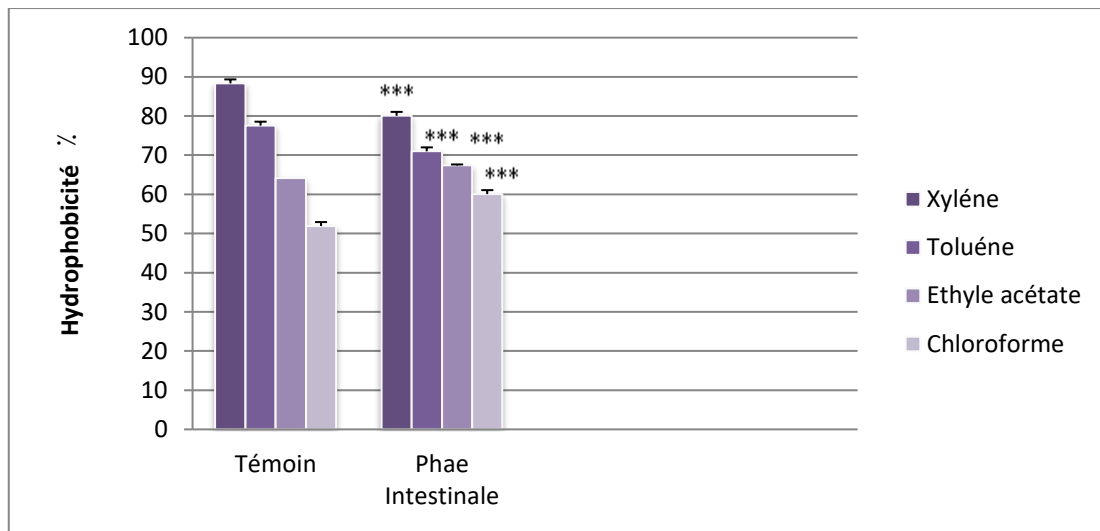


Figure 35. Pourcentage d'hydrophobicité intestinale de *L. plantarum* libre.

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

III.10.2.4. Auto-agrégation

L'auto-agrégation permet aux souches d'adhérer et de coloniser le tractus gastro-intestinal. Les résultats de l'auto-agrégation des souches sont représentés dans la **Figure 37**. Nous remarquons que les taux d'auto-agrégation de *L. plantarum* mixte dans le compartiment intestinal est de 81.25 ± 0.32 %. Ces valeurs sont inférieures à ceux des témoins et le taux d'auto-agrégation est toujours supérieur à 80%. Dans cette étude, on a observé que *L. plantarum* mixte avaient une activité importante d'auto-agrégation. Dans une étude précédente, *L. plantarum* isolé du kimchi Coréen a montré une activité d'auto-agrégation considérable, ce qui corrobore à notre observation (**Khan et Kang, 2016**).

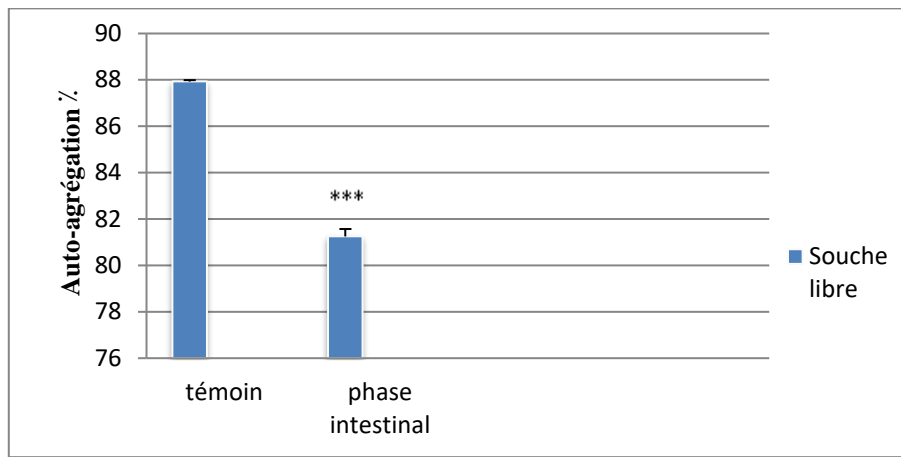


Figure 36. Pourcentage d’auto-agrégation des souches mixtes de *L. plantarum* après la digestion bucco-gastro-intestinale.

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

III.10.2.5. Co-agrégation

Une autre propriété importante des souches à considérer comme probiotiques est la capacité de co-agrégation avec les pathogènes. D’après les résultats illustrés dans la **Figure 38**, nous remarquons une diminution des pourcentages de la co-agrégation comparativement à ceux du témoin. En particulier, la mixture aux cellules libres qui possédait un pourcentage de $51.02 \pm 0.08\%$, $46 \pm 0.02\%$ et $38.1 \pm 0.01\%$ avec *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* respectivement.

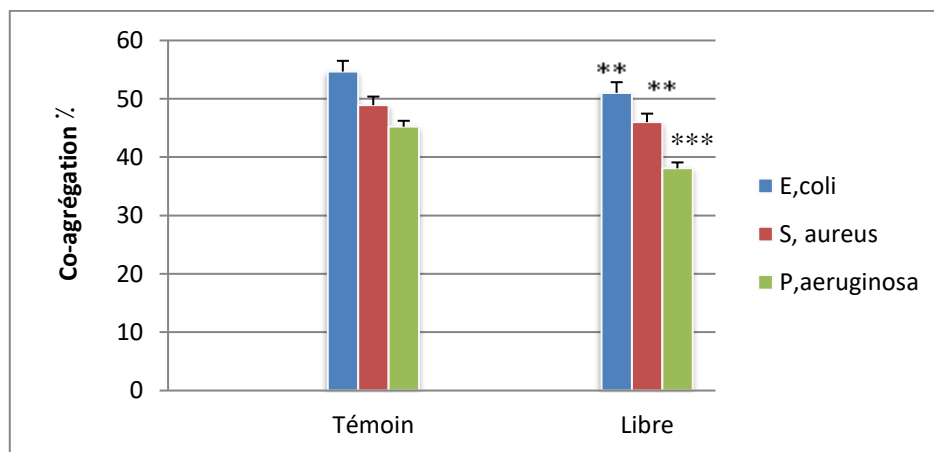


Figure 37. Pourcentage de la co-agrégation des souches libres de *L. plantarum* après la digestion intestinale.

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

La capacité des espèces de *Lactiplantibacillus* à s’agréger peut-être attribuée à la présence de molécules spécifiques sur leur surface qui agissent comme des ligands pour la fixation des agents pathogènes ou comme des adhésines pour la fixation à l’épithélium intestinal (**Oh et al., 2018**).

III.10.3. Activité antioxydante des souches après digestion bucco-gastro-intestinale

III.10.3.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène

L'effet de la digestion sur la résistance au peroxyde d'hydrogène est mentionné dans la **Figure 39**.

D'après les résultats obtenus, l'absorbance diminue au cours du passage dans le tractus gastro-intestinal et diminue aussi en fonction de la concentration en H₂O₂. Autrement dit, et comparativement au témoin, la résistance aux différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène a diminué après chaque passage digestif.

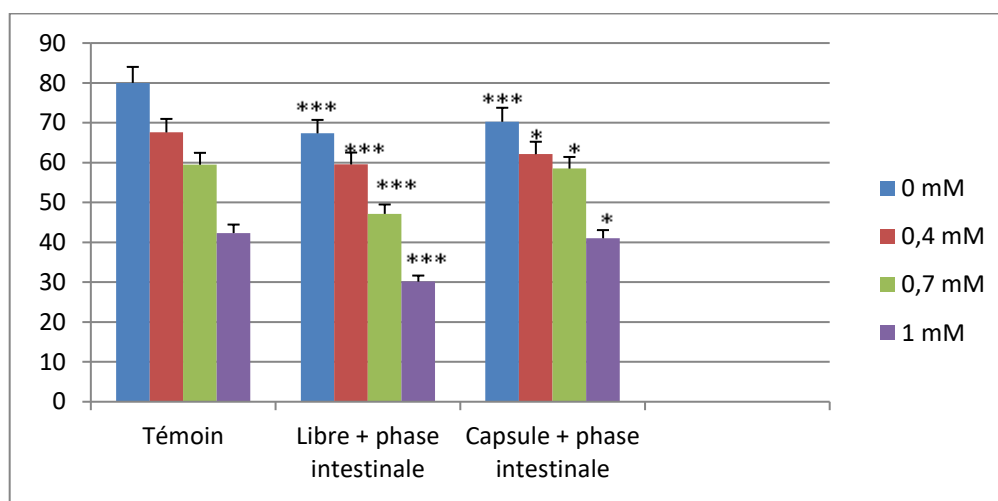


Figure 38. Résistance de *L. plantarum* mixte au peroxyde d'hydrogène après la digestion bucco-gastro-intestinale.

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

* : Différences significatives ($p < 0.05$).

III.10.3.2. Activité de piégeage des radicaux libres de DPPH

Les résultats du taux d'inhibition des radicaux libres (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) sont illustrés dans la **Figure 40**. Les différences sont hautement significatives ($p < 0.001$).

D'après les résultats mentionnés sur la figure, 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 a diminué pour atteindre un taux d'inhibition de 45.67 ± 0.06 %, 47.14 ± 0.21 % pour *L. plantarum* libres et *L. plantarum* encapsulées respectivement.

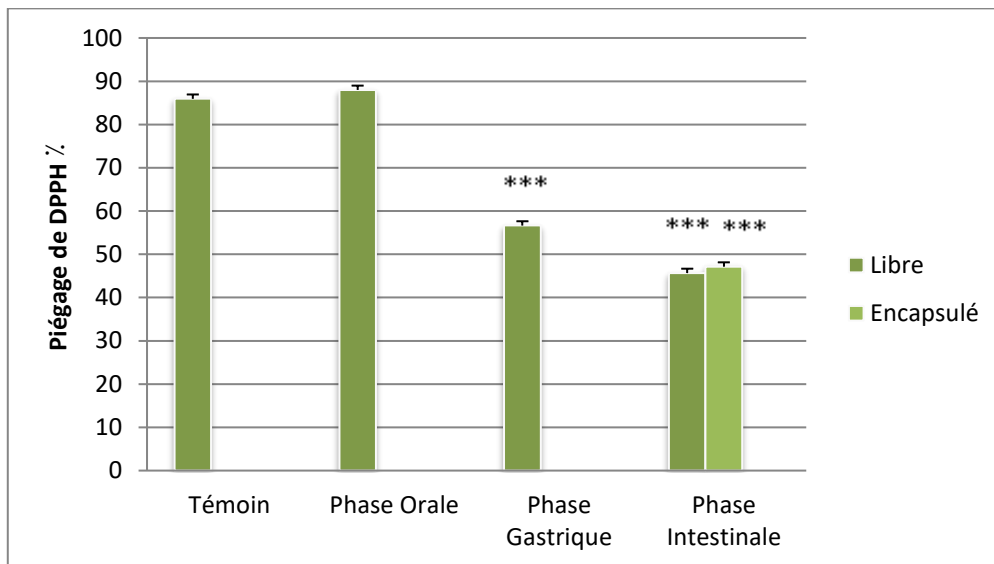


Figure 39. Pourcentage de piégeage des radicaux DPPH par les souches mixtes de *L. plantarum* après digestion bucco-gastro-intestinale.

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

Nos résultats sont proches de ceux de **Gharbi et al. (2019)** qui ont testé la capacité des souches probiotiques à capter les radicaux libres au niveau intestinal et ils ont montré que les taux d'inhibition des souches de *L. plantarum* variaient de 35.8 % à 38.0 %. Le passage de cette souche dans le tractus gastro-intestinal peut être affecté par diverses conditions défavorables, entraînant une perte de cellules et donc une activité antioxydante réduite.

La faible activité antioxydante à la fin du processus de digestion simulée peut indiquer une faible stabilité des composés aux changements du pH et de l'activité enzymatique. Les composés antioxydants sont plus réactifs en particulier à un pH acide (digestion gastrique) et moins réactifs à un pH proche de la neutralité (digestion intestinale). Ainsi, au cours de la digestion, une biotransformation des composés peut se produire vers d'autres à faible potentiel antioxydant ou par la formation de nouveaux métabolites antioxydants (**Andrade et al., 2022**).

III.10.3.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles

L'effet de la digestion *in vitro* sur l'activité de piégeage des radicaux hydroxyles de la souche lors du passage est illustré par la **Figure 41**. L'analyse statistiques a montré qu'il ya des différences hautement significatives ($p < 0.001$).

Nous avons remarqué une diminution de la capacité du piégeage des radicaux hydroxyles lors du transit dans le tractus gastro-intestinal. Le taux d'inhibition de *L. plantarum* libre est abaissé vers 42.46 ± 0.02 % au niveau buccal, de 39.12 ± 0.08 % au niveau gastrique et le taux atteint 30.59 ± 0.12 % et 35.99 ± 0.04 % pour *L. plantarum* encapsulée au niveau intestinal et ce après 4h de digestion.

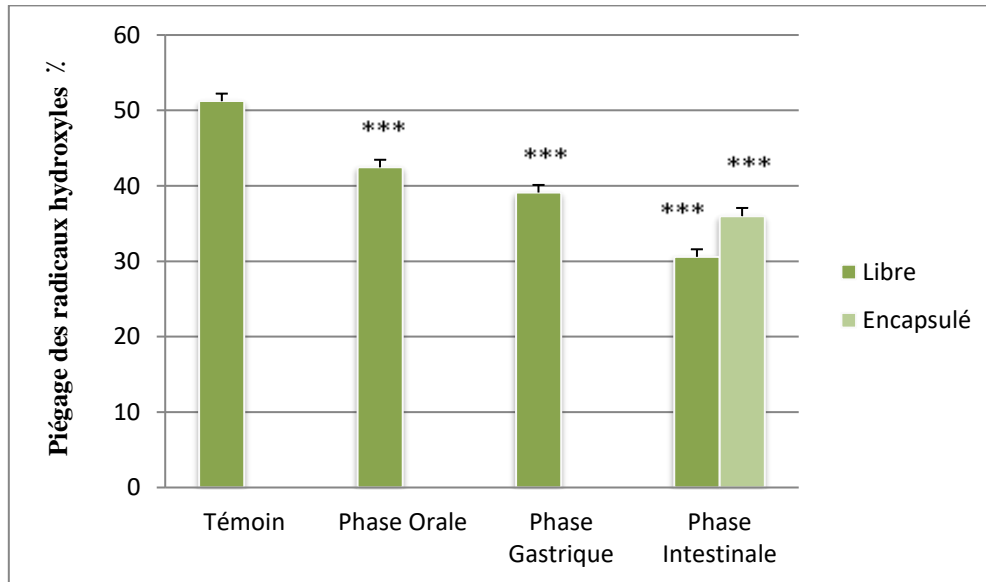


Figure 40. Pourcentage de piégeage des radicaux hydroxyles par *L. plantarum* mixte après digestion bucco-gastro-intestinale.

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

III.11. Digestion bucco-gastro-intestinale du jus mixte

Ce test a été réalisé dans le but d'évaluer la bio-accessibilité des polyphénols et des flavonoïdes ainsi que l'activité antioxydante après chaque phase de digestion.

III.11.1. Teneur en polyphénols

La **Figure 42**, représente le dosage des polyphénols totaux obtenus en cours des différentes phases de la digestion gastro-intestinale *in vitro*.

La diminution de la biodisponibilité des composés phénoliques au cours de la digestion bucco-gastro-intestinale peut être due à l'instabilité de ces composés dans ces conditions de digestion simulées, en outre, ces molécules sont liées à des parois cellulaires végétales et sont restées massivement liées après la digestion bucco-gastro-intestinale.

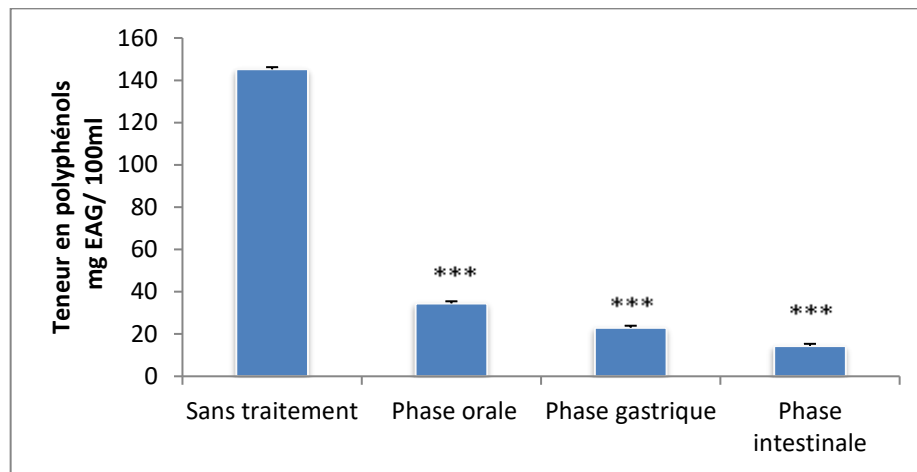


Figure 41. Teneur en polyphénols après la digestion bucco-gastro-intestinale.

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

D'après les résultats illustrés sur la **Figure 44**, nous remarquons qu'il y a une diminution de la biodisponibilité des composés phénoliques au cours du passage à travers les différents étages digestifs. La teneur en polyphénols totaux de jus mixte de concombre-moringa dans la phase orale a fortement diminué, estimée à 34.47 ± 0.04 mg EAG/100ml. Cette teneur continue à baisser lors de la phase gastrique ainsi que pour la phase intestinale, estimée à 22.92 ± 0.02 mg EAG/100ml et 14.35 ± 0.07 mg EAG/100ml respectivement. Nos résultats sont similaires à ceux de **Laib et al. (2021)**, qui ont trouvé que la digestion provoque une diminution des taux des polyphénols totaux et des flavonoïdes. Nos résultats sont également en accord avec ceux de **Liang et al. (2014)**, qui ont trouvé que la teneur en polyphénols a diminué au cours du processus de digestion.

III.11.2. Teneur en flavonoïdes

La **Figure 43**, représente le dosage des flavonoïdes totaux obtenus en cours des différentes phases de la digestion gastro-intestinale *in vitro*.

D'après l'histogramme illustré sur la **Figure 43**, nous remarquons qu'il y a une diminution de la biodisponibilité des composés flavonoïdiques au cours du passage à travers les différents étages digestifs. La teneur en flavonoïdes de jus mixte de concombre-moringa dans la phase orale a fortement diminué, estimée à 68.07 ± 0.01 µg EQ/100ml. Lors de la phase gastrique ainsi que pour la phase intestinale, nous constatons que cette teneur continue à baisser, estimée à 31.9 ± 0.14 µg EQ/100ml et 20.03 ± 0.04 µg EQ/100ml respectivement.

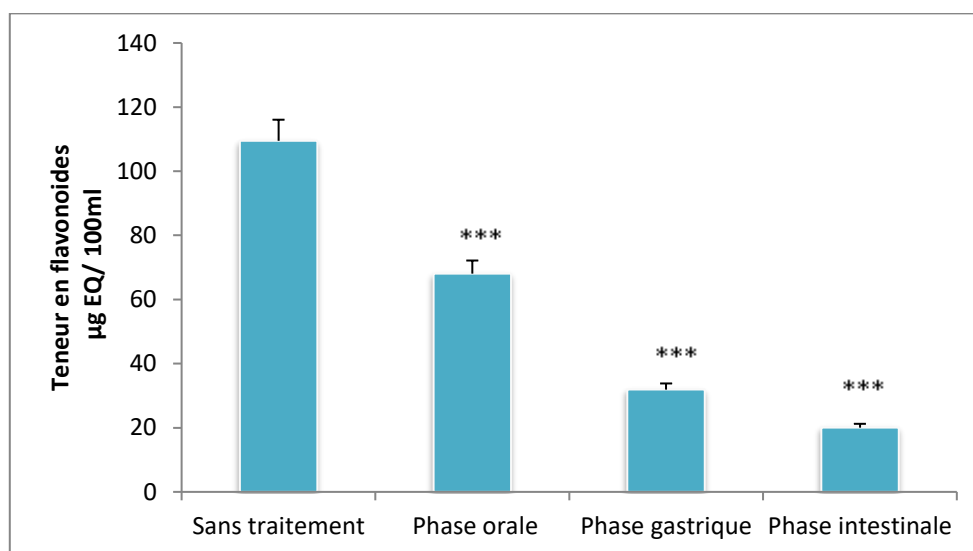


Figure 42. Teneur en flavonoïdes après la digestion bucco-gastro-intestinale.

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

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Dufour et al. (2014)** et **Page et al. (2014)**, qui ont trouvé que la teneur en flavonoïdes dans les fruits et les légumes est faible durant les différentes phases de la digestion en comparaison avec la teneur de celle-ci avant la digestion. Les résultats obtenus peuvent être justifiés par le traitement des fruits et légumes, les interactions avec les constituants des sucs gastro-intestinaux et la sensibilité des composés bioactifs aux conditions de l'environnement du tractus digestif ou à leur structure et à leur localisation dans la matrice alimentaire (**Dufour et al., 2018 ; Laib et al., 2021**). Selon **González-Sarrías et al. (2015)**, la biodisponibilité des composés phénoliques est limitée par le pH du milieu et la présence des protéines.

III.11.3. Effet de la digestion sur l'activité antioxydante de jus mixte *in vitro*

III.11.3.1. L'activité de piégeage des radicaux (DPPH)

La **Figure 44**, représente l'activité antioxydante de jus mixte après chaque phase digestive. D'après l'histogramme mentionné sur la **Figure 44**, nous remarquons une diminution graduelle de l'activité de piégeage des radicaux DPPH du jus mixte (concombre-moringa) après chaque phase de digestion.

Le pourcentage de piégeage de jus mixte au niveau de la phase orale a été estimé à $28.1 \pm 0.22\%$. Ce pourcentage a continué à baisser lors de la phase gastrique ainsi que pour la phase intestinale estimé à $20.09 \pm 0.08\%$ et $15.47 \pm 0.10\%$ respectivement.

En ce qui concerne le trolox qui est utilisé comme standard, le pouvoir de piégeage des radicaux DPPH après la phase intestinale est inférieur au pourcentage obtenu pour le jus mixte estimé à $11.66 \pm 0.02\%$.

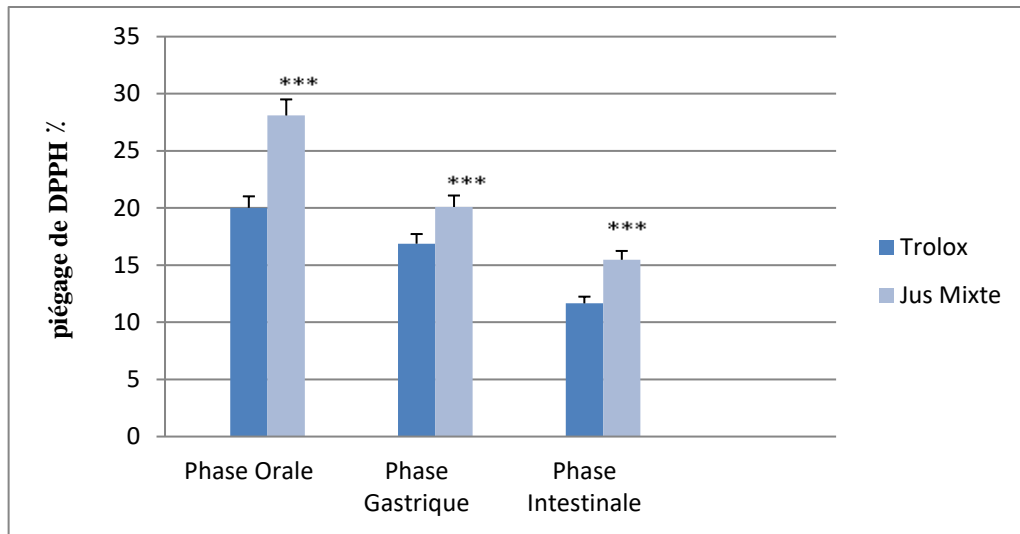


Figure 43. Pouvoir de piégeage des radicaux DPPH de jus mixte après la digestion bucco-gastro-intestinale.

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

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Liang et al. (2014)** et **Thomas-Valdés et al. (2019)**, qui ont montré que l'activité de piégeage des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) a diminué au cours du processus de digestion. Certains auteurs tels que **Liu et al. (2020)**, ont signalé que cette activité augmente après la digestion gastro-intestinale. D'autres résultats obtenus par **Laib et al. (2021)**, ont montré une diminution de l'activité antioxydante durant les deux phases de digestion (salivaire et intestinale) et une augmentation au cours de la phase gastrique. La diminution de cette activité antioxydante durant les deux phases de la digestion peut être due à l'instabilité des composés phénoliques dans les conditions de l'environnement du tractus digestif.

III.11.3.2. Pouvoir réducteur du fer

La **Figure 45**, représente le pouvoir réducteur du fer de jus mixte après le passage dans chaque étage digestif, avec des différences hautement significatives ($p < 0.001$).

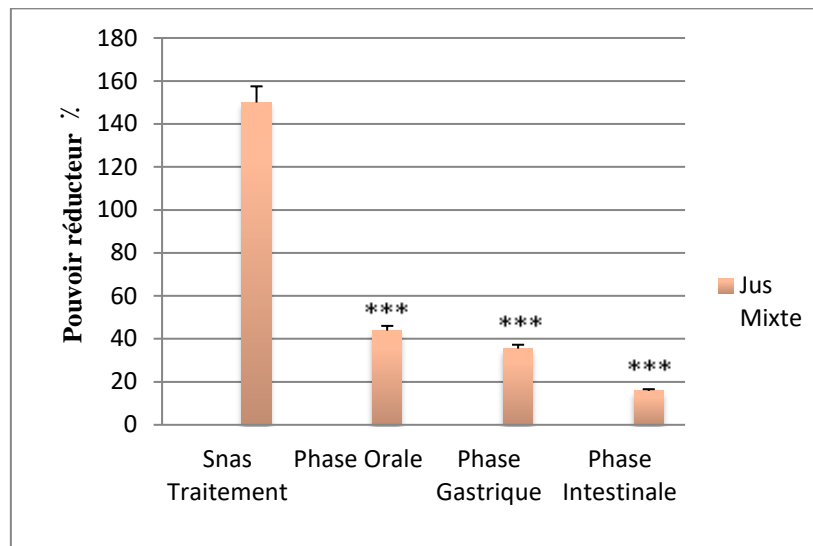


Figure 44. Pouvoir réducteur après la digestion bucco-gastro-intestinale.

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

D'après les résultats illustrés sur la **figure 45**, une chute brutale de l'activité réductrice de fer de jus mixte lors de la digestion a été observée. Le pouvoir réducteur du fer de jus mixte diminue durant la phase orale estimé à $43.85 \pm 0.02 \mu\text{g EAA/ml}$. Cette valeur continue à baisser durant la phase gastrique ainsi que pour la phase intestinale estimée à $35.49 \pm 0.04 \mu\text{g EAA/ml}$ et $15.80 \pm 0.008 \mu\text{g EAA/ml}$ respectivement.

Les résultats d'une étude menée par **Shu et al. (2019)**, ont montré une diminution du pouvoir réducteur du fer lors de la digestion gastrique environ de 14.02-21.03% après digestion intestinale. Selon **Scrob et al. (2019)**, le pouvoir réducteur et anti-radicalaire des fruits est étroitement lié aux variations quantitatives et qualitatives en composés phénoliques. En outre, après la digestion gastro-intestinale *in vitro*, des changements dans le contenu des composés phénoliques individuels, dus à des pertes ou à des changements dans les formes structurales, causés par des réactions dans le milieu gastro-intestinal lui-même ou dus au métabolisme du microbiote (**Andrade et al., 2022**).

III.12. Digestion *in vitro* en combinant « bactéries/ jus »

III.12.1. Aptitudes probiotiques de *L. plantarum* mixte dans la matrice végétale

III.12.1.1. Survie et viabilité de *L. plantarum* mixte

Les résultats de la viabilité des souches étudiées en combinaison avec le jus mixte de concombre-moringa après chaque phase de digestion sont groupés dans la **Figure 46**.

La viabilité est améliorée en présence de jus mixte par rapport à la culture seule au cours de la

digestion. Il apparaît que la survie en présence du jus fermenté est meilleure à celle en présence de jus non fermenté. En phase intestinale, le nombre de population cellulaire est de 9.67 log UFC /ml et de 7.93 log UFC/ ml pour le jus fermenté ; alors qu'un nombre de cellules de 9.57 log UFC/ml est obtenu avec le mixte non fermenté et 7.41 log UFC/ml dans l'ordre de *L. plantarum* mixte libre et *L. plantarum* mixte encapsulée respectivement.

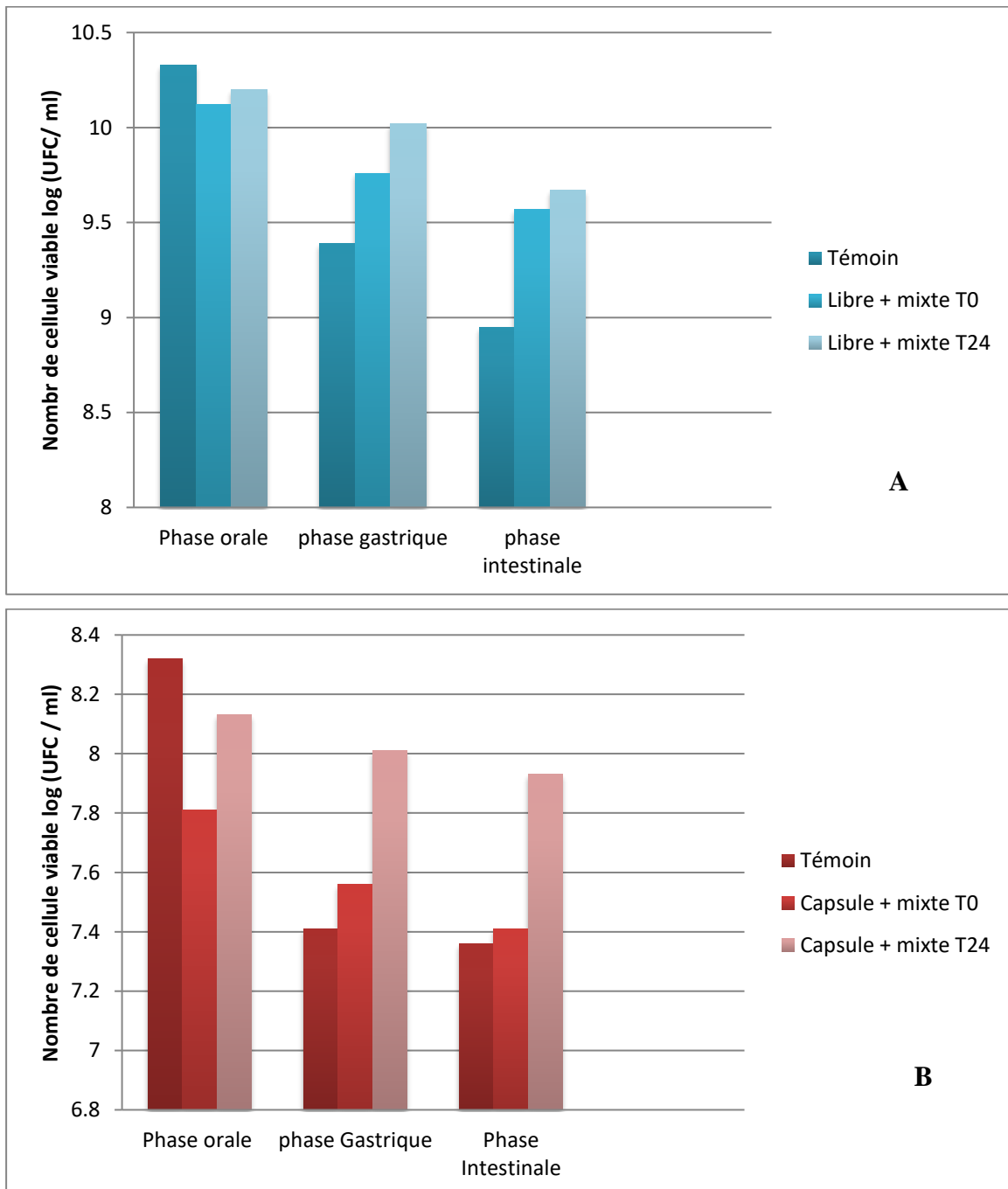


Figure 45. Nombre de cellules viables de *L. plantarum* mixte combinée avec le jus mixte après la digestion.

(^A) : *L. plantarum* libre ; (^B) : *L. plantarum* encapsulée.

En général, il est évident que la micro-encapsulation a augmenté, dans une large mesure, le taux de survie des bactéries dans le liquide gastrique simulé ; la réduction de la viabilité des bactéries libres était significativement plus importante que celle des bactéries micro-encapsulées pour tous les temps d'exposition testés. La couche intermédiaire de la microcapsule composée d'alginate, qui est une couche résistante aux acides, est spécifiquement l'acteur clé dans la capacité de la conception de la microcapsule à résister au faible pH du liquide gastrique simulé. Les résultats de cette partie de l'étude constituent la base de la preuve du concept de la tolérance de la structure des microcapsules à l'acidité de l'estomac après la consommation et la libération des microcapsules (Penhasi *et al.*, 2021).

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).

III.12.1.2. Résistance au pH gastrique

Les souches mixtes 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 (jus mixte). Comme il est montré sur la **Figure 47**, la survie et la viabilité des souches de *L. plantarum* véhiculées par la matrice végétale (jus mixte) 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 mixte fermenté où la survie est de 87.55 ± 0.07 %, 79.59 ± 0.09 % et 68.45 ± 0.04 % aux pH4, pH 3 et pH2 pour *L. plantarum* mixte encapsulée et de 79.32 ± 0.06 %, 73.41 ± 0.09 % et 60.01 ± 0.02 % pour *L. plantarum* mixte libre. Cependant, avec le mixte non fermenté, la viabilité était de 82.71 ± 0.02 %, 78.10 ± 0.08 % et 59.54 ± 0.01 % pour *L. plantarum* mixte encapsulée. En revanche, des valeurs aux pH4, pH3 et pH2 pour *L. plantarum* mixte libre et de 59.81 ± 0.13 %, 49.76 ± 0.08 % et 40.99 ± 0.01 %.

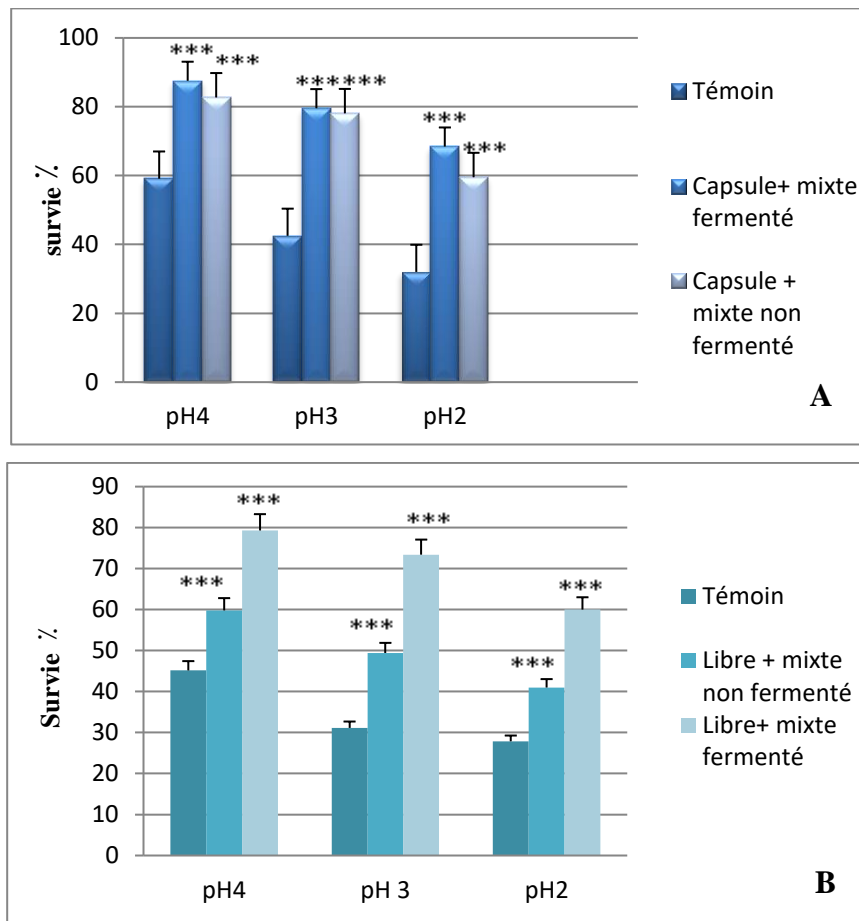


Figure 46. Survie aux bas pH des souches de *L. plantarum* après la digestion (phase intestinale).

(A) : *L. plantarum* mixte encapsulée (B) : *L. plantarum* mixte libre.

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

Ces résultats indiquent que la matrice végétale utilisée était capable de protéger et de maintenir les cellules potentielles probiotiques viables pendant leur passage dans le tractus-gastro-intestinale. En outre, les composants des matrices alimentaires peuvent avoir des effets protecteurs sur les micro-organismes, contribuant ainsi à leur survie dans les conditions du tractus-gastro-intestinale (Arioli *et al.*, 2018).

Donc, nos résultats soutiennent l'idée que l'incorporation des probiotiques (*L. plantarum* mixte) avec des matrices alimentaires (végétales) pouvait représenter une stratégie pour promouvoir la tolérance à l'acidité au cours du processus de digestion.

III.12.1.3. Résistance aux sels biliaires

Les résultats de la résistance de *L. plantarum* mixte libres et encapsulées aux sels biliaires véhiculés par une matrice végétale après la digestion sont présentés à la **Figure 48**.

D'après l'histogramme, une augmentation significative du pourcentage de survie des souches étudiées a été observée après 4h d'exposition à 0.3% de sels biliaires par rapport au témoin. Il est clair que la culture associée au mixte fermenté a un meilleur taux de survie que la culture associée à le mixte non fermenté. Le pourcentage de survie de *L. plantarum* encapsulée délivrée par le mixte fermenté est d'environ 78.54 ± 0.06 %, alors que dans le cas de *L. plantarum* libre, il est de 72.77 ± 0.02 %. De plus, les taux de survie du mixte non fermenté étaient de 69.25 ± 0.008 % pour la souche mixte encapsulée et 57.14 ± 0.01 % pour la souche mixte libre. Ces résultats sont proches de ceux trouvés par **Xia et al. (2021)**, qui ont montré que *L. plantarum* ATCC 8014 possède une excellente résistance aux conditions du liquide intestinal *in vitro* en présence de la matrice végétale.

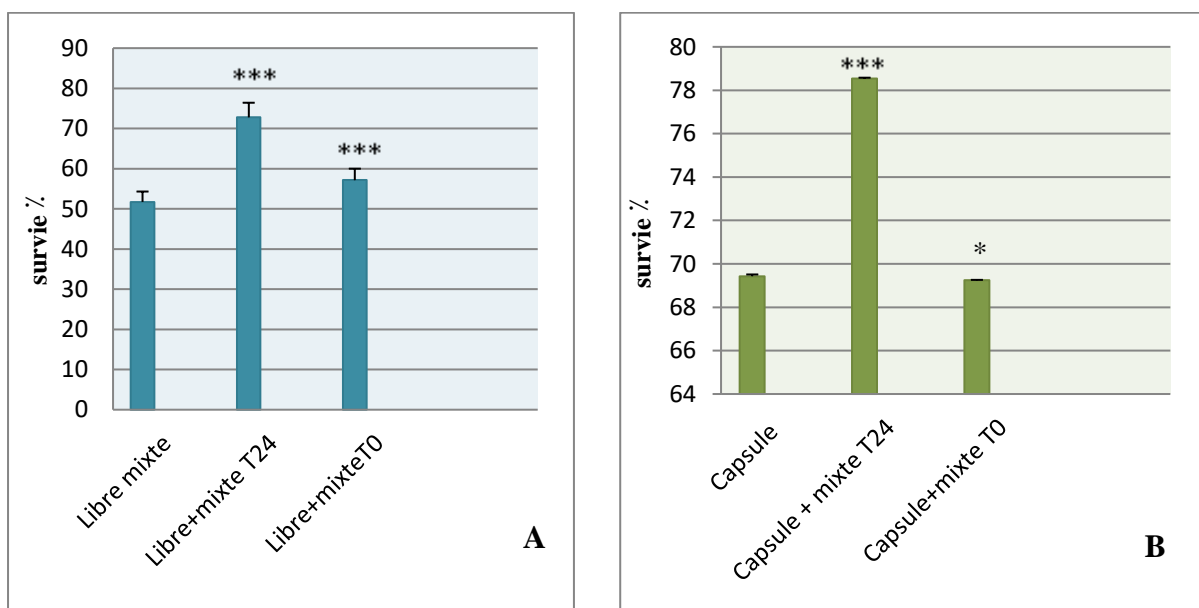


Figure 47. Survie en présence de 0.3% de sels biliaires de *L. plantarum* mixte combinée aux matrices après la digestion (phase intestinale).

(A) : *L. plantarum* mixte libre, (B) : *L. plantarum* mixte encapsulée.

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

* : Différences significatives ($p < 0.05$).

En outre, l'encapsulation était capable de protéger les cellules durant l'exposition aux conditions gastro-intestinales (pH, enzymes) contrairement aux cellules libres. **Ouled-Haddar et al. (2016)**, ont montré que l'encapsulation était capable de protéger *L. plantarum* dans les conditions gastro-intestinales.

III.12.1.4. Hydrophobicité

Les résultats de l'hydrophobicité des souches en présence des matrices végétales (jus mixte de concombre-moringa) sont représentés dans la **Figure 49**.

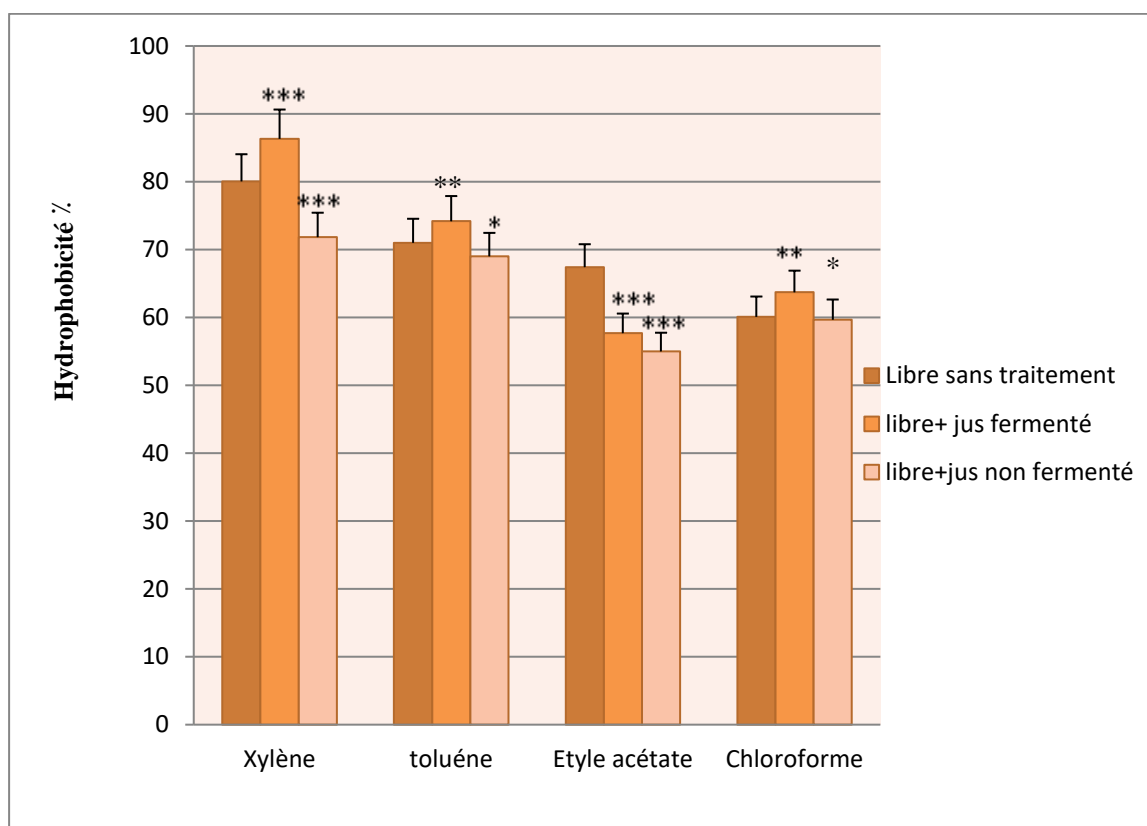


Figure 48. Pourcentage d'hydrophobicité intestinale des *L. plantarum* mixtes libres.

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

** : Différences très significatives ($p < 0.01$). * : Différences significatives ($p < 0.05$).

D'après les résultats obtenus, l'hydrophobicité est relativement variables d'un solvant à l'autre. L'hydrophobicité des souches varie entre $37.66 \pm 0.12\%$ et $86.32 \pm 0.04\%$. Cependant, une forte affinité pour le xylène avec un pourcentage de $86.32 \pm 0.08\%$, $71.84 \pm 0.09\%$ a été obtenue avec la mixture *L. plantarum* libres véhiculée avec le mixte fermenté et non fermenté respectivement. Ces résultats pouvant être comparés à ceux des différents travaux réalisés dans le même contexte, principalement celui de **Divyashree et al. (2021)** qui ont évalué certains isolats de *Lactiplantibacillus* pour leur capacité à se lier aux différents solvants organiques dont les résultats publiés ont montré un pourcentage entre 60% et 80 %.

III.12.1.5. Capacité d'auto-agrégation

La capacité d'auto-agrégation des souches en présence des matrices végétales est illustrée dans la **Figure 50**. 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 les souches mixtes libres sont combinées avec le mixte fermenté ou non avec un pourcentage de $86.02 \pm 0.01\%$ et $82.26 \pm 0.008\%$ respectivement.

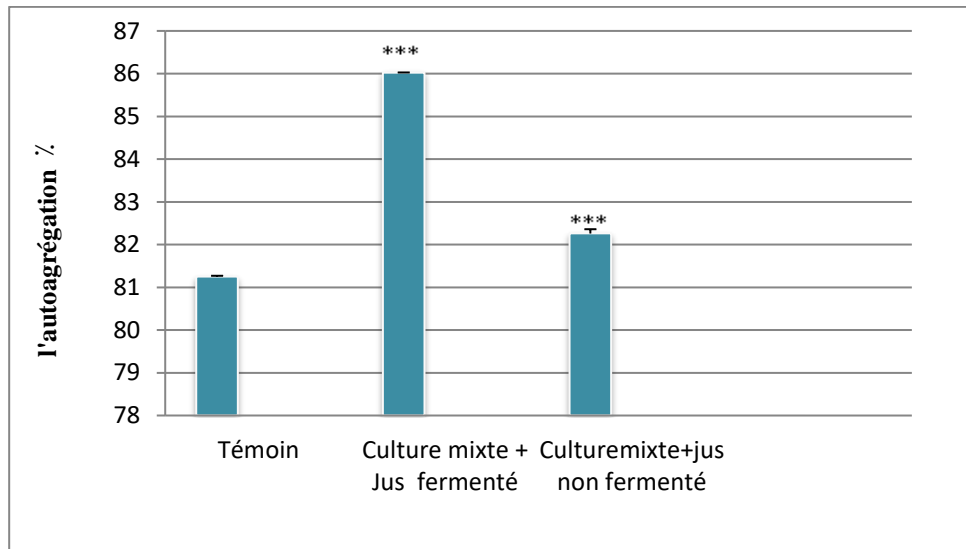


Figure 49. Capacité d'auto-agrégation de *L. plantarum* mixte en présence de matrice végétale (niveau intestinal).

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

Nos résultats sont cohérents avec les conclusions de **Parker et al. (2008)**, qui ont démontré que les polyphénols à des concentrations comprises entre 30 et 100 $\mu\text{g/ml}$ peuvent améliorer la capacité d'auto-agrégation des probiotiques, augmentant ainsi leur adhésion au niveau intestinal. Cependant, selon ces auteurs, le mécanisme par lequel les polyphénols influencent l'adhésion des cellules intestinales n'est pas entièrement compris.

III.12.1.6. Capacité de la co-agrégation

D'après les résultats illustrés dans la **Figure 51**, les souches étudiées (*L. plantarum* mixtes libres) présentent une augmentation de la capacité de co-agrégation lorsqu'elles sont véhiculées par la matrice végétale.

En effet, les résultats de cette capacité des souches véhiculées avec le mixte fermenté sont meilleurs que ceux obtenus avec le mixte non fermenté. Le pourcentage de co-agrégation le plus élevée pour *L. plantarum* mixte véhiculée avec le mixte fermenté est celui obtenu avec

E. coli ($62.41 \pm 0.03\%$), suivie par *P. aeruginosa* ($54.22 \pm 0.04\%$) et *S. aureus* ($44.87 \pm 0.12\%$). Ainsi, pour le mixte non fermenté, le pourcentage variait entre $57.88 \pm 0.01\%$, $50.61 \pm 0.04\%$ et $40.09 \pm 0.04\%$ respectivement.

Nos résultats sont cohérents avec ceux de nombreuses études montrant que la présence de substrats végétaux améliore significativement la capacité de co-agrégation des espèces de *Lactiplantibacillus*, notamment, *Limosilactobacillus reuteri* et *L. acidophilus* et donc la formation d'une barrière de défense qui empêchent la colonisation des agents pathogènes (Aravind et al., 2021).

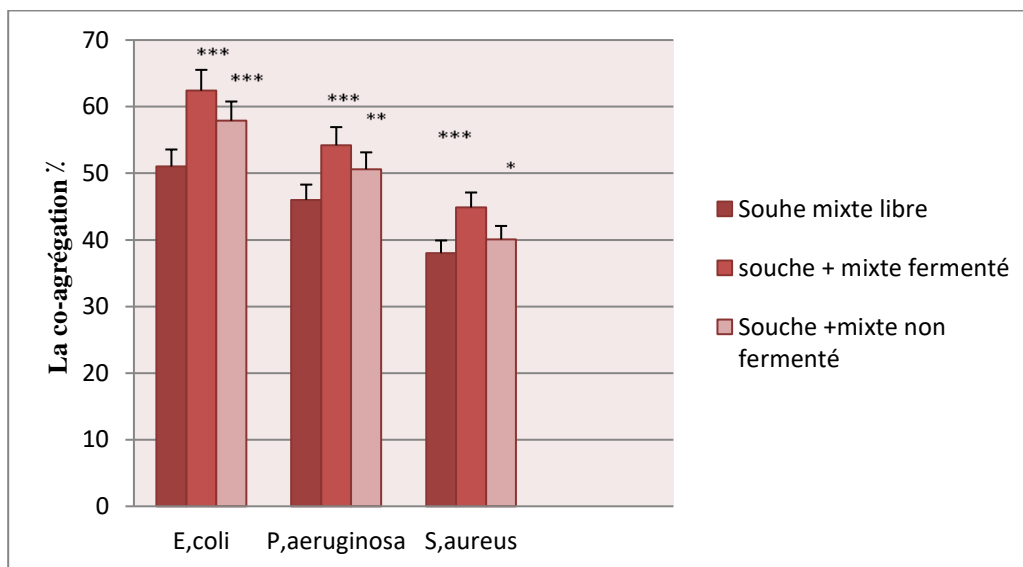


Figure 50. Pourcentage de la co-agrégation de *L. plantarum* mixte libre après la digestion intestinale.

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

* : Différences significatives ($p < 0.05$).

III.12.2. Activité antioxydante des souches de *L. plantarum* en combinaison avec la matrice végétale

III.12.2.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène

Les résultats de la capacité de *L. plantarum* mixte libres et encapsulées en présence de jus mixte à résister au peroxyde d'hydrogène après la digestion bucco-gastro-intestinale (phase intestinale) sont regroupés dans la **figure 52**.

D'après l'histogramme mentionné sur la **Figure 52**, la survie des souches mixtes combinées au mixte (jus fermenté) lors l'exposition à 0.4mM et 0.7mM d' H_2O_2 est estimée à $80.01 \pm 0.38\%$ et $67.84 \pm 0.12\%$ pour les souches mixtes encapsulées et à $71.42 \pm 0.53\%$,

53.87±0.21% pour les souches mixtes libres. Pour les souches exposées à 1mM d'H₂O₂, le taux de survie trouvé était de 46.87±0.34% et 40.03±0.03% respectivement. Ces résultats montrent qu'il y a une amélioration de la résistance des souches mixtes combinées au jus mixte de concombre-moringa aux différentes concentrations d'H₂O₂ après digestion bucco-gastro-intestinale.

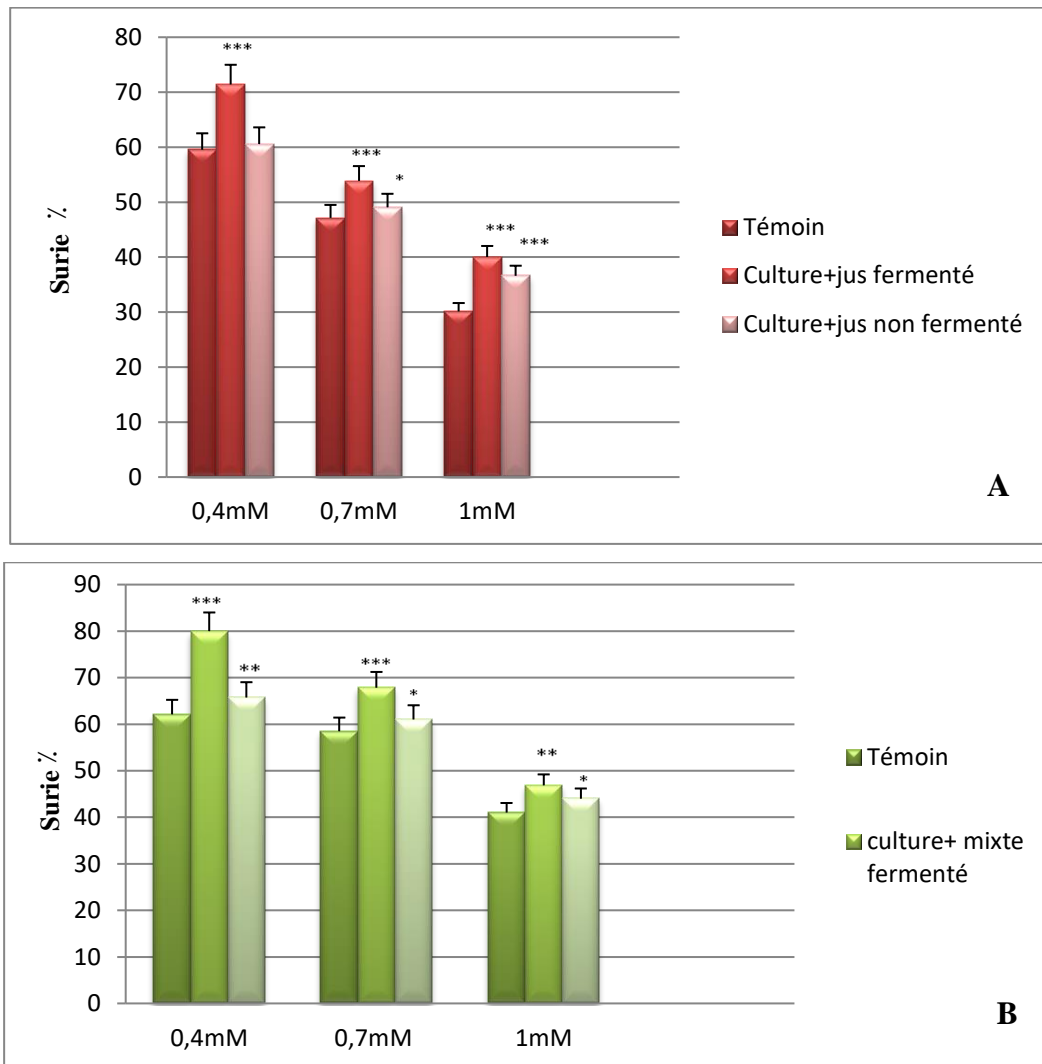


Figure 51. Capacité de *L. plantarum* mixte à résister au peroxyde d'hydrogène au niveau intestinale.

(A) : *L. plantarum* mixte libre ; (B) : *L. plantarum* mixte encapsulée.

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

** : Différences très significatives ($p < 0.01$). * : Différences significatives ($p < 0.05$).

III.12.2.2. Activité de piégeage de radical (DPPH)

L'activité anti-radicalaire des souches probiotiques étudiées en présence de jus mixte est illustrée dans la **Figure 53**. Les différences sont hautement significatives ($p < 0.001$).

D'après les résultats obtenus, nous constatons que la capacité de piégeage des radicaux libres

de DPPH par les deux souches mixtes a diminué en présence de la matrice végétale, par rapport au témoin. Aussi une diminution de la capacité de piégeage au cours du passage de transit digestive.

Selon **Rios-Corripio et Guerrero-Beltran (2019)**, l'activité antioxydante a diminué après le processus de fermentation. Cette réduction peut être due aux réactions d'oxydation qui se produisent pendant la fermentation. Les composés présents dans les substrats peuvent réagir entre eux et s'oxydent, diminuant ainsi l'activité antioxydante. De plus, les *Lactiplantibacillus* peuvent inhiber l'activité de certains composés phénoliques, en modifiant ou dégradant ces molécules. Aussi, elles peuvent dissocier le complexe polyphénol-substrat (**Piekarska-Radzik et Klewicka, 2021**), ce qui peut expliquer la faible activité antioxydante.

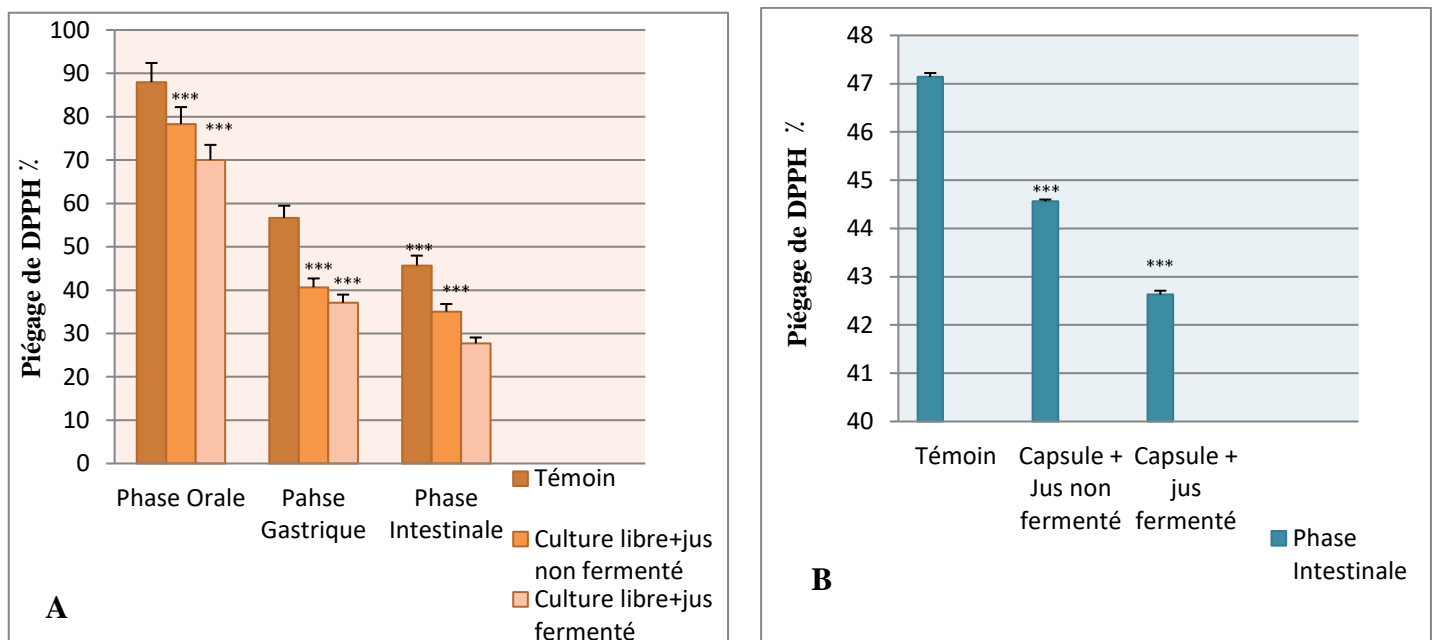


Figure 52. Piégeage de radicaux DPPH par *L. plantarum* mixte combinée avec la matrice végétale lors de la digestion.

(^A) : *L. plantarum* mixte libre, (^B) : *L. plantarum* mixte encapsulée.

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

III.12.2.3. Pouvoir réducteur du fer

Les résultats de l'évolution du pouvoir réducteur des souches mixtes libres et encapsulées de *L. plantarum* en présence d'une matrice végétale (jus mixte de concombre-moringa) sont illustrés sur la **Figure 54**.

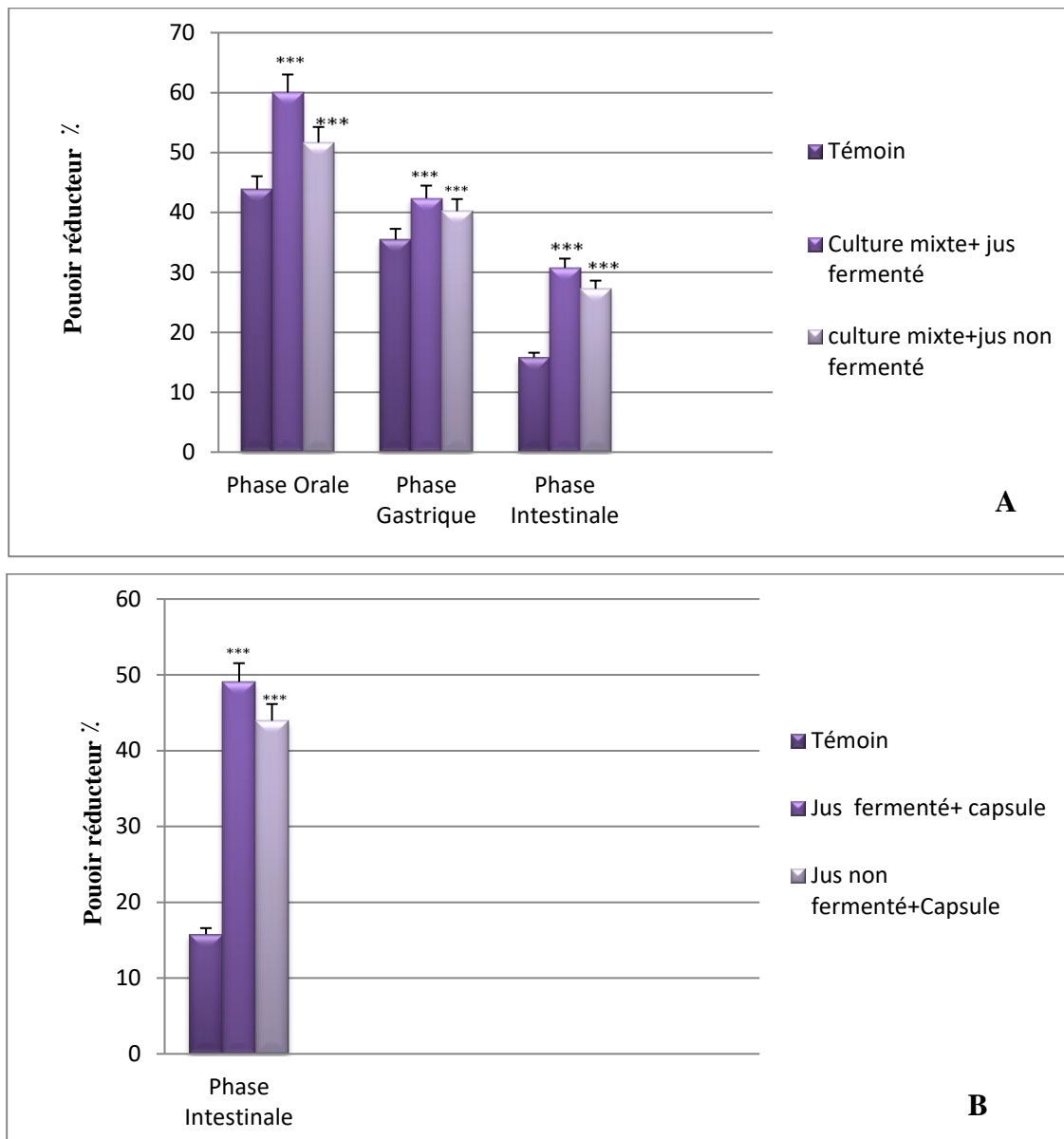


Figure 53. Pouvoir réducteur des souches mixtes libres et encapsulées véhiculées par la matrice végétale après digestion bucco-gastro- intestinale.

^(A) : *L. plantarum* mixtes libres, ^(B) : *L. plantarum* mixtes encapsulées.

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

D’après les résultats obtenus, nous remarquons que la valeur la plus élevée du pouvoir réducteur est de $60.02 \pm 0.12 \mu\text{g EAA/ml}$ et la plus basse est de $27.26 \pm 0.08 \mu\text{g EAA/ml}$ pour les souches mixtes libres. Pour celles encapsulées, la valeur la plus élevée était de $49.08 \pm 0.01 \mu\text{g EAA/ml}$ pour le mixte fermenté et de $43.95 \pm 0.06 \mu\text{g EAA/ml}$ pour le mixte non fermenté. Ces résultats montrent une augmentation de la capacité du pouvoir réducteur des deux souches mixtes étudiés en présence du jus mixte de concombre-moringa par rapport au témoin (jus mixte à t_0). D’autre part, nous remarquons que le jus mixte fermenté par les souches mixtes

encapsulées à un pouvoir réducteur plus important par rapport au jus mixte non fermenté lors de la phase intestinale, et aussi par rapport à celui des souches mixtes libres. *L. plantarum* mixte a été cultivé avec succès sur le jus mixte de concombre-moringa et a amélioré l'activité antioxydante.

L'augmentation de l'activité antioxydante est due à l'élimination des substances phytochimiques des tissus et à l'hydrolyse des protéines en peptides bioactifs. Cette augmentation a montré les avantages prometteurs pour la santé du jus fermenté par rapport à celui du jus non fermenté (Muhialdin *et al.*, 2020). Par ailleurs, les différences dans les activités antioxydantes pourraient être les résultats de l'impact de la fermentation sur les profils phénoliques et la contribution de chaque composé polyphénolique aux activités antioxydantes (Kwaw *et al.*, 2018).

III.13. Biodisponibilité des polyphénols et flavonoïdes après la combinaison des souches mixtes libres et encapsulées de *L. plantarum* avec la matrice végétale lors de la digestion

Les dosages des composés phénoliques et flavonoidiques après les différentes phases de la digestion lors de la combinaison de jus mixte fermenté avec des souches mixtes de *L. plantarum* libres et encapsulées par rapport au jus mixte non fermenté sont présentés dans les Figures 55 et 56. Ou l'analyse statistique a révélé des différences hautement significatives ($p < 0.001$).

Nous remarquons une forte diminution de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes de jus mixte fermenté par les souches mixtes de *L. plantarum* libres et encapsulées comparativement à celle obtenue lors des dosages après digestion de jus mixte seule, cette diminution peut être due à la dégradation des composés phénoliques et flavonoidiques par les souches mixtes libres et encapsulées. Nos résultats sont cohérents et 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 probiotiques et que l'incubation de composés phénoliques avec *L. paracasei* LMG P-22043 aide à maintenir leur viabilité.

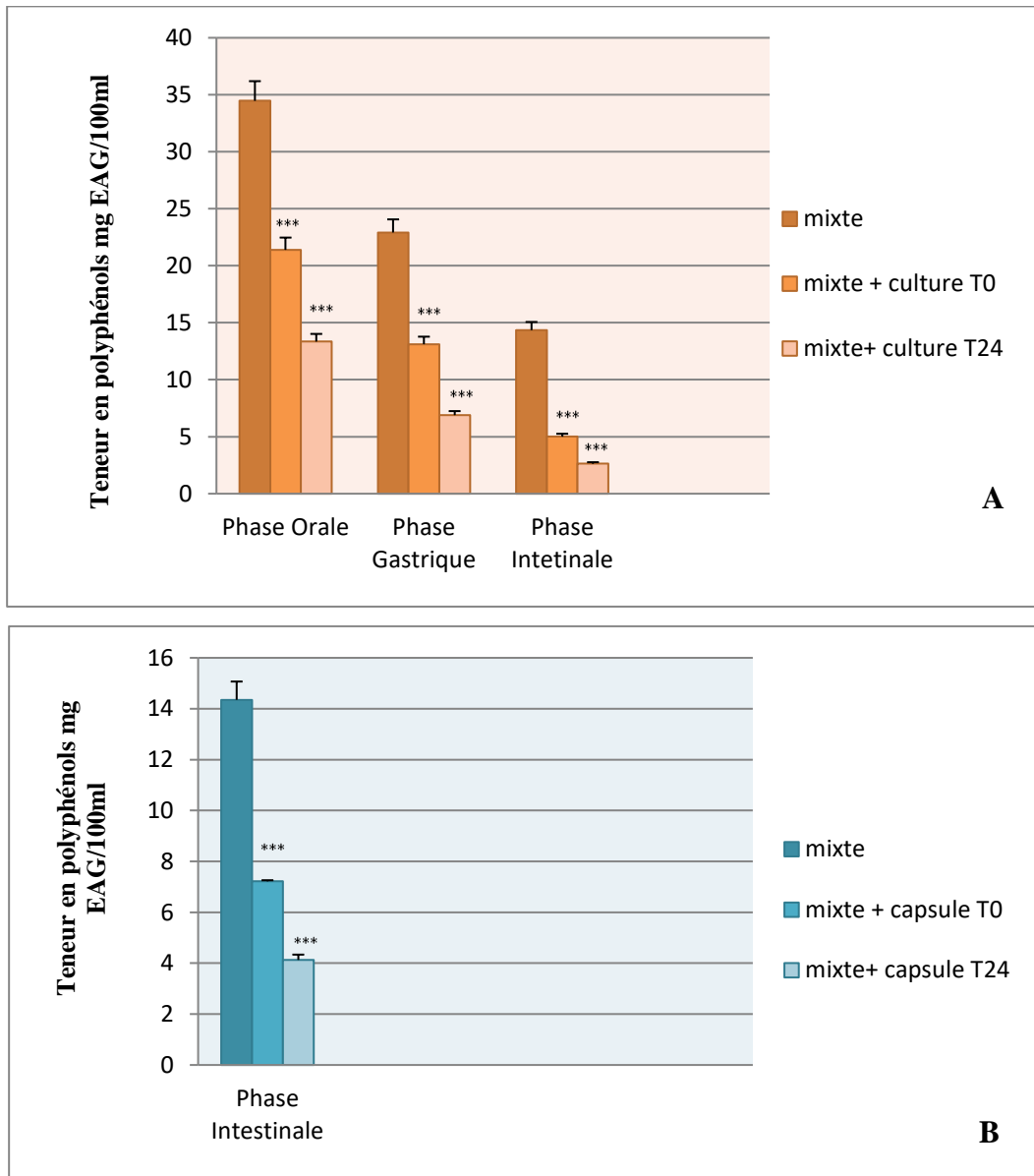


Figure 54. Effet de la digestion *in vitro* sur la teneur en polyphénols en présence de *L. plantarum* mixte.

^(A) : *L. plantarum* mixte libre, ^(B) : *L. plantarum* mixte encapsulée.

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

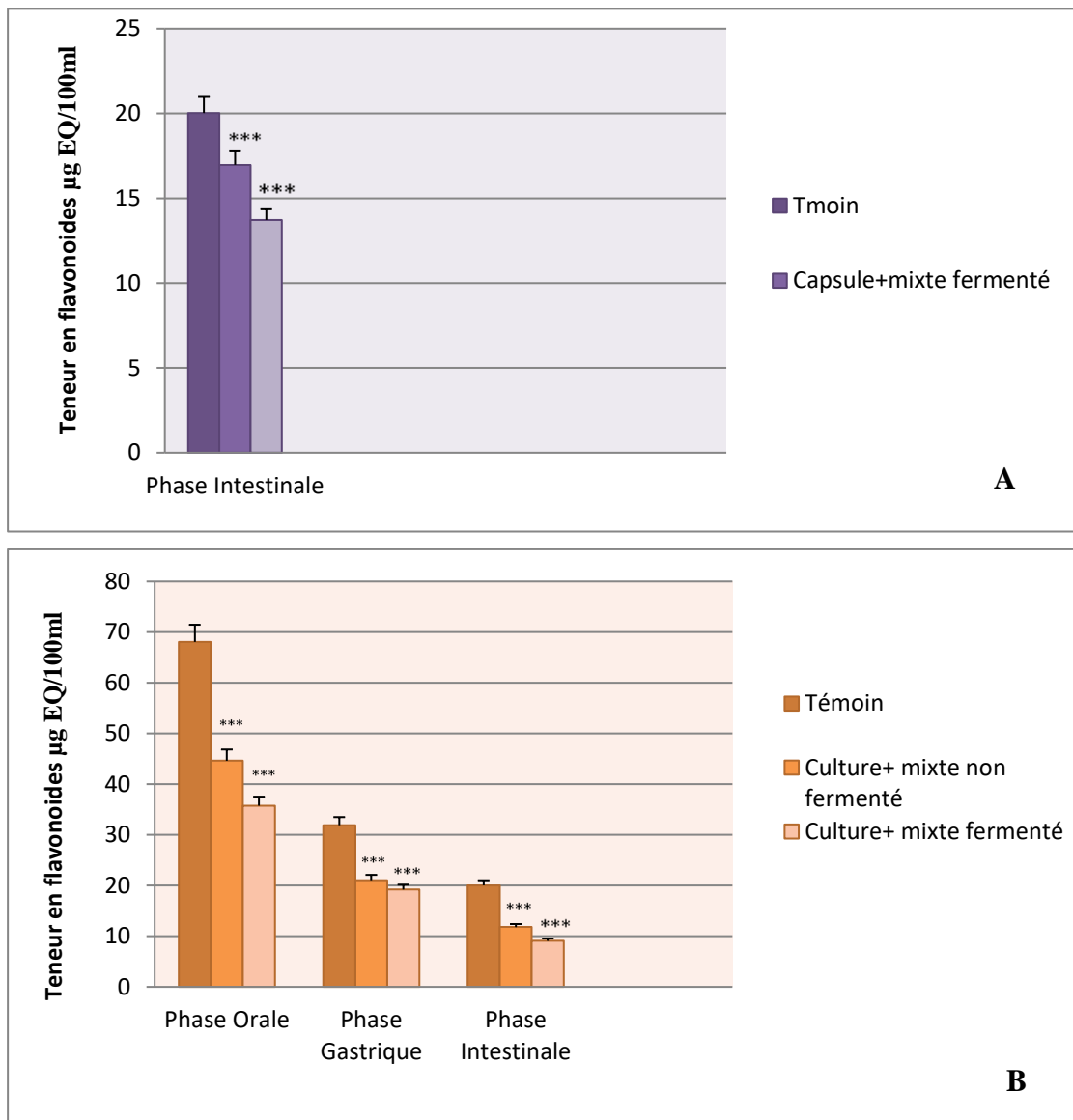


Figure 55. Effet de la digestion *in vitro* sur la teneur en flavonoïdes en présence de *L. plantarum* mixte.

(A): *L. plantarum* mixte encapsulée, (B) : *L. plantarum* mixte libre.

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

Le microbiote intestinal transforme les polyphénols complexes en composés de faible poids moléculaire, qui sont plus faciles à absorber que les molécules non bio-transformées. En outre, les polyphénols peuvent également avoir des effets similaires aux probiotiques, capables de conférer des avantages pour la santé, en modulant la croissance des bactéries bénéfiques telles que *Bifidobacterium* et *Lactiplantibacillus* (Andrade et al., 2022).

III.14. Evaluation de l'activité anti inflammatoire de jus mixte combiné aux probiotiques lors de la digestion

D'après les résultats illustrés dans la figure ci-dessous (Figure 57), il est remarquable qu'il y a une diminution de l'activité inflammatoire de nos échantillons (jus mixte) en présence de

probiotiques après la digestion buco-gastro-intestinale comparativement à celle de témoin.

Au niveau de l'étage intestinal, l'activité anti-inflammatoire du jus fermenté combiné aux souches mixtes encapsulées est la meilleure ($59.30 \pm 0.04\%$), suivie par celle combinée aux souches libres ($54.56 \pm 0.06\%$), pour le jus non fermenté le pourcentage est estimé à $43.56 \pm 0.008\%$ et à $39.45 \pm 0.02\%$ pour celui combinée la culture mixte encapsulée et aux souches libres respectivement.

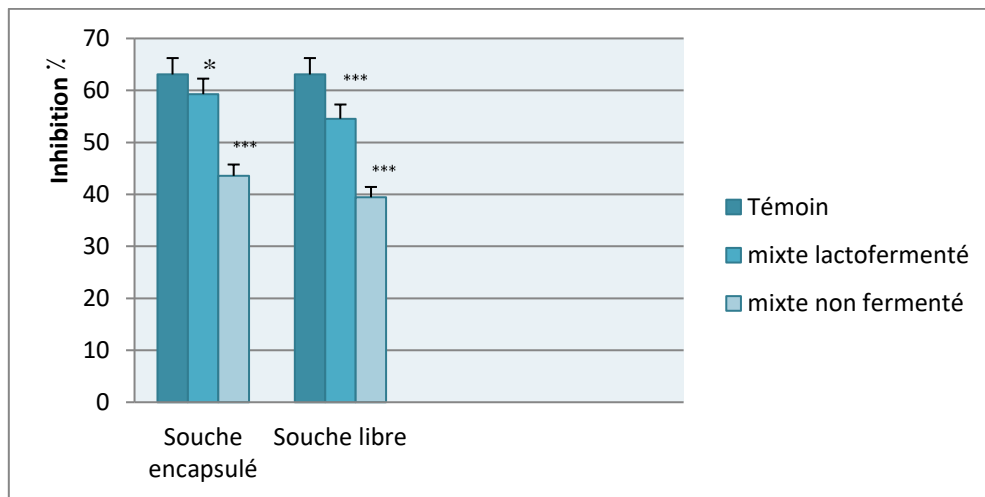


Figure 56. Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des globules rouges traitées par le jus mixte combinée avec *L. plantarum* mixte.

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

* : Différences significatives ($p < 0.05$).

Des études ont rapporté que certains probiotiques présentent une activité immuno-modulatrices qui affectent directement l'expression des cytokines, tandis que d'autres affectent la perméabilité intestinale en réduisant l'inflammation et en protégeant l'intégrité de la barrière intestinale (**Khanna et al., 2020**).

Dans l'étude de **Khanna et al. (2020)**, *L. plantarum* a présenté un effet anti-inflammatoire par son effet inhibiteur sur les cytokines pro inflammatoires. De plus, dans l'étude de **Han et al. (2020)**, *L. plantarum* KU15149 a un effet anti-inflammatoire par l'inhibition de la production d'oxyde nitrique.

Conclusion

L'encapsulation et les matrices végétales constituent un excellent moyen de protection et de véhicule de souches probiotiques. Les deux combinés ont ouvert des voies de recherche dans le domaine de l'agroalimentaire, de compléments alimentaires et d'autres possibilités d'investigation dans le domaine de la nutrition humaine et animale.

Les résultats des différentes parties de cette étude ont montré que *Lactiplantibacillus plantarum* mixte « BCX1 et S10 » libre et encapsulée pouvaient résister aux conditions digestives.

Cette combinaison des souches a montré une tolérance remarquable aux conditions hostiles. Cependant, la micro encapsulation par l'alginate de sodium a contribué fortement à l'amélioration du taux de survie de *L. plantarum* mixte, par la protection contre les activités enzymatiques, les bas pH, les sels biliaries et la pancréatine.

De même, nos bactéries ont la particularité de co-agréger avec des souches pathogènes, de s'auto-agréger et d'adhérer aux cellules épithéliales. En outre, nos souches ont montré une bonne résistance au peroxyde d'hydrogène, une capacité de piégeage des radicaux hydroxyles et des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPH).

Les résultats ont confirmé que les substrats végétaux, représentés par le mixte concombre-moringa ont amélioré le taux de survie des souches testées.

La combinaison d'extrait bactérien et de jus et leur passage à travers le liquide simulant la digestion gastro-intestinale buccale a montré une bonne survie avec une perte de composés phénoliques d'un étage digestif à l'autre, ce qui peut confirmer que probablement les bactéries utilisent des polyphénols et des flavonoïdes comme stimulateurs de croissance.

Enfin, l'utilisation de cette combinaison de bactéries dans une industrie de jus (cas Concombre-moringa) a amélioré le statut probiotique et sa capacité antioxydante.

Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour la continuité du travail, et nous suggérons :

- Evaluation *in vivo* de la survie et de la viabilité des souches libres et encapsulées ;
- Evaluation *in vivo* de ses propriétés antioxydantes ;
- Développer des aliments fonctionnels tels que les jus fermentés aux probiotiques pour lutter contre les maladies causées par le stress.

Références bibliographiques

A

- Ademiluyi, A. O., Aladeselu, O. H., Oboh, G., Boligon, A. A. (2018). Drying alters the phenolic constituents, antioxidant properties, α -amylase, and α -glucosidase inhibitory properties of *Moringa* (*Moringa oleifera*) leaf. *Food Science and Nutrition*, **6(8)**, 2123-2133.
- Adilah, R. N., Chiu, S. T., Hu, S. Y., Ballantyne, R., Happy, N., Cheng, A. C., Liu, C. H. (2022). Improvement in the probiotic efficacy of *Bacillus subtilis* E20-stimulates growth and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* via encapsulation in alginate and coated with chitosan. *Fish Shellfish Immunology*, **125**, 74-83.
- Adriouch, S., Kesse-Guyot, E., Hercberg, 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.
- Adwas, A. A., Elsayed, A. S. I., Azab, A.E., Quwaydi, F.A. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, **6(1)**, 43-47.
- Aftab, A., Ali, S. W., Shakir, M., Ayub, S. R. (2016). Development and organoleptic evaluation of *Moringa-Aloe vera* blended nutraceutical drink. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, **17**, 72-76.
- Aidoo, D. B., Konja, D., Henneh, I. T., Ekor, M. (2021). Protective effect of bergapten against human erythrocyte hemolysis and protein denaturation *in vitro*. *International Journal of Inflammation*, **1**, 1-7.
- 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.
- Allain, T., Chaouch, S., Thomas, M *et al.* (2018). Bile-salt-hydrolases from the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* La1 mediate anti-giardial activity *in vitro* and *in vivo*. *Frontier Microbiology*, **8**, 2707.
- 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.
- Anal, A. K., Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science Technology*, **18(5)**, 240-251.
- 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.

Andrade, J. K. S., Barros, R. G. C., Gualberto, N. C., de Oliveira, C. S., Shanmugam, S., Narain, N. (2022). Influence of in vitro gastrointestinal digestion and probiotic fermentation on the bioaccessibility of gallic acid and on the antioxidant potential of Brazilian fruit residues. *LWT*, **153**, 112436.

AOAC. (2000). Official Methods of Analysis. 17th Ed. Maryland, U.S.A. 360.

Aravind, S. M., Wichienchot, S., Tsao, R., Ramakrishnan, S., Chakkaravarthi, S. (2021). Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. *Food Research International*, **142**, 110189.

Arioli, S., Koirala, R., Taverniti, V., Fiore, W., Guglielmetti, S. (2018). Quantitative recovery of viable *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 (*L. casei* DG®) after gastrointestinal passage in healthy adults. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 1720.

Ashaolu, T. J. (2020). Immune boosting functional foods and their mechanisms: a critical evaluation of probiotics and prebiotics. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **130**, 110625.

Aspri, M., Papademas, P., Tsalts, D. (2020). Review on non-dairy probiotics and their use in non-dairy based products. *Fermentation*, **6(1)**, 30.

Ayyash, M. M., Abdalla, A. K., AlKalbani, N. S., Baig, M. A., Turner, M. S., Liu, S. Q., Shah, N. P. (2021). *Invited review*: Characterization of new probiotics from dairy and nondairy products—Insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability. *Journal of Dairy Science*, **104(8)**, 8363-8379.

B

Babajide, J. M., Olaluwoye, A. A., Taofik Shittu, T. A., Adebisi, M. A. (2013). Physicochemical Properties and Phytochemical Components of Spiced Cucumber-Pineapple Fruit Drink. *Nigerian Food Journal*, **30**, 40-52.

Baral, K. C., Bajracharya, R., Lee, S. H., Han, H. K. (2021). Advancements in the pharmaceutical applications of probiotics: Dosage forms and formulation technology. *International Journal of Nanomedicine*, **16**, 7535.

Benhamada, N., 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.

Bhukya, J., Naik, R., Mohapatra, D., Sinha, L. K., Rao, K. V. R. (2021). Orifice based hydrodynamic cavitation of sugarcane juice: Changes in Physico-chemical parameters and Microbiological load. *LWT*, **150**, 111909.

Boricha, A. A., Shekh, S. L., Pithva, S. P., Ambalam, P. S., Vyas, B. R. M. (2019). *In vitro* evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* species of food and human origin. *LWT*, **106**, 201-208.

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.

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.

Bron, P.A., Kleerebezem, M., Brummer, R et al. (2017). Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *British Journal Nutrition*, **117**, 93–107.

Buatong, A., Meidong, R., Trongpanich, Y., Tongpim, S. (2022). Production of plant-based fermented beverages possessing functional ingredients antioxidant, γ -aminobutyric acid and antimicrobials using a probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strain L42g as an efficient starter culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1-7.

Butel, M. J. (2014). Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *Journal des Anti-Infectieux*, **16(2)**, 33-43.

C

Cai, Y., Zhang, Y., Qu, Q., Xiong, R., Tang, H., Huang, C. (2022). Encapsulated Microstructures of Beneficial Functional Lipids and Their Applications in Foods and Biomedicines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **70(27)**, 8165-8187.

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.

Castro-López, C., Romero-Luna, H. E., García, H. S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A. (2022). Key Stress Response Mechanisms of Probiotics During Their Journey Through the Digestive System: A Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **17(8)**, 1-21.

Chávarri, M., Diez-Gutiérrez, L., Marañón, I., del Carmen Villarán, M., Barrón, L. J. R. (2022). The role of probiotics in nutritional health: probiotics as nutraceuticals. In *Probiotics in the Prevention and Management of Human Diseases* (pp. 397-415). *Academic Press*.

Coz-Bolaños, X., Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., Loarca-Piña, G. F., Guzmán-Maldonado, S. H. (2018). Moringa infusion (*Moringa oleifera*) rich in phenolic compounds and high antioxidant capacity attenuate nitric oxide pro-inflammatory mediator *in vitro*. *Industrial Crops and Products*, **118**, 95-101.

D

da Silva, M., Trancoso, J., Tormen, L., Bombardelli, M. M., Corazza, M. L., Bainy, E. M. (2022). Extraction of compounds from *Moringa oleifera* leaves using supercritical CO₂ plus ethanol as a cosolvent. *Journal of Food Process Engineering*, **45(3)**, e13979.

Darmastuti, A., Hasan, P. N., Wikandari, R., Utami, T., Rahayu, E. S., Suroto, D. A. (2021). Adhesion Properties of *Lactobacillus Plantarum* Dad-13 and *Lactobacillus Plantarum* Mut-7 on Sprague Dawley Rat Intestine. *Microorganisms*, **9(11)**, 2336.

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.

Das, T. K., Pradhan, S., Chakrabarti, S., Mondal, K. C., Ghosh, K. (2022). Current Status of Probiotic and related Health Benefits. *Applied Food Research*, **2**, 100185.

de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, **36(8)**, 2060-2076.

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 Oliveira Vieira, K. C., Ferreira, C. D. S., Bueno, E. B. T., De Moraes, Y. A., Toledo, A. C. C. G., Nakagaki, W. R., Winkelstroter, L. K. (2020). Development and viability of probiotic orange juice supplemented by *Pediococcus acidilactici* CE51. *LWT*, **130**, 109637.

de Oliveira, P. M., Leite Júnior, B. R. D. C., Martins, E. M. F., Martins, M. L., Vieira, É. N. R., de Barros, F. A. R., Ramos, A. M. (2021). Mango and carrot mixed juice: a new matrix for the vehicle of probiotic lactobacilli. *Journal of Food Science and Technology*, **58(1)**, 98-109.

De Prisco, A., Mauriello, G. (2016). Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science and Technology*, **48**, 27-39.

- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, **20**, 292–302.
- Dias, F. S., Duarte, W. F., Schwan, R. F. (2013). Evaluation of adhesive properties of presumptive probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Bioscience Journal*, **29(5)**, 1678-1686.
- 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.
- Divyashree, S., Anjali, P. G., Somashekaraiyah, R., Sreenivasa, M. Y. (2021). Probiotic properties of *Lactobacillus casei*–MYSRD 108 and *Lactobacillus plantarum*-MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella paratyphi*. *Biotechnology Reports*, **32**, e00672.
- Doğaç, Y. I., Çinar, M., Teke, M. (2015). Improving of catalase stability properties by encapsulation in alginate/Fe₃O₄ magnetic composite beads for enzymatic removal of H₂O₂. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **45(2)**, 144-157.
- Dos Santos Leandro, E., Ginani, V. C., de Alencar, E. R., Pereira, O. G., Rose, E. C. P., do Vale, H. M. M., Tavares, C. S. O. (2021). Isolation, identification, and screening of lactic acid bacteria with probiotic potential in silage of different species of forage plants, cocoa beans, and artisanal salami. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **13(1)**, 173-186.
- Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., Singh, P., Singh, B. R. (2018). Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PloS one*, **13(3)**, e0192978.
- Dowdell, P., Chankhamhaengdecha, S., Panbangred, W., Janvilisri, T., Aroonual, A. (2020). Probiotic activity of *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* isolated from Thai fermented sausages and their protective effect against *Clostridium difficile*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **12(2)**, 641-648.
- Dubey, M. R., Patel, V. P. (2018). Probiotics: a promising tool for calcium absorption. *Open Nutrition Journal*, **12**, 59–69.
- 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.
- Dufour, C., Page, D., Gobert, M., Rémond, D., Loonis, M., Buffière, C. SantéLhoutellier, V. (2014). Bioaccessibilité et propriétés antioxydantes des polyphénols et caroténoïdes des fruits et légumes dans le tractus digestif. *Innovations Agronomiques*, **36**, 69-82.

Duncan, K. R., Suzuki, Y. J. (2017). Vitamin E Nicotinate. *Antioxidants*, **6**(1), 20-34.

E

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.

F

Facioni, M. S., Raspini, B., Pivari, F., Dogliotti, E., Cena, H. (2020). Nutritional management of lactose intolerance: the importance of diet and food labelling. *Journal of Translational Medicine*, **18**(1), 1-9.

Faure, S., Pubert, C., Rabiller, J., Taillez, J., Yvain, A. L. (2013). Que savons-nous des probiotiques ? *Actualités Pharmaceutiques*, **52**(528), 18-21.

Ferdous, M. F., Arefin, M. S., Rahman, M. M., Ripon, M. M. R., Rashid, M. H., Sultana, M. R., Rafiq, K. (2019). Beneficial effects of probiotic and phytobiotic as growth promoter alternative to antibiotic for safe broiler production. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, **6**(3), 409.

Fijałkowski, K., Peitler, D., Rakoczy, R., Żywicka, A. (2016). Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution. *LWT-Food Science and Technology*, **68**, 322-328.

Filannino, P., Bai, Y., Di Cagno, R., Gobbetti, M., Gänzle, M. G. (2015). Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus spp.* during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology*, **46**, 272-279.

Fusco, V., Chieffi, D., Benomar, N., Abriouel, H. (2022). Indigenous probiotic microorganisms in fermented foods. In *Probiotics for Human Nutrition in Health and Disease* (pp. 75-114). *Academic Press*.

G

Galdeano C., Cazorla S., Dumit J., Vélez E., Perdigón. (2019). Beneficial Effect of Probiotic Consumption on the Immun System. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **74** (2), 115-12.

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.

Gharbi, Y., Fhoula, I., Ruas-Matiedo, P., Najjari, A., Boudabous, A., Gueimonde, M., Ouzari, H.I. (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.

Gharsallah, K., Rezig, L., Msaada, K., Chalh, A., Soltani, T. (2021). Chemical composition and profile characterization of *Moringa oleifera* seed oil. *South African Journal of Botany*, **137**, 475-482.

Ghezziel, 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.

Ghorbani, S., Maryam, A. (2021). Encapsulation of lactic acid bacteria and Bifidobacteria using starch-sodium alginate nanofibers to enhance viability in food model. *Journal of Food Processing and Preservation*, **45(12)**, e16048.

González-Sarrías A., García-Villalba R., Núñez-Sánchez M.Á., Tomé-Carneiro J., Zafrilla P., Mulero J., Tomás-Barberán F.A., Espín J.C. (2015). Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: a crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. *International Journal of Food*, **19**, 225–235.

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

Hadi, A. E., Khalisha, A., Pambudi, A., Effendi, Y. (2021). Potential of bacteria consortium as growth controller of pathogenic fungi *Fusarium oxysporum* F. sp. *ubense* (Foc). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. **637**, No. 1, p. 012029). IOP Publishing.

Hamed, Y. S., Abdin, M., Chen, G., Akhtar, H. M. S., Zeng, X. (2020). Effects of impregnate temperature on extraction of caffeoylquinic acid derivatives from *Moringa oleifera* leaves and evaluation of inhibitory activity on digestive enzyme, antioxidant, anti-proliferative and antibacterial activities of the extract. *International Journal of Food Science and Technology*, **55(9)**, 3082-3090.

Han, K. J., Lee, J. E., Lee, N. K., Paik, H. D. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* KU15149 derived from Korean homemade diced-radish kimchi. 591-598.

Hassan, M. U., Nayab, H., Shafique, F., Williamson, M. P., Almansouri, T. S., Asim, N., Akbar, N. (2020). Probiotic properties of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum* isolated from traditional Pakistani yoghurt. *BioMed Research International*, **17**, 8889198.

Hazra, B., Biswas, S., Mandal, N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **8(1)**, 1-10.

He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X. (2017). Antioxydants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **44**, 532-553.

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.

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

Hossain, M. A., Disha, N. K., Shourove, J. H., Dey, P. (2020). Determination of antioxidant activity and total tannin from drumstick (*Moringa oleifera lam.*) leaves using different solvent extraction methods. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, **8(12)**, 2749-2755.

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.

Ilyas, M., Arshad, MU, Saeed, F., Iqbal, M. (2015). Antioxidant potential and nutritional comparison of Moringa leaf and seed powders and their tea infusions. *Journal Animal Plant Sciences*, **25 (1)**, 226-233.

Islam, Z., Islam, S. M., Hossen, F., Mahtab-ul-Islam, K. Hasan, M., et Karim, R.(2021). Moringa oleifera is a prominent source of nutrients with potential health benefits. *International Journal of food science*, **2021**, 1-11.

J

Jabłonska-Rys, E., Sławinska, A., Szwajgier, 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.

Jacobsen, N. M. Y., Caglayan, I., Caglayan, A., Bar-Shalom, D., Müllertz, A. (2020). Achieving delayed release of freeze-dried probiotic strains by extrusion, spheronization and fluid bed coating - evaluated using a three-step *in vitro* model. *International Journal Pharmaceutical*, **591**, 120022.

Jiang, L., Luo, Y., Cao, X., Liu, W., Song, G., Zhang, Z. (2021). LuxS quorum sensing system mediating *Lactobacillus plantarum* probiotic characteristics. *Archives of Microbiology*, **203(7)**, 4141-4148.

John, K. K., Shcherazade, D. O. S. F. (2021). Activité Anti-inflammatoire Et Études Phytochimiques De L'extrait Aqueux Des Écorces *Distemonanthus Benthamianus* Baill (*Caesalpinaceae: Leguminosae-Caesalpinioideae*). *European Scientific Journal*, **17(7)**, 74-93.

Jungersen, M., Wind, A., Johansen, E., Christensen, J. E., Stuer-Lauridsen, B., Eskesen, D. (2014). The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12®. *Microorganisms*, **2(2)**, 92-110.

Juturu, V., Wu, J. C. (2018). Microbial production of bacteriocins: latest research development and applications. *Biotechnol Advances*, **36**, 187–2200.

K

Kareb, O., Aïder, M. (2019). Whey and its derivatives for probiotics, prebiotics, synbiotics, and functional foods: a critical review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **11(2)**, 348-369.

Karim, N.U., Siddiq, U.S., Razak, M.R., Zainol, M.K., Abdullah, M.I. (2018). Effects of moringa leaves (*Moringa oleifera*) extraction on quality changes and melanosis of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) during chilled storage. *Italian Journal of Food Safety*, **7 (3)**, 6846.

Khan, I., Kang, S. C. (2016). Probiotic potential of nutritionally improved *Lactobacillus plantarum* DGK-17 isolated from Kimchi—A traditional Korean fermented food. *Food Control*, **60**, 88-94.

Khanna, S., Bishnoi, M., Kondepudi, K.K., Shukla, G. (2020). Isolation, characterization and anti-inflammatory mechanism of probiotics in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **36(5)**, 1-11.

Kharode, R. H., Yogita, C., Gaikwad, M. P., Hiremath, A. J., Sahoo, A. K. (2019). Development of health drink from fruit and vegetables (*Beetroot, Pineapple and Moringa leaves*). *The Pharma Innovation Journal*, **8(4)**, 776-780.

Khojah, E., Sami, R., Helal, M., Elhakem, A., Benajiba, N., Alkaltham, M. S., Salamatullah, A. M. (2021). Postharvest physicochemical properties and fungal populations of treated cucumber with sodium tripolyphosphate/titanium dioxide nanoparticles during storage. *Coatings*, **11(6)**, 613.

Kim, K. T., Yang, S. J., Paik, H. D. (2021). Probiotic properties of novel probiotic *Levilactobacillus brevis* KU15147 isolated from radish kimchi and its antioxidant and immune-enhancing activities. *Food Science and Biotechnology*, **30(2)**, 257-265.

Kim, S., Covington, A., Pamer, E. G. (2017). The intestinal microbiota: antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunological Reviews*, **279(1)**, 90-105.

Klayraung, S., Viernstein, H., Okonogi, S. (2009). Development of tablets containing probiotics: effects of formulation and processing parameters on bacterial viability. *Int J Pharm* **370**:54–60.

Koirala, S., Anal, A. K. (2021). Probiotics-based foods and beverages as future foods and their overall safety and regulatory claims. *Future Foods*, **3**, 100013.

Krausova, G., Hyrslova, I., Hynstova, I. (2019). *In vitro* evaluation of adhesion capacity, hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains. *Fermentation*, **5**(4), 100.

Kumari, M., Patel, H. K., Kokkiligadda, A., Bhushan, B., Tomar, S. K. (2022). Characterization of probiotic lactobacilli and development of fermented soymilk with improved technological properties. *LWT*, **154**, 112827.

Kurutas, E. B. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress : current state. *Nutrition Journal*. **15**(71), 1-22.

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.

Kwaw, E., Ma, Y., Tchabo, W., Apaliya, M. T., Wu, M., Sackey, A. S., et al. (2018). Effect of *lactobacillus* strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food Chemistry*, **250**, 148–154.

Kwon, G., Heo, B., Kwon, M. J., Kim, I., Chu, J., Kim, B. Y., Park, S. S. (2021). Effect of silk fibroin biomaterial coating on cell viability and intestinal adhesion of probiotic bacteria. *Journal Microbiol Biotechnol*, **31**(4), 592-600.

L

Laib, I., Kehal, F., Arris, M., Maameri, MI, Lachlah, H., Bensouici, C., Barkat, M. (2021). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of organically grown *Camellia sinensis L. green tea*. *Clinical Nutrition and Metabolism* , **35** (3), 212-221.

Lecoq R. (1965). Manuel d'analyses alimentaires et expertise usuelles. *Doin. Paris*.1304-1311.

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, W., Ji, J., Chen, X., Jiang, M., Rui, X., Dong, M. (2014). Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers*, **102**, 351-359.

Liang, Q., Wang, L., He, Y., Wang, Z., Xu, J., Ma, H. (2014). Hydrolysis kinetics and antioxidant activity of collagen under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, **11**, 493-499.

Lillo-Pérez, S., Guerra-Valle, M., Orellana-Palma, P., Petzold, G. (2021). Probiotics in fruit and vegetable matrices: Opportunities for nondairy consumers. *LWT*, **151**, 112106.

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, D., Guo, Y., Wu, P., Wang, Y., Golly, M. K., Ma, H. (2020). The necessity of walnut proteolysis based on evaluation after *in vitro* simulated digestion: ACE inhibition and DPPH radical-scavenging activities. *Food Chemistry*, **311**, 125960.

Liu, F., Zhang, X., Zhao, L., Wang, Y., Liao, X. (2016). Potential of high-pressure processing and high-temperature/short-time thermal processing on microbial, physicochemical and sensory assurance of clear cucumber juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **34**, 51-58.

Looi, Y. F., Ong, S. P., Julkifle, A., Alias, M. S. (2019). Effects of pretreatment and spray drying on the physicochemical properties and probiotics viability of Moringa (*Moringa oleifera* Lam) leaf juice powder. *Journal of Food Processing and Preservation*, **43(4)**, e13915.

Lu, Z., Fleming, H. P., McFeeters, R.F. (2002). Effects of Fruit Size on Fresh Cucumber Composition and the Chemical and Physical Consequences of Fermentation. *Food Chemistry and Toxicology*, **67**, 2934-2939.

M

Madjirebaye, P., Xiao, M., Mahamat, B., Xiong, S., Mueed, A., Wei, B., Peng, Z. (2022). *In vitro* characteristics of lactic acid bacteria probiotics performance and antioxidant effect of fermented soymilk. *Food Bioscience*, **49**, 101952.

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.

- Mandey, J. S., Wolayan, F. R., Pontoh, C. J., Sondakh, B. (2019). Phytochemical characterization of cucumber (*Cucumis sativus L.*) seeds as candidate of water additive for organic broiler chickens. *Journal Advance Agriculture Technol*, **6**, 6410.18178.
- Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J., Lombó, F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Research International*, **15**, 1-18.
- Markowiak, P., Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, **9(9)**, 1021.
- Mendoza, L. (2019). Potential effect of probiotics in the treatment of breast cancer. *Oncology Reviews*, **13(2)**, 134-138.
- Min, M., Bunt, C. R., Mason, S. L., Hussain, M. A. (2019). Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **59(16)**, 2626-2641.
- Minekus, M., Alminger, 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.
- Mittelviehhaus, M., Müller, D. B., Zambelli, T., Orholt, 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.
- Molska, M., Reguła, J. (2019). Potential mechanisms of probiotics action in the prevention and treatment of colorectal cancer. *Nutrients*, **11**, 2453.
- 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.
- 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.
- Muhalidin, B. J., Hussin, A. S. M., Kadum, H., Hamid, A. A., Jaafar, A. H. (2021). Metabolomic changes and biological activities during the lacto-fermentation of jackfruit juice using *Lactobacillus casei* ATCC334. *LWT*, **141**, 110940.

Nikolova, V. L., Pelton, L., Moulton, C. D., Zorzato, D., Cleare, A. J., Young, A. H., Stone, J. M. (2022). The prevalence and incidence of irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in depression and bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *Psychosomatic Medicine*, **84(3)**, 313-324.

Noaman, Z. M., Ashoush, I. S., Mahdy, S. M., Yousef, E. E. (2022). Enhancement sensory, physicochemical and antioxidant properties of moringa functional beverages. *Egyptian Journal of Nutrition*, No (1), 17-44.

Nwidu, L. L., Elmorsy, E., Aprioku, J. S., Siminialayi, I., Carter, W. G. (2018). *In vitro* anti-cholinesterase and antioxidant activity of extracts of *Moringa oleifera* plants from Rivers State, Niger Delta, Nigeria. *Medicines*, **5(3)**, 71.

O

Oboh, G., Ademiluyi, A. O., Ogunsuyi, O. B., Oyeleye, S. I., Dada, A. F., Boligon, A. A. (2017). Cabbage and cucumber extracts exhibited anticholinesterase, antimonoamine oxidase and antioxidant properties. *Journal of Food Biochemistry*, **41 (3)**, e12358.

Oh, A., Daliri, E. B. M., Oh, D. H. (2018). Screening for potential probiotic bacteria from Korean fermented soybean paste: *In vitro* and *Caenorhabditis elegans* model testing. *LWT*, **88**, 132-138.

Olayinka, B.U., Etejere, E.O. (2018). Proximate and Chemical Compositions of Watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai cv Red and Cucumber (*Cucumis sativus* L. cv Pipino). *International Food Research Journal*, **25 (3)**, 1060-1066.

Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Idoui, T., Bouridane, H., Arida, S. (2016). *Lactobacillus plantarum* G1 Microencapsulation enhanced its Viability during Storage and Gastrointestinal Transit. *Sains Malaysiana*. **45(7)**, 1049–1055.

P

Page D., Gobert M., Remond D., Loonis M., Buffière. (2014). Bioaccessibilité et propriétés antioxydantes des polyphénols et caroténoïdes des fruits et légumes dans le tractus digestif. *Innovations Agronomiques*, **36**, 69-82.

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

Pangestuti, R., Murniasih, T., Putra, M. Y., Rasyid, A., Wibowo, J. T., Ardiansyah, A., Untari, F. (2016). Free radical scavenging activity of selected sea cucumber species from Mataram-Lombok, Indonesia. *Jurnal Teknologi*, **78(4-2)**, 8202.

Panjaitan, R., Nuraida, L., Dewanti-Hariyadi, R. (2018). Seleksi isolat bakteri asam laktat asal tempe dan tape sebagai kandidat probiotik. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, **29(2)**, 175-184.

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.

Patel, T., Bhattacharya, P., Das, S. (2016). Gut microbiota: an indicator to gastrointestinal tract diseases. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, **47 (3)**, 232-238.

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. pp. 347- 359.

Penhasi, A., Reuveni, A., Baluashvili, I. (2021). Microencapsulation may preserve the viability of probiotic bacteria during a baking process and digestion: a case study with *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* in bread. *Current Microbiology*, **78(2)**, 576-589.

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.

Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R., Núñez, G. (2017). Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Revue*, **279**, 70–89.

Piekarska-Radzik, L., Klewicka, E. (2021). Mutual influence of polyphenols and *Lactobacillus spp.* bacteria in food: A review. *European Food Research and Technology*, **247(1)**, 9-24.

Piqué, N., Berlanga, M., Miñana-Galbis, D. (2019). Health benefits of heat-killed (Tyndallized) probiotics: an overview. *International Journal of Molecular Sciences*, **20(10)**, 2534.

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

Preciado-Rangel, P., Reyes-Pérez, JJ, Ramírez-Rodríguez, SC, Salas-Pérez, L., Fortis-Hernández, M., Murillo-Amador, B., Troyo-Diéguez, E. (2019). Foliar aspersion of salicylic acid improves phenolic and flavonoid compounds, and also the fruit yield in cucumber (*Cucumis sativus L.*). *Seedlings*, **8 (2)**, 44.

R

Rajam, R., Subramanian, P. (2022). Encapsulation of probiotics: past, present and future. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, **11(1)**, 1-18.

Ranadheera, C. S., Vidanarachchi, J. K., Rocha, R. S., Cruz, A. G., Ajlouni, S. (2017). Probiotic delivery through fermentation: Dairy vs. non-dairy beverages. *Fermentation*, **3(4)**, 67.

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.

Ren, Y., Wang, C., Chen, Z., Allan, E., Van der Mei, H. C., Busscher, H. J. (2018). Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. *FEMS Microbiology Reviews*, **42**(3), 259-272.

Reque, P. M., Brandelli, A. (2021). Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. *Trends in Food Science and Technology*, **114**, 1-10.

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.

Rios-Corripio, G., Guerrero-Beltrán, J. Á. (2019). Antioxidant and physicochemical characteristics of unfermented and fermented pomegranate (*Punica granatum L.*) beverages. *Journal of Food Science and Technology*, **56**(1), 132-139.

Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., Sato, H. H. (2020). Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications—A narrative review. *Food Research International*, **137**, 109682.

S

Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science Technol*, **50**, 1–16

Sakoui, S., Derdak, R., Addoum, B., Pop, O. L., Vodnar, D. C., Suharoschi, R., El Khalfi, B. (2022). The first study of probiotic properties and biological activities of lactic acid bacteria isolated from Bat guano from Er-rachidia, Morocco. *Food Science and Technology*, **159**, 113224.

Salas-Jara M, Iabaca A, Vega M, García A. (2016). Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. *Microorganisms*, **4**, 35.

Sampaio, K. B., Fusco, V., de Brito Alves, J. L., de Souza, E. L. (2022). Probiotics: Concepts, evolution, and applications. In *Probiotics for Human Nutrition in Health and Disease* (pp. 3-24). Academic Press.

Schubert, M. L. (2016). Gastric acid secretion. *Current opinion in gastroenterology*, **32**(6), 452-460.

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.

Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., Drider, D. (2017). *Lactobacillus plantarum* and its probiotic and food potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **9(2)**, 111-122.

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.

Shu, Y., Li, J., Yang, X., Dong, X., Wang, X. (2019). Effect of particle size on the bioaccessibility of polyphenols and polysaccharides in green tea powder and its antioxidant activity after simulated human digestion. *Journal of Food Science and Technology*, **56(3)**, 1127-1133.

Silva, D. R., Sardi, J. D. C. O., de Souza Pitangui, N., Roque, S. M., da Silva, A. C. B., Rosalen, P. L. (2020). Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: current reality and future directions. *Journal of Functional Foods*, **73**, 104080.

Skrypnik, K., Bogdański, P., Schmidt, M., Suliburska, J. (2019). The effect of multispecies probiotic supplementation on iron status in rats. *Biol Trace Elem Res*, **192**, 234–243.

Sohag, M. S. U., Paul, M., Al-Bari, M. A. A., Wahed, M. I. I., Khan, M. R. I. (2019). Potential antidiabetic activities of probiotic strains, *L. acidophilus* and *L. bulgaricus* against fructose-fed hyperglycemic rats. *Food and Nutrition Sciences*, **10(12)**, 1419.

Soundara Rajan, N. P., Ponnusamy, R., Murugesan, S., Gopal, S., et Ranganathan, T(2018). Development and evaluation of probioticated cucumber juice using *lactobacillus plantarum*. *Proceedings of the national academy of sciences, india section B: Biological sciences*, **88(3)**, 1025-1032.

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.

Suez, J., Zmora, N., Segal, E., Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medecine*, **25**, 716–729.

T

Tajini, F., Bouali, Y., Ouerghue, A. (2020). Etude de la qualité nutritionnelle de fruit de Phœnix dactylifera L.: mesure des paramètres biochimiques. *Nature and Technology*, **(23)**, 39-49.

Tang, W., Xing, Z., Li, C., Wang, J., Wang, Y. (2017). Molecular mechanisms and *in vitro* antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. *Food Chemistry*, **221**, 1642-1649.

Tasdemir, S. S., Sanlier, N. (2020). An insight into the anticancer effects of fermented foods: A review. *Journal of Functional Foods*, **75**, 104281.

Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., Kopsahelis, N. (2019). Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients*, **11(7)**, 1591.

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.

Tripathi, M. K., Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, **9**, 225-241.

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(4)**, 1291–1299.

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.

Vij, R., Danchik, C., Crawford, C., Dragotakes, Q., Casadevall, A. (2020). Variation in Cell Surface Hydrophobicity among *Cryptococcus neoformans* Strains Influences Interactions with Amoebas. *mSphere*, **5(2)**, e00310-20.

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, D., Zhang, T., Ye, H., Hao, H., Zhang, H., Zhao, C. (2020). *In vitro* probiotic screening and evaluation of space-induced mutant *Lactobacillus plantarum*. *Food Science and Nutrition*, **8(11)**, 6031-6036.

Wang, K., Ni, J., Li, H., Tian, X., Tan, M., Su, W. (2022). Survivability of probiotics encapsulated in kelp nanocellulose/alginate microcapsules on microfluidic device. *Food Research International*, **160**, 111723.

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.

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

Wanna, C. (2019). Free radical scavenging capacity and total phenolic contents in peel and fleshy crude extracts of selected vegetables. *Pharmacognosy Journal*, **11(6)**, 1351-1358.

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.

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

Y

Yadav, R., Shukla, P. (2017). Chapter 6: Probiotics for human health: current progress and applications. *Recent Advances in Applied Microbiology*. 133-147.

Yamamoto, Y., Nakanishi, Y., Murakami, S., Aw, W., Tsukimi, T., Nozu, R., Fukuda, S. (2018). A metabolomic-based evaluation of the role of commensal microbiota throughout the gastrointestinal tract in mice. *Microorganisms*, **6 (4)**, 101.

Yan, F., Li, N., Yue, Y., Wang, C., Zhao, L., Evivie, S. E., Huo, G. (2020). Screening for potential novel probiotics with dipeptidyl peptidase IV-inhibiting activity for type 2 diabetes attenuation *in vitro* and *in vivo*. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 2855.

Yan, T., Goldman, R. D. (2020). Les probiotiques pour la diarrhée liée aux antibiotiques chez l'enfant. *Canadian Family Physician*, **66(1)**, e9-e11.

Ydjedd, S., Bouriche, S., López-Nicolás, R., Sánchez-Moya, T., Frontela-Saseta, C., Ros-Berruezo, G., Kati, D. E. (2017). Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on encapsulated and nonencapsulated phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp extracts and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65(4)**, 827-835.

Yeoh, S. Y., Teik, J., Suat, G., Yeoh, P. T., Keow, J. N., Amel, B. S., Ahmad, S. B. (2021). Growth Rate of *Lactobacillus* spp and *Streptococcus thermophilus* of some Medicinal Plants Water Extracts with Fish Collagen. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, **12**, 824-832.

Yoha, K. S., Nida, S., Dutta, S., Moses, J. A., Anandharamakrishnan, C. (2021). Targeted Delivery of Probiotics: Perspectives on Research and Commercialization. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **14(1)**,1-34.

Yuan, Y., Yin, M., Chen, L., Liu, F., Chen, M., Zhong, F. (2022). Effect of calcium ions on the freeze-drying survival of probiotic encapsulated in sodium alginate. *Food Hydrocolloids*, **130**, 107668.

Z

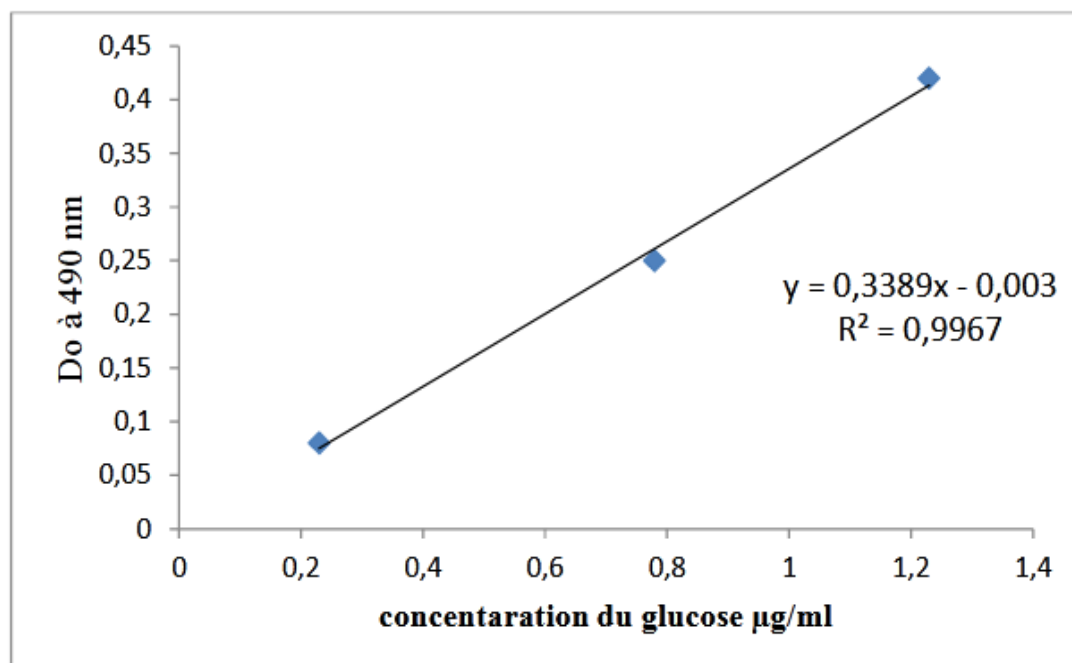
Zhang, D., Ivane, N. M., Haruna, S. A., Zekrumah, M., Elysé, F. K. R., Tahir, H. E., Zou, X. (2022). Recent trends in the micro-encapsulation of plant-derived compounds and their specific application in meat as antioxidants and antimicrobials. *Meat Science*, **191**, 108842.

Zhu, Y., Wang, Z., Bai, L., Deng, J., Zhou, Q. (2021). Biomaterial-based encapsulated probiotics for biomedical applications: Current status and future perspectives. *Materials and Design*, **210**, 110018.

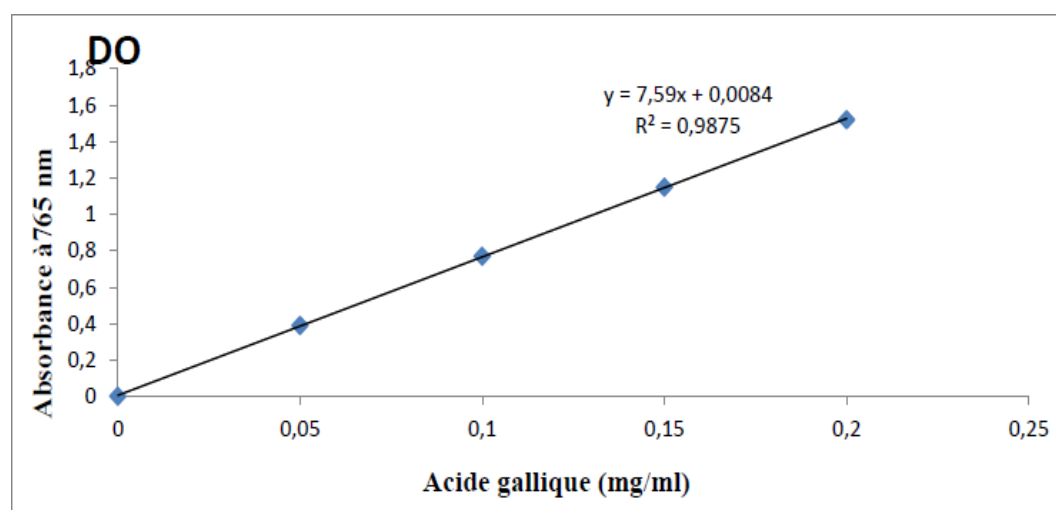
Annexes

Courbes d'étalonnage

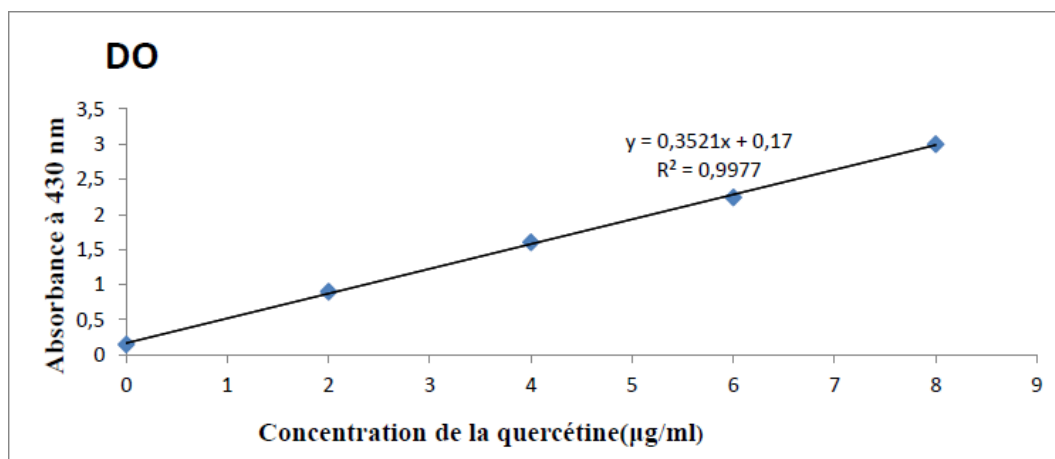
Annexe 1. Courbe d'étalonnage des sucres totaux (glucose)



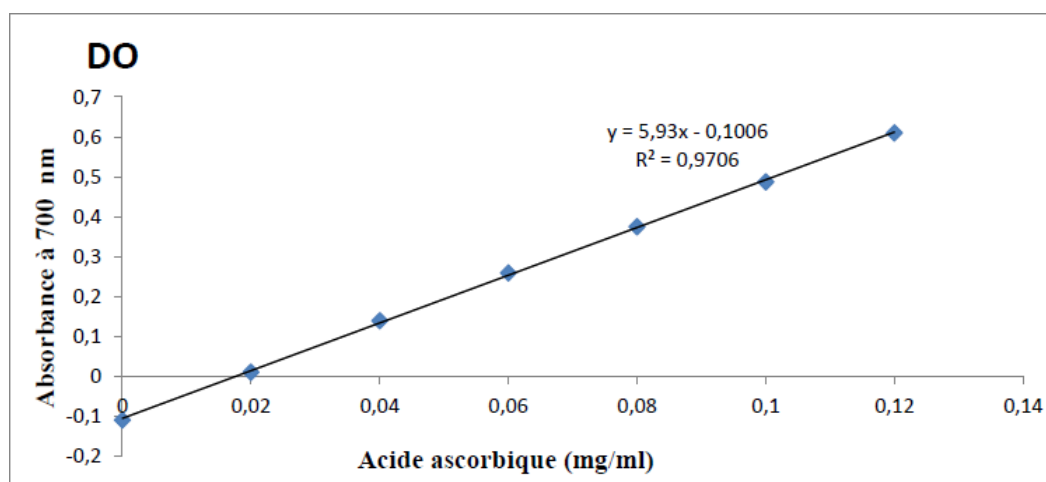
Annexe 2. Courbe d'étalonnage des composés phénoliques totaux (Acide galique)



Annexe 3. Courbe d'étalonnage des flavonoïdes (Quercétine)



Annexe 4. Courbe d'étalonnage pour le pouvoir réducteur (FRAP)



Thème : Effet de la digestion sur la survie des souches probiotiques mixtes libres et encapsulées

Réalisé par : Asma BENSSAM
Sadjia BOULAHIA

Encadreur : Pr. Tayeb IDOUI
Date de soutenance : 17/09/2022

RESUME

Dans la présente étude, nous avons évalué en premier lieu, la survie, la viabilité, la capacité probiotique et l'activité antioxydante de *Lactiplantibacillus plantarum* mixte de deux souches « S10 et BCX1 » lors de la digestion dans des conditions simulées à celles du tractus bucco-gastro-intestinale. En second lieu, l'activité antioxydante et anti-inflammatoire d'un mélange de jus de concombre et de moringa dans les mêmes conditions de digestion, et en troisième lieu, l'effet de la combinaison de bactéries à ces substrats végétaux sur la viabilité et la survie pendant la digestion. Les résultats obtenus ont prouvé une fois de plus le rôle majeur de la micro encapsulation dans l'amélioration du taux de survie aux mêmes conditions.

Les résultats ont montré que notre culture mixte répond aux critères de sélection des probiotiques résistants aux conditions digestives. Dans les mêmes conditions, les substrats végétaux sont considérés comme de bons supports pour les probiotiques, et que leurs combinaison a montré une amélioration de la survie et de la capacité probiotique ainsi que le pouvoir antioxydant de nos souches. Enfin, il y a une diminution de la biodisponibilité des composés phénoliques et flavonoïdiques au cours de passage à travers les différents étages digestifs.

Mots clés : *Lactiplantibacillus plantarum* mixte "S10 ; BCX1", digestion, survie, micro-encapsulation, activité antioxydante, activité anti inflammatoire, jus de concombre-moringa.

ABSTRACT

In the present study, we evaluated firstly, the survival, viability, probiotic properties and antioxidant activity of *Lactiplantibacillus plantarum* mixed from two strains "S10 and BCX1" during digestion under conditions similar to those of the oral-gastrointestinal tract. Secondly, the antioxidant and anti-inflammatory activity of a mixture of cucumber and moringa juice under the same digestion conditions, and finally, the effect of the combination of bacteria with these plant substrates on the viability and survival during digestion. The results obtained also proved the major role of microencapsulation in improving the survival rate under the same conditions.

The results showed that our mixed culture respond to the selection criteria for probiotics resistant to digestive conditions. Under the same conditions, plant substrates are considered good carriers for probiotics, and the combination of the latter with the mixed cucumber-moringa juice showed an improvement in the survival and probiotic capacity as well as the antioxidant power of our strains. Finally, there is a decrease in the bioavailability of phenolic and flavonoid compounds during the passage through the different digestive stages.

Key words: *Lactiplantibacillus plantarum* mixed "S10 and BCX1", digestion, survival, micro-encapsulation, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, cucumber-moringa juice.

ملخص

من خلال هذه الدراسة، قمنا بداية بدراسة مدى قابلية البكتيريا *lactiplantibacillus plantarum* المختلطة من سلالتين "S10 و BCX1" في الحفاظ على قدرتها الحيوية، خواصها البروبيوتكية ونشاطها المضاد للأكسدة خلال عملية الهضم، في ظروف تحاكي تلك الخاصة بالجهاز الهضمي. ثانياً، تقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للالتهابات لمزيج من عصير الخيار والمورينجا المعرض لنفس ظروف الجهاز الهضمي، وثالثاً، دراسة مدى تأثير دمج هذه الدعامات النباتية مع البكتيريا في قدرتها على الحفاظ على حيويتها وبقائها على قيد الحياة في الجهاز الهضمي. كما أثبتت النتائج التي تم الحصول عليها الدور الرئيسي للتغليف الدقيق في تحسين معدل البقاء على قيد الحياة تحت نفس الظروف.

أظهرت النتائج أن خليط البكتيريا لدينا يلبي معايير انتقاء البروبيوتيك المقاوم لظروف الجهاز الهضمي. وفي ظل نفس الظروف، تعتبر الدعامات النباتية وسيلة جيدة لدعم ونقل البروبيوتيك داخل الجهاز الهضمي، حيث أظهرت نتائج الجمع بين البروبيوتيك وعصير الخيار والمورينجا تحسناً في قدرة البكتيريا على البقاء على قيد الحياة وفي حفاظها على خواصها البروبيوتكية بالإضافة إلى تحسين نشاطها المضاد للأكسدة. وفي الأخير، أوضحت النتائج أن هناك انخفاض في نسب مركبات الفينول والفلافونويد أثناء مرورها عبر مراحل الجهاز الهضمي المختلفة.

الكلمات المفتاحية: "S10 و BCX1" *Lactiplantibacillus plantarum*، هضم، البقاء على قيد الحياة، التغليف الدقيق، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للالتهابات، عصير الخيار-مورينجا.