

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحي - جيجل

Université Mohammed Seddik Benyahia - de Jijel

Faculté des Sciences de la Nature
et de la Vie

Département : Microbiologie
Appliquée et Sciences
Alimentaires



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم: الميكروبيولوجيا التطبيقية
و علوم التغذية

Mémoire de fin d'études

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

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Viabilité et performances probiotiques de
Lactobacillus plantarum S 10 dans un système
simulé au tube digestif**

Membres de Jury

Présidente : Dr. ROULA Sagia Moussaoui

Examinatrice : Dr. OULED Heddar Houria

Encadreur : Prof. IDOUI Tayeb.

Présenté par :

M^{elle} : Manel Ferkhi

M^{elle} : Hadjer Cheurfi

Année Universitaire 2017 - 2018.

Numéro d'ordre (bibliothèque) :



Remerciements

En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant cette période

*Nous remercions très chaleureusement Monsieur **le Professeur IDOUI Tayeb** ; Merci pour votre encadrement, votre disponibilité et votre encadrement efficace. Merci pour votre compréhension, votre grande gentillesse et pour la confiance que vous avez témoigné tout au long de la période de réalisation de notre mémoire. Malgré vos importantes obligations, vous aviez toujours été présent pour recadrer notre travail dans la bonne direction et ceci été fondamental dans la bonne réalisation de ce travail .Soyez assuré de notre profonde gratitude.*

*Nous remercions très chaleureusement Monsieur **Khennouf Tarek** pour ses aides pour ses conseils.*

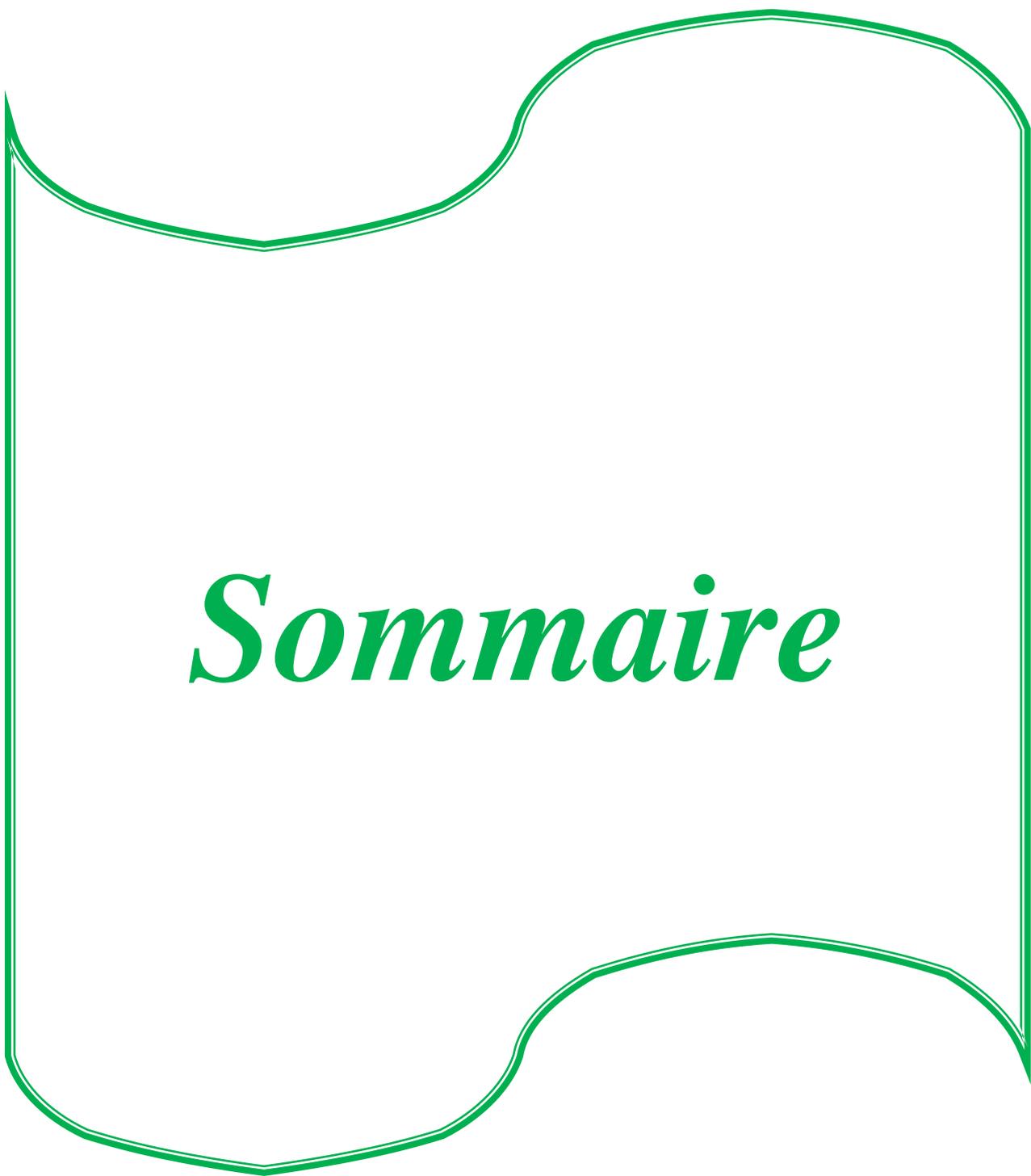
*Nous tenons particulièrement à remercier les membres du jury **Dr Ouled Heddar Houria** et **Dr Roula Sagia Moussaoui** d'avoir accepté de juger ce travail.*

Mes sincères remerciements s'adressent plus spécialement à tous les enseignants de département de MASA.

Merci







Sommaire

Introduction1

Partie I : Synthèse Bibliographique

I.1. Historique et définition des probiotiques3

I.2. Critères de sélection des probiotiques3

I.3. Principaux microorganismes probiotiques4

I.4. Mode d'action des probiotiques5

I.5. L'espèce *Lactobacillus plantarum* comme probiotiques6

I.5.1. Généralités sur l'espèce6

I.5.2. Le potentiel probiotique de *L. plantarum*7

I.5.2.1. Survie de *Lb.plantarum* dans le tube digestif7

I.6. L'encapsulation des bactéries probiotique 7

I.6.1. Techniques d'encapsulation des probiotiques8

I.6.1.1. Technique d'extrusion10

II.1. Aliments et antioxydants naturels11

II.1.1. Les polyphénols des fraises et concombre comme
Antioxydants11

II. 2. Mécanisme d'action des polyphénols12

II.3. Effets physiologiques des polyphénols12

II.4. Relation composés phénoliques et bactéries12

II.5. Probiotiques et activité antioxydante13

II.6. Les aliments transmetteurs et protecteurs de probiotiques15

Partie II : Etude expérimentale

II.1. Matériel17

II.1.1. Matériel biologique17

II.1.2. Les milieux de culture17

II.1.3. Produits chimiques et réactifs17

II.2. Méthodes	18
II.2.1. Revivification de la souche	18
II.2.2. Encapsulation de <i>L. plantarum</i> S10 dans un gel d'alginate de sodium.....	18
II.2.3. Préparation des extraits et dosages	19
II.2.3.1. Extraction par macération dans le méthanol aqueux à partir de la pulpe du concombre.....	19
II.2.3.2. Extraction des composés phénoliques à partir des pulpes de fraises.....	20
II.2.3.3. Dosages	20
II.2.4. Détermination de l'activité antioxydante de <i>L. plantarum</i> S10 <i>in vitro</i>	21
II.2.5. Comportement des billes dans une solution de KH_2PO_4	22
II.2.6. Activité antioxydante des différents extraits	23
II.2.7. Fabrication des jus de concombre et de fraises et fermentation	23
II.2.7.1. Préparation des jus	23
II.2.7.2. Fermentation des jus et évaluation de quelques paramètres	23
II.2.8. Mesure des activités antioxydantes de la bactérie après 24 heures de fermentation.....	24
II.2.9. La digestion bucco-gastro-intestinale <i>in vitro</i>	24
II.2.9.1. Préparation des solutions mères des liquides simulés de la digestion.....	25
II.2.9.2. Protocole expérimental de la digestion bucco -gastro-intestinale <i>in vitro</i>	25
a. la culture libre et encapsulée	26
b. Test de digestion <i>in-vitro</i> des extraits.....	28
c. Test de digestion <i>in-vitro</i> de la combinaison bactérie libre/extraits.....	28
II.2.10. Test d'adhésion <i>in- vitro</i> aux cellules épithéliales	28

Partie III : Résultats et discussion

III.1. Encapsulation de <i>L. plantarum</i> S10 dans un gel d'alginate de sodium à 1%	30
III.2. Dosage des flavonoïdes	30
III.3. Dosage des polyphénols	31
III.4. Détermination in vitro de l'activité antioxydante de <i>L. plantarum</i> S10	32
III.4.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène	32
III.4.2. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles	33
III.4.3. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	34
III.5. Comportement des billes dans une solution de KH_2PO_4	34
III.6. Activité antioxydante des différents extraits.....	35
III.7. Evolution de quelques paramètres de fermentation.....	36
III.7.1. Evolution du pH et d'acidité.....	36
III.7.2. Evolution du nombre de cellules	38
III.8. Activités antioxydantes de la bactérie après 24heures de fermentation.....	40
III.8.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène.....	40
III.8.2. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles	41
III.8.3. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	42
III.9. La digestion bucco-gastro-intestinale <i>in vitro</i>	43
III.9.1. Survie et viabilité de la culture libre et encapsulé après les phases de la digestion	43
III.9.2. Survie et viabilité de la culture libre et encapsulé à T= 0h dans les jus	45
III.9.2.1. Survie dans le jus de fraise.....	45
III.9.2.2. Survie dans le jus de concombre.....	46
III.9.3. Survie et viabilité de la culture après 24 h de fermentation	47
III.9.3.1. Survie de la culture libre et encapsulé après 24heures de fermentation dans le jus de fraise	47
III.9.3.2. Survie de la culture libre et encapsulée après 24 h de fermentation	

du jus de concombre	48
III.9.4. Evaluation de l'activité antioxydante de la bactérie après digestion	
bucco-gastro -intestinale.....	49
III.9.4.1. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles.....	49
III.9.4.2. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	50
III.9.5. Digestion <i>in-vitro</i> des extraits.....	51
III.9.6. Digestion <i>in-vitro</i> en combinant bactéries/extraits	52
III.9.7. Dosage des polyphénols et flavonoïdes après les phases de digestion.....	54
II.10. Test d'adhésion <i>in- vitro</i> aux cellules épithéliales du poulet.....	55
Conclusion.....	58
Annexe	

Figure	page
Figure 1 : Mécanismes d'action des probiotiques et leurs fréquences.....	6
Figure 2 : Techniques d'extrusion et d'émulsification	10
Figure 3 : Modulation de l'activité antioxydante par les probiotiques.....	14
Figure 4 : Teneurs en flavonoïdes dans les jus et leurs extraits.....	31
Figure 5 : Teneurs en polyphénols totaux.....	32
Figure 6 : Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité de <i>L.plantarum</i> S10.....	33
Figure 7 : Comportement des billes d'alginate de sodium dans des solutions de KH ₂ PO ₄	35
Figure 8 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH°.....	36
Figure 9 : Evolution du pH et d'acidité au cours de la fermentation de jus de fraise par culture libre et encapsulée.....	37
Figure 10 : Evolution du pH et d'acidité au cours de la fermentation de jus de concombre par culture libre et encapsulée.....	38
Figure 11 : Evolution du nombre des cellules au cours de la fermentation de jus de concombre.....	39
Figure 12 : Evolution du nombre des cellules au cours de la fermentation de jus de fraise.....	40
Figure 13 : Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité.....	41
de <i>L.plantarum</i> S10 après 24h de fermentation.	
Figure 14 : Pourcentage de piégeage de radical hydroxyle après 24h de fermentation des jus par <i>L.plantarum</i>	41
Figure 15 : Pourcentage de piégeage de radicaux libres DPPH après 24h de Fermentation des jus par <i>L.plantarum</i> S10.....	42
Figure 16 : Effet de la digestion sur la viabilité et la survie des cellules de <i>L.plantarum</i> S10 libres et encapsulées (UFC/ml).....	43
Figure 17 : Effet de la digestion sur la viabilité et la survie des cellules de <i>L.plantarum</i> S10 libres et encapsulées (cellules/ml).....	44
Figure 18 : Effet de la digestion sur la viabilité et la survie de <i>L.plantarum</i> S10 libre et encapsuléensemencé dans le jus de fraise (cellules/ml).....	45

Figure 19 : Effet de la digestion sur la viabilité et la survie de <i>L.plantarum</i> S10 libre et encapsulé ensemencé dans le jus de fraise (UFC/ml).....	46
Figure 20 : Effet de la digestion sur la viabilité et la survie de <i>L.plantarum</i> S10 libre et encapsulé ensemencé dans le jus de concombre (Cellules/ml).....	47
Figure 21 : Effet de la digestion sur la viabilité et la survie de <i>L.plantarum</i> S10 libre et encapsulé ensemencé dans le jus de concombre (UFC/ml).....	47
Figure 22 : Effet de la digestion sur la viabilité et la survie de <i>L.plantarum</i> S10 libre et encapsulé après 24heures de fermentation du jus de fraise.....	48
Figure 23 : Effet de la digestion sur la viabilité et la survie de <i>L.plantarum</i> S10 libre et encapsulé après 24heures de fermentation du jus de concombre.....	49
Figure 24 : Pourcentage de piégeage de radical hydroxyle après digestion <i>in vitro</i>	50
Figure 25 : Pourcentage de piégeage de radicaux libres DPPH après digestion <i>in vitro</i>	50
Figure 26 : Effet de la digestion <i>in vitro</i> sur la bioaccessibilité des polyphénols.....	51
Figure 27 : Effet de la digestion <i>in vitro</i> sur la bioaccessibilité des flavonoïdes.....	52
Figure 28 : Effet de l'extrait sur la viabilité et la survie des cellules libres de <i>L.plantarum</i> S10 au cours de la digestion <i>in vitro</i> (cellules /ml).....	53
Figure 29 : Effet de l'extrait sur la viabilité et la survie des cellules libres de <i>L.plantarum</i> S10 au cours de la digestion <i>in vitro</i> (UFC/ml).....	53
Figure 30 : Effet de la digestion <i>in vitro</i> sur la teneur en flavonoïdes.....	54
Figure 31 : Effet de la digestion <i>in vitro</i> sur la teneur en polyphénols.....	55
Figure 32 : Nombre de cellules adhérees aux cellules épithéliales.....	56

Tableau	page
---------	------

Tableau 1 : Critères de sélection des souches probiotiques.....4

Tableau 2 : Les espèces de bactéries probiotiques.....5

Tableau 3 : Biomatériaux et biopolymères utilisés dans l'encapsulation.....9

Photo	page
Photo 1 : Photographie des billes d'alginate de sodium à 1%.....	30
Photo 2 : Photographie des cellules épithéliales témoins.....	56
Photo 3 : Photomicrographie d'adhésion de <i>L.plantarum</i> S10 (culture témoin).....	57
Photo 4 : Photomicrographie d'adhésion de <i>L.plantarum</i> S10 aux cellules épithéliales après 2 h d'incubation dans la phase intestinal.....	57

BL : Bactéries lactiques

L : *Lactobacillus*

GIT : transit gastro-intestinale

ERO : espèces réactives d'oxygènes

GSH : Glutathione

SOD : superoxyde dismutase

CAT : Catalase

IL : Interleukine

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADHP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Unités de mesures :

pH : potentiel d'hydrogène

°D : degré dornic

rpm: Rotation par minute.

U : unité

M, mM : Molaire, millimolaire

N : normalité

Autres abréviations :

UFC : Unité Formant Colonie

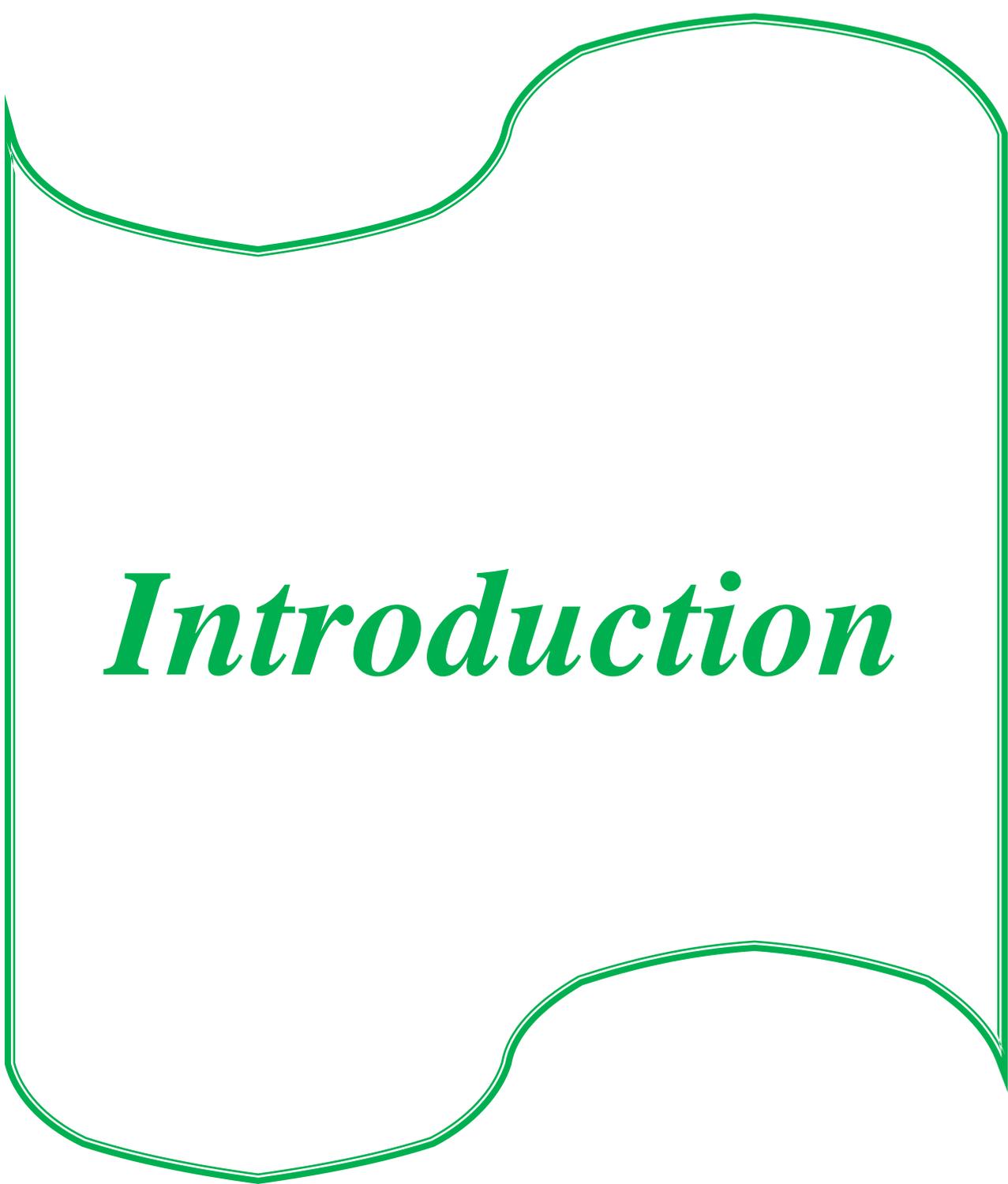
MRS: Man Rogosa et Sharpe

PBS : tampon phosphate saline

LS : liquide salivaire

LG : liquide gastrique

LI : liquide intestinale



Introduction

Le tractus gastro-intestinal est colonisé par de nombreux microorganismes qui vont constituer le microbiote digestif. Cet écosystème complexe et diversifié, propre à chaque individu, contribue au bon fonctionnement intestinal grâce aux multiples activités qu'il exerce. L'équilibre du microbiote est fragile et sa rupture intervient dans la physiopathologie de diverses affections intestinales, d'où l'idée de moduler de façon positive un microbiote déséquilibré par l'administration de probiotiques (**Bourlioux, 2014**).

Le terme « probiotique » signifie « pour la vie » et il est défini comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, peuvent exercer de nombreux bénéfices pour la santé de l'hôte. L'intérêt et le champ des recherches dans ce domaine ont considérablement progressé ces dernières années (**Sanchez et al. , 2017**).

La survie dans l'environnement gastro-intestinal est une condition essentielle pour nommer les bactéries lactiques probiotiques (**Ghadimi et al. , 2008 ; Lopez et al., 2008**). L'étude de la survie des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal est importante pour une meilleure connaissance du devenir de ces bactéries ingérées avec l'aliment et une meilleure compréhension de l'action des probiotiques chez l'Homme et l'animal. Il est probable que pour exercer un effet probiotique significatif, les bactéries doivent arriver vivantes et en nombre suffisant dans l'intestin (**Drouault et Corthier, 2001**).

Le règne végétal représente une source importante d'une grande variété de molécules bioactives en particulier les polyphénols qui sont doués de multiples vertus thérapeutiques. Ils jouent un rôle très important, principalement dans la lutte contre les cancers et les maladies cardiovasculaires (**Scalbert et al., 2005**). De nombreuses publications ont montré que la prise d'antioxydants tels que les polyphénols peut diminuer l'impact du stress oxydant sur le corps humain (**Scalbert et al., 2005**). D'autres études proposent l'utilisation de bactéries probiotiques pour diminuer le stress oxydant (**Afify et al., 2012; Li et al., 2012 ; Asemi et al., 2013**).

Notre travail s'articule autour de l'étude de la survie de *L.plantarum* S10 (culture libre et encapsulée) aux conditions de la digestion ainsi que l'évaluation de son activité antioxydante de plus, on s'intéresse à tester l'activité antioxydante des extraits phénoliques de

la fraise et du concombre et leur effets sur la viabilité et la survie de la bactérie lors de la digestion buco-gastro-intestinale.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique dans laquelle, nous traitons toute donnée utiles sur les probiotiques, leur survie, leur activité antioxydante, avec en second lieu un aperçu sur les jus comme matrice alimentaire véhiculant les probiotiques.

La seconde partie du document traite les principes généraux des méthodes utilisés à savoir :

- Les différents tests de survie.
- La mise en évidence de l'activité antioxydante des extraits bruts de polyphénols
- La mise en évidence de l'activité antioxydante de la bactérie

Et enfin, la troisième partie du manuscrit présentera les résultats et discussion des principales parties de cette étude.



Etude
Bibliographique

I.1. Historique et définition des probiotiques

L'appellation « probiotique » est d'usage relativement récent, mais l'idée d'ingérer des micro-organismes exogènes afin de moduler favorablement le microbiote endogène, qui constitue la base du concept des probiotiques, n'est pas nouvelle. Le biologiste Russe, titulaire du prix Nobel de physiologie ou médecine **Ilya Ilyrich Mechnikov (ou Élie Metchnikoff)** a proposé en **1907**, que l'ingestion de bactéries lactiques peut réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie et pour lui, la consommation de *Lactobacillus* influençait positivement la microflore intestinale, diminuait la « putréfaction » et les activités toxiques microbiennes. (**Hill et al., 2014**).

Le terme probiotique provient de deux mots Grecs, *pro* et *bios*, qui signifient littéralement « en faveur de la vie ». Ce terme a été introduit en **1953** par **Werner Kollath** pour décrire les compléments alimentaires organiques et inorganiques appliqués à rétablir la santé de patients souffrant de malnutrition et différencier ces « probiotiques » des antibiotiques. Depuis cette époque, le terme a connu une évolution de définition. Ainsi, **Fuller en 1989**, a défini les probiotiques comme, complément alimentaire microbien vivant qui apporte un avantage à l'hôte en améliorant son équilibre intestinal (**Behnsen et al., 2013**).

Cette définition a été largement utilisée par l'ensemble du monde scientifique, cependant depuis **2001**, la **F.A.O** (Food and Agriculture Organisation) et l'**O.M.S** (Organisation Mondiale de la Santé) officialisent la définition du terme « probiotique » : des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte » (**FAO/WHO, 2001 ; Hill et al., 2014**).

I.2. Critères de sélection des probiotiques

Pour être considéré comme probiotique, un micro-organisme doit posséder différentes caractéristiques. Il doit être une souche non pathogène, non toxique et non allergisante (**Hill et al., 2014**). Pour être à usage humain, les probiotiques doivent présenter une innocuité totale pour l'hôte et bénéficier du statut GRAS (Generally Recognized As Safe), défini par la **F.D.A** (Federal Drug Administration) aux États-Unis et/ou du statut de présomption d'innocuité reconnue ou QPS (Qualified Presumption of Safety) défini par l'**E.F.S.A** (European Food Standard Agency) en Europe (**Klaenhammer et Kulen, 1999; Dunne et al., 2001**).

Un probiotique doit être vivant et actif dans l'environnement digestif. Ainsi, il doit être résistant à l'acidité gastrique et aux sels biliaires afin de pouvoir exercer ses effets bénéfiques dans le tractus gastro-intestinal (**Dunne et al., 2001**). Il est difficile, voire même impossible, de sélectionner une

souche probiotique idéale remplissant la totalité des critères de sélection (Tufarelli et Laudadio , 2016). Le tableau 1, regroupe les critères de sélection des souches probiotiques.

Tableau 1 : Critères de sélection des souches probiotiques (Tripathi et Giri, 2014).

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> -Identification taxonomique exacte -Non toxique, non pathogène, GRAS et/ou QPS -Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> -Adapté à une production de masse et un stockage Viabilité des populations élevée dans le produit commercialisé (10^6 à 10^8 UFC/g) -Stabilité des caractéristiques désirées pendant la préparation et le stockage -Qualités organoleptiques souhaitables (ou pas de qualités indésirables) lorsqu'ils sont inclus dans des aliments ou des procédés de fermentation -Génétiquement stable
Compétitivité	<ul style="list-style-type: none"> -Survie et activité métabolique au niveau du site cible <i>in vivo</i> -Tolérance à l'acidité, aux sels biliaires et aux enzymes digestives -Capable de rivaliser avec le microbiote résident et les métabolites fermentaires -Adhésion et colonisation potentielle
Performances et fonctionnalités	<ul style="list-style-type: none"> -Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé (efficacité documentée et prouvée dans des études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> contrôlées chez l'Homme) -Action antagoniste vis-à-vis de bactéries pathogènes -Production de substances anti-microbiennes et/ou bioactives (enzymes, peptides, bactériocines, peroxyde d'hydrogène, acides organiques ou autres composés inhibiteurs) -Propriétés immunostimulantes -Anti-mutagène et anti-cancérigène

I.3.Principaux microorganismes probiotiques

Les probiotiques sont des bactéries ou des levures ingérées vivantes, présentes ou non dans le microbiote intestinal résident. Les micro-organismes probiotiques (Tableau 2), sont principalement des bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, avec d'autres espèces non pathogènes *E. coli* Nissle 1917, certaines souches de *Bacillus subtilis* et les levures du genre *Saccharomyces* sont également considérés comme des probiotiques (Caselli et al., 2013). Les

probiotiques représentent aujourd'hui un poids économique majeur (39 milliards d'euros par an dans le monde) en constante augmentation, cette dynamique étant soutenue par le lien existant entre l'alimentation et les bénéfices santé (Caselli *et al.*, 2013).

Tableau 2. Les espèces de bactéries probiotiques
(Borriello, 2002; Champagne, 2005 ; Gbassi, 2010; Kenny, 2010).

Principales espèces de bactéries lactiques			Espèces de bactéries non lactiques	Espèces de levures	
Lactobacilles (<i>Lactobacillus</i>)	Bifidobactéries (<i>Bifidobacterium</i>)	Autres bactéries lactiques			
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. magnum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. coli</i> ('Nissle 1917')	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. amylovirus</i>	<i>B. angulatum</i>	<i>B. merycicum</i>			
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. minimum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Propionibacterium freudenreichi</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. asteroides</i>	<i>B. pseudolongum ssp</i>	<i>Lactococcus lactis</i>		
<i>L. casei</i>	<i>B. boum</i>	<i>B. psychraerophilum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
<i>L. cellobius</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. pullorum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>		
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. ruminantium</i>	<i>Sporolactobacillus</i>		
<i>L. curvatus</i>	<i>B. catenulatum</i>	<i>B. saeculare</i>	<i>s</i>		
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. choerinum</i>	<i>B. suis</i>	<i>inulinus</i>		
<i>L. farciminis</i>	<i>B. coryneforme</i>	<i>B. thermacidophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. cuniculi</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>		
<i>L. gasseri</i>	<i>B. denticolens</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>		
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. dentium</i>	<i>B. scardovii</i>			
<i>L. helveticus</i>	<i>B. gallicum</i>	<i>B. subtilis</i>			
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. gallinarum</i>				
<i>L. paracasei</i>	<i>B. indicum</i>				
<i>L. plantarum</i>	<i>B. infantis</i>				
<i>L. reuteri</i>	<i>B. inopinatum</i>				
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. lactis</i>				
	<i>B. lacterosporus</i>				
	<i>B. longum</i>				

I.4. Mode d'action des probiotiques

Les probiotiques jouent un rôle majeur dans le maintien de l'équilibre et de la stabilité du microbiote intestinal, principalement, en empêchant l'infection, la croissance de bactéries potentiellement nocives et en améliorant la réponse immunitaire. D'une manière générale, les probiotiques sont capables d'exercer leurs effets bénéfiques selon trois mécanismes principaux comprenant (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

- (i) Effet barrière ;
- (ii) Amélioration de la fonction barrière de la muqueuse intestinale ;
- (iii) Modulation du système immunitaire.

L'effet barrière peut être lié à la modulation du microbiote de l'hôte (Figure 1), la résistance à la colonisation des bactéries pathogènes peut être également traduite par la synthèse de molécules antimicrobiennes telles que les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène et l'acide lactique, la production de métabolites tels que les acides gras à courte chaîne qui induisent la diminution du pH local de manière à créer un environnement défavorable aux pathogènes, ou les biosurfactants à activité antimicrobienne (Butel, 2014^a).

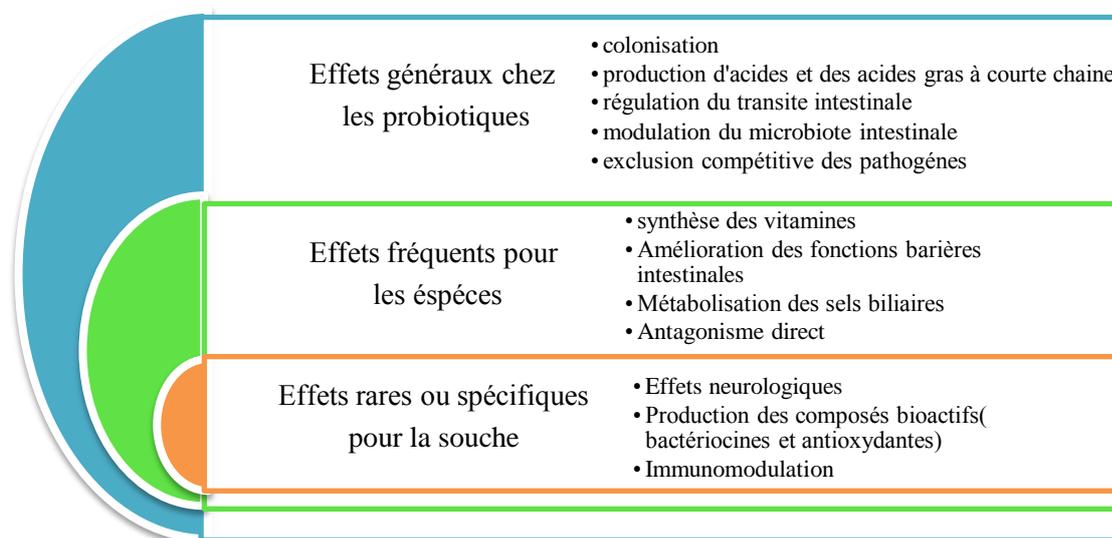


Figure 1 : Mécanismes d'action des probiotiques et leurs fréquences (Hill *et al.*, 2014).

L'amélioration de la fonction barrière de la muqueuse intestinale est liée au renforcement des jonctions serrées, à l'augmentation du renouvellement entérocytaire, à la stimulation de la synthèse de la mucine, à la sécrétion de peptides antimicrobiens comme les β -défensines, lysozyme et à la synthèse des vitamines (Alexandre *et al.*, 2014). La modulation du système immunitaire est très importante pour la prévention et le traitement des maladies infectieuses, mais aussi pour le traitement de l'inflammation (chronique) du tractus digestif (Butel, 2014^b).

I.5. L'espèce *Lactobacillus plantarum* comme probiotique

I.5.1. Généralité sur l'espèce :

Lactobacillus plantarum (*L. plantarum*) est une bactérie lactique, Gram positif en forme de bâtonnet. On la trouve communément dans diverse niches écologiques comme les produits laitiers, les légumes, les vins, le tractus gastro-intestinale, les cavités vaginales et urovaginales et aussi dans la cavité buccale de l'Homme, dans les eaux usées et dans les levains naturels (Siezen *et al.*, 2010).

Elle peut se développer à des températures comprises entre 15 et 45 °C et à des niveaux de pH aussi bas que 3,2. *L. plantarum* est un hétérofermentaire facultatif qui fermente les sucres pour produire de l'acide lactique, de l'éthanol ou de l'acide acétique, et du dioxyde de carbone dans certaines conditions. En fonction de la source de carbone, ces bactéries peuvent passer d'un mode métabolique hétérofermentaire vers l'homoférentaire (**Khemariya et al., 2016**).

Cette bactérie est tolérante aux acides et aux sels biliaires, ce qui lui permet de survivre au passage dans le tractus gastro-intestinal humain (**Vesa et al., 2000**). Une autre fonction qui doit être soulignée est la capacité de *L. plantarum* à produire diverses bactériocines, qui sont des peptides antimicrobiens avec des applications possibles comme conservateurs alimentaires (**Taale et al., 2016**).

L. plantarum a un génome qui est constitué d'un chromosome circulaire de 3,3 Mb, ce chromosome est composé de 3052 gènes codant pour des protéines et plus de 2500 protéines prédites avec fonction biologique assignée (**Wassenaar et al., 2014**). La séquence nucléique des protéines de *L. plantarum* sont très similaires à celles des autres bactéries Gram positives, car elles ont une faible teneur en GC, et sont organisées de manière colinéaire (**Jose et al., 2015**).

I.5.2. Le potentiel probiotique de *L. plantarum*

Les souches de *L. plantarum* ont montré de bonnes aptitudes probiotiques *in-vitro* et *in-vivo*, elles sont considérées comme souches probiotiques. Elles sécrètent des composés antimicrobiens, tels que la bactériocine, qui inhibent la croissance de colonies pathogènes Gram positives et Gram négatives (**Chang et al., 2016**).

L. plantarum a également une bonne adhérence à la muqueuse épithéliale de l'intestin humain, ce qui lui permettra d'entrer en compétition avec les bactéries pathogènes Gram positives et Gram négatives pour l'occupation des sites et pour les nutriments (**Santarmaki et al., 2017**). En plus de ce qui est cité, elle a une bonne tolérance aux milieux à bas pH et aux fluctuations de températures (**Ait Seddik et al., 2017**).

I.5.2.1. Survie de *L. plantarum* dans le tube digestif

Après ingestion par voie orale, les bactéries rencontrent un certain nombre de systèmes de défense humain associés aux différentes sécrétions à travers le tube digestif. Le premier système de défense est la présence du lysozyme et de l' α -amylase dans la cavité buccale qui présentent une activité antimicrobienne, au delà, les bactéries subissent l'effet de la présence d'un milieu à pH faible (entre 2,0 et 3,0) et des enzymes protéolytiques telles que la pepsine. Dans l'intestin grêle, les probiotiques

auront à s'adapter et résister à l'augmentation du pH vers 8,0 et la sécrétion de sels biliaries et des sucs pancréatiques (**de Vries et al., 2006**).

Concernant la survie au niveau buccale, un nombre très faible d'études a été réalisé sur la tolérance des souches de *L.plantarum* au lysozyme. **Zago et al. (2011)** ont travaillé sur 27 souches de *L.plantarum* et ont trouvé qu'uniquement 15 souches présentaient une meilleure tolérance au lysozyme ($\geq 68\%$ du taux de survie). Cependant **Golowczyc et al. (2010)** ont trouvé un taux de survie de *L. plantarum* CIDCA83114 proche de 100%.

Au niveau stomacal, plusieurs souches de *L.plantarum* ont montré une haute tolérance à l'acide hydrochlorique en présence et en absence de la pepsine (0.03%), en contre partie, un grand nombre de souches a montré une diminution de leurs taux de survie dans le milieu à pH2.0, en présence ou en absence de la pepsine. **Zago et al. (2011)** n'ont trouvé aucune diminution significative de la population de 27 souches testées lorsque le pH a diminué de 5,0 à 2,5 au cours des 60 minutes d'incubation. En général, la plupart des études ont rapporté un taux de mortalité élevé de *L. plantarum* en présence du pepsine, probablement en raison de l'hydrolyse du peptidoglycane présent dans leur paroi cellulaire (**Zhu et al., 2006**).

Au niveau intestinal, le taux de survie de différentes souches de *L. plantarum* est proche de 100% à des concentrations allant jusqu'à 0,5% de sels biliaries pendant 4 h (**Melgar-Lalanne et al., 2012**). Certains souches ont survécu à des conditions de stress biliaries (1,0% de sel de bile, pH 8,0) pendant 24 h (**Wang et al., 2010 ; Jamaly et al., 2011; Zago et al., 2011**). Dans d'autres études, la présence de la pancréatine et 1% de sels biliaries, n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de survie de souches de *L. plantarum* (**Michida et al., 2006; Botes et al., 2008; Jiménez- Pranteda et al., 2011**).

I.6. L'encapsulation des bactéries probiotique

La micro-encapsulation se définit comme une technique qui vise à piéger une substance bioactive dans une matrice afin de la protéger et/ou contrôler sa libération (**Eratte et al., 2018**). Cette technique a été constamment développée, améliorée, modifiée et adaptée à une multitude de domaines (cosmétique, pharmaceutiques, agroalimentaire, textile, peinture, électronique, imprimerie...) (**De Prisco et al., 2016**).

Elle a été introduite dans le domaine de la biotechnologie (la production des enzymes, biomasses, etc.) pour rendre les processus de production plus efficaces lorsque la matrice autour des cellules ce qui permet une séparation rapide et efficace des cellules productrices et les métabolites (**Martín**

et al., 2015). La micro encapsulation offre ainsi des solutions nouvelles aux problèmes de stabilité de composés actifs fragiles tels que les vitamines, les polyphénols, les peptides d'intérêt thérapeutique et les microorganismes (**Mueller et al.**, 2018).

I.6.1. Techniques d'encapsulation des probiotiques

Diverses techniques de micro-encapsulation des cellules viables ont été employées, utilisant des polymères naturels et synthétiques (tableau 3). Cependant, les matériaux et les conditions de formulation utilisés devraient être doux et non toxiques. Ceci permettra d'assurer la viabilité des probiotiques, lorsque ces derniers sont destinés pour l'administration orale (**Shori, 2017**).

Tableau3 : Biomatériaux et biopolymères utilisés dans l'encapsulation.

Origine Nature	Végétale	Marine	Animale et Microbienne	Références
Polysaccharides	Amidon	Carraghénane	Dextran	(Loveleen et al., 2015) (Qurat et al., 2013) (Iravani et al., 2014)
	Cellulose	Alginate	Chitosan	
	Pectine	Agarose	Gomme gellane	
	Gomme arabique		Gomme xanthane	
	Gomme caroube			
Protéines	Gluten		Caséines	(Renard et Reddy 2007)
			Protéines de lactosérum	
			Collagène	
			Gélatine	
			Albumines	
Lipides	Huile de palme hydrogénée			(Renard et Reddy 2007)
	Huile de ricin hydrogénée			
	Lécithine (soja)			
	Cire			

Plusieurs types de biomatériaux sont utilisés pour l'encapsulation des probiotiques et chacun a des avantages et des inconvénients. L'alginate est reconnue par sa disponibilité; non toxicité et son faible cout mais elle présente certains inconvénients, sensible à l'environnement acide à l'inverse du Chitosan et l'Amidon qui sont résistants aux conditions du tractus gastro-intestinal et présentent une capacité de livraison des probiotiques dans le côlon (**Shori, 2017**).

Parmi les véhicules naturels utilisés pour la livraison des cellules probiotiques, les protéines du lait ont une excellence propriété de gélification. Pour le Carraghénane, les billes obtenues à l'aide de ce polymère sont incapables de résister au stress et sont fragiles, les biomatériaux lipidiques ont été rarement utilisés pour l'encapsulation des probiotiques (**Renard et Reddy, 2007**).

Les techniques d'encapsulation appliquées aux probiotiques peuvent être classées en 2 groupes (figure02), en fonction du procédé utilisé pour former les billes, l'Extrusion (procédé de gouttelettes) et l'émulsion ou système à deux phases. Les deux techniques d'extrusion et de l'émulsion augmentent la survie des bactéries probiotiques jusqu'à 80-95% (Maleki *et al.*, 2015).

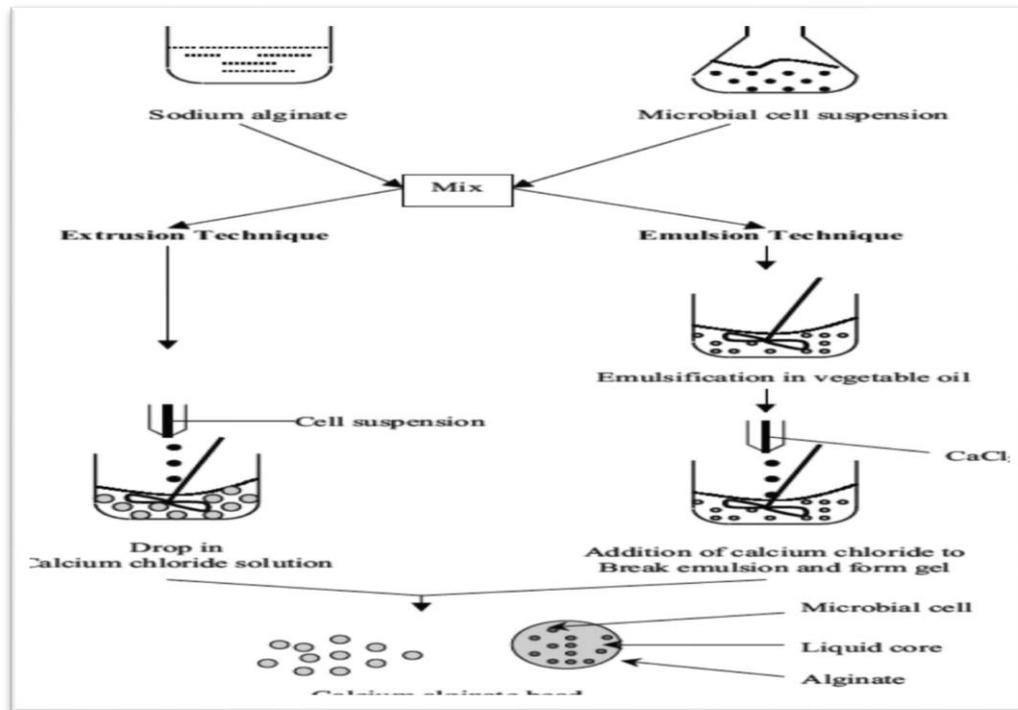


Figure 2 : Techniques d'extrusion et d'émulsification (Maleki *et al.*, 2015).

I.6.1.1. Technique d'extrusion : Dans l'extrusion, la solution colloïdale (à base de biopolymère) est mélangée à la suspension microbienne. Le mélange obtenu est introduit dans un dispositif d'extrusion, en générale une seringue. Une pression exercée sur le piston de la seringue laisse tomber goutte à goutte le contenu de la seringue dans une solution gélifiante, sous une faible agitation. La taille et la forme des gouttes dépendent du diamètre de l'aiguille, et de la distance séparant l'aiguille de la solution gélifiante (Martín *et al.*, 2015).

L'extrusion est une méthode simple de réalisation aisée, permettant la rétention d'un nombre élevé des cellules microbiennes, des procédés automatisés exploitant ce principe sont disponibles de nos jours (Eratte *et al.*, 2018).

Chapitre II. Les probiotiques et les matrices alimentaires

II.1. Aliments et antioxydants naturels

L'oxydation représente un processus indispensable dans le métabolisme des cellules aérobies de l'organisme. Elle met en jeu la molécule d'oxygène dont la production par des voies métaboliques non contrôlées engendre la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que les radicaux libres superoxyde $O_2^{\bullet-}$, hydroxyl HO^{\bullet} , alkoxy RO^{\bullet} et peroxy RO_2^{\bullet} . Ces radicaux sont impliqués dans le stress oxydant qui est caractérisé par un déséquilibre entre la production des ERO et l'élimination de ces espèces (Serigne *et al.*, 2015).

Les dommages oxydants sont causés par l'attaque des radicaux libres sur diverses biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort de cellules (Ghedadba *et al.*, 2015). Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation d'un substrat oxydable (Chiha *et al.*, 2016).

Les antioxydants alimentaires ont des rôles importants dans le corps humain en neutralisant les processus d'oxydation et en prévenant les maladies chroniques liées au stress oxydatif (Cömert et Gökmen, 2018). Ils se trouvent dans un grand nombre d'aliments : poivrons, goyave, oseille, citron, orange, kiwi, chou, papaye, fraise, huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, margarine, œuf, foie, poisson, œuf, poissons, viandes, fruits de mer, viandes, pain complet, fruits et légumes, vin, thé...etc. L'effet préventif de ces aliments résulte de la présence d'un éventail de molécules, dont les polyphénols, les caroténoïdes, certaines vitamines et oligo-éléments (Karlund *et al.*, 2015).

II.1.1. Les polyphénols des fraises et concombre comme antioxydants

Les polyphénols sont définis comme un groupe complexe et très varié de substances naturelles d'origine végétale, qui résultent des métabolites secondaires des plantes, ces composés sont reconnus par leur forte bioactivité, qui se traduit au niveau de l'organisme par une large gamme de propriétés biologiques (Adriouch *et al.*, 2017).

Les fraises ont une teneur particulièrement élevée en polyphénols comparativement aux autres fruits, elles sont classées au premier rang pour la capacité antioxydante. En général, les fraises sont riches en flavonoïdes tels que les anthocyanines qui ont démontré le plus haut pouvoir antioxydant et en flavonols (quercétine et myricétine), et en acides phénoliques (Basu *et al.*, 2014). Des études ont démontré la présence de composés phénoliques ayant une légère activité antioxydante dans le

concombre (Chu *et al.*, 2002). La teneur en composés antioxydants dans le concombre est cependant plus faible que celui d'autres légumes et fruits fréquemment consommés comme les fraises et le persil (Stratil *et al.*, 2006).

II. 2. Mécanisme d'action des polyphénols

Ces métabolites possèdent des propriétés sur l'organisme humain, principalement comme antioxydants, antiallergiques, anti-inflammatoires, anticancéreux, antihypertenseurs et antimicrobiens (Daglia, 2012). Ils exercent leur activité antioxydante selon plusieurs mécanismes. Les composés phénoliques ont des propriétés antioxydantes en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène, le processus est radicalaire (Sökmen *et al.*, 2012). Ils interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par la donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres selon un mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire. Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées (Stratil *et al.*, 2006).

II.3. Effets physiologiques des polyphénols

Selon des études *in vitro* combinées avec celles *in vivo*, il a été éclairé que la métabolisation des composés phénoliques débute dans l'intestin grêle suivi par l'absorption des parties biodisponibles et leurs modifications dans le foie ou autres organes (Manach *et al.*, 2005). Une fois ingérés, ils sont métabolisés et transformés en métabolites méthylés, glucuronés et sulfatés (Heleno *et al.*, 2015).

Les composés phénoliques montrent une relation réciproque avec la microflore colique, ils sont capables d'améliorer la santé du côlon et moduler la diversité microbienne, les polyphénols sont métabolisés au niveau du côlon soit par déconjugaison, déshydroxylation, et conversion à des acides phénoliques simples qui peuvent également entrer dans le système circulatoire (Velderrain-Rodriguez *et al.*, 2014 ; Ozdal *et al.*, 2016).

Le concept des trois P pour la santé intestinale, qui comprend les probiotiques, les prébiotiques et les composés phénoliques, a été récemment créé, et il favorise les composés phénoliques au même niveau biologique des prébiotiques (Marchesi *et al.*, 2015 ; Espín *et al.*, 2017).

II.4. Relation composés phénoliques et bactéries

Il est crucial de comprendre l'effet inhibiteur ou effet stimulant des composés phénoliques sur les bactéries bénéfiques ou pathogènes, et leur rapport dans l'intestin. Il y a plusieurs études faites sur l'effet des composés phénoliques sur le microbiote intestinal (**Duda-Chodak, 2012; Kawabata et al., 2013; Etxeberria et al., 2015**). **Duda-Chodak (2012)** a analysé les effets des flavonoïdes sur six espèces bactériennes pathogènes et bénéfiques communément trouvées dans la microflore intestinale et il a trouvé que la quercétine, la rutine, naringénine, et l'hespérétine ont des effets inhibiteurs sur toutes les espèces bactériennes (micro-organismes pathogènes et probiotiques). Par ailleurs **Etxeberria et al. (2015)** ont montré que tous les composés phénoliques testés à l'exception de la rutine, étaient efficaces sur les souches pathogènes du microbiote intestinal, alors que les souches probiotiques de lactobacilles étaient relativement épargnées.

Dans une autre étude, il a été conclu que l'incubation des catéchines avec un microbiote sélectionné a entraîné une augmentation significative de la croissance du groupe *Clostridium* coccoides-*Eubacterium* rectale, *Bifidobacterium* spp., et *Escherichia coli*, alors qu'un effet inhibiteur significatif sur la croissance du groupe *Clostridium histolyticum* a été noté (**Kawabata et al., 2013**). Il est évident que la diminution de la croissance des souches pathogènes est liée aux effets antimicrobiens des composés phénoliques, la croissance des souches probiotiques pourrait être liée à la capacité à métaboliser ces composés phénoliques pour stimuler leur croissance (**Etxeberria et al., 2015**).

II.5. Probiotiques et activité antioxydante

Des études ont démontré que différentes souches de bactéries probiotiques exercent une capacité antioxydante de différentes manières. **La figure 3** montre les mécanismes de résistance de diverses souches probiotiques à des agents oxydants (espèces réactives d'oxygène).

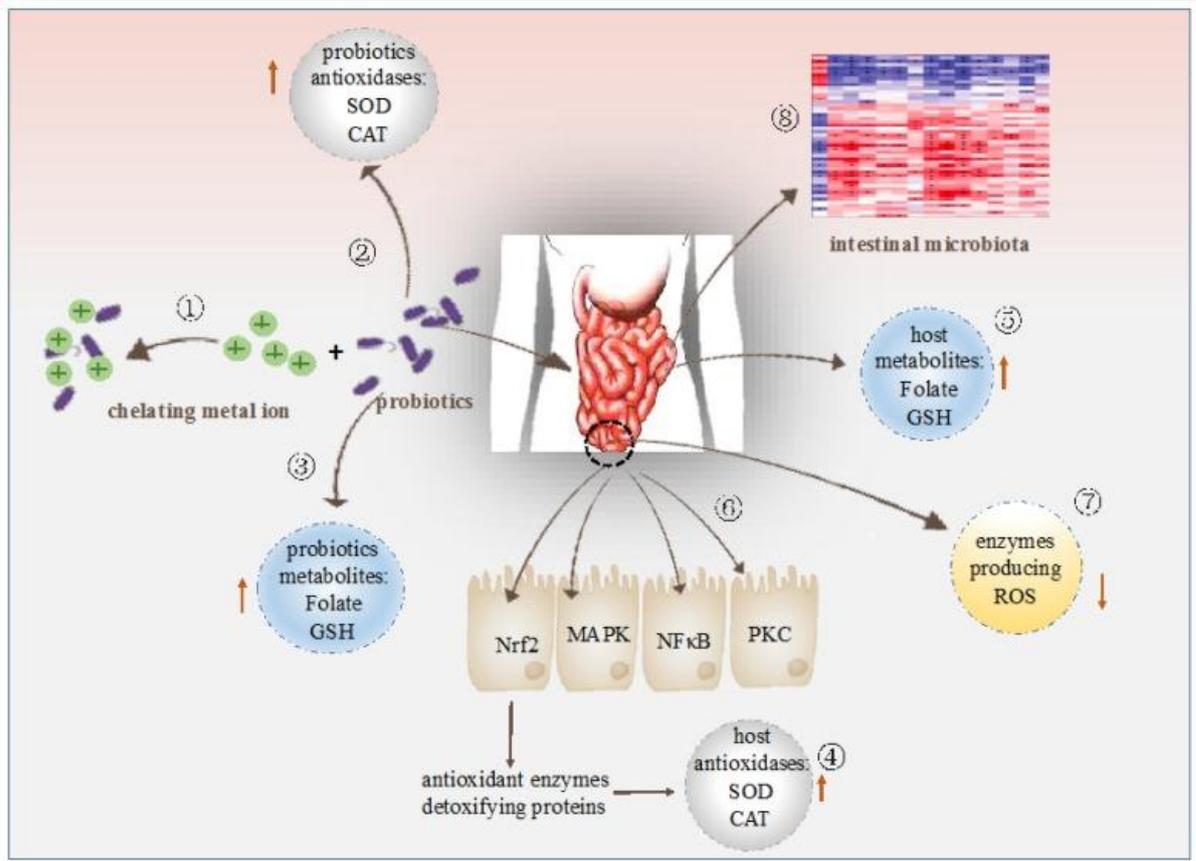


Figure 3 : Modulation de l'activité antioxydante par les probiotiques (Wang *et al.*, 2017).

(1) Chélation des ions métalliques. (2) Production des antioxydases des probiotiques. (3) Production des métabolites antioxydants. (4) Régulation de l'activité des antioxydases au niveau de côlon. (5) Stimulation de la production des substances antioxydantes par le côlon. (6) Régulation des voies de signalisation. (7) Inhibition des enzymes produisant des ERO. (8) Régulation de la composition du microbiote.

Parmi les mécanismes de résistance des probiotiques aux agents oxydants les plus fréquents sont :

- Les probiotiques peuvent produire divers métabolites ayant une activité antioxydante, tels que le glutathion (GSH), le butyrate et le folate (Vijendra *et al.*, 2015). Le folate est une vitamine qui est impliquée dans de nombreuses voies métaboliques (L'efficacité de la réplication, de la réparation et de la méthylation de l'ADN est affectée par la disponibilité de folate). Ahire *et al.* (2013), ont signalé que l'extrait intracellulaire de folate de *L. helveticus* CD6, a donné des potentiels antioxydants comparables à ceux de la cellule intacte. Le butyrate est un acide gras à chaîne courte (AGCC) produit par le microbiote dans le côlon et l'intestin grêle distal (Vijendra *et al.*, 2015). Les niveaux de métabolites antioxydants de

l'hôte peuvent également être régulés par un traitement probiotique, le niveau de GSH et la biosynthèse du GSH ont également été améliorés chez des rats traités avec des probiotiques, ce qui a permis de réduire le stress oxydatif d'une pancréatite aiguë (**Wang et al., 2017**).

- b. Comme les animaux, les probiotiques ont aussi leurs propres systèmes enzymatiques antioxydants. Un des meilleurs connus de ces enzymes est la SOD. Une étude explorant l'impact de l'ingénierie des souches BL23 de *L. casei* produisant de la SOD sur des souris atteintes de la maladie de Crohn a démontré que les souris recevant des souches d'ingénierie ont eu une récupération plus rapide de la perte de poids initiale, a augmenté les activités enzymatiques dans l'intestin, et une moindre ampleur de l'inflammation intestinale que les souris témoins (**Le Blanc et al., 2011**).

La catalase (CAT) participe à la défense antioxydante cellulaire en décomposant le peroxyde d'hydrogène, empêchant ainsi la génération de radicaux hydroxyles (**Spyropoulos et al., 2011**). Les bactéries lactiques sont généralement CAT négatives, cependant, une étude a prouvé qu'une CAT produite par *Lactococcus lactis* pourrait prévenir le cancer du côlon induit par la 1,2-diméthylhydrazine chez la souris (**De Le Blanc et al., 2008**).

II.6. Les aliments transmetteurs et protecteurs de probiotiques

Les aliments sont des transporteurs pour la livraison des probiotiques au corps humain, de plus, ils aident à protéger les probiotiques au cours du passage dans le tractus gastro-intestinal. La croissance et la survie des probiotiques dans le transit gastro-intestinal sont affectées par les propriétés physico-chimiques des transporteurs alimentaires. Cependant, une large gamme d'aliments, y compris les produits laitiers fermentés et non fermentés, crèmes glacées, fruits et légumes, jus de fruits et de légumes, beurre, les produits à base de céréales, aliments à base de viande (saucisses fermentées) ; les produits de boulangerie ; ont été enrichies en probiotiques et évalués en tant qu'excellentes matrices porteuses de micro-organismes (**Perricone et al., 2015**).

Le développement de nouveaux aliments probiotiques devrait tenir compte non seulement des caractéristiques intrinsèques des souches bactériennes, mais aussi de la capacité de la matrice alimentaire à protéger les cellules bactériennes à travers le tractus gastro-intestinal (**Drouaul et al., 2006**).

II.6.1. Les fruits et légumes comme véhicule de probiotique

Bien que, les produits laitiers sont reconnus comme le meilleur véhicule pour la livraison de probiotiques viables à l'intestin humain, le nombre croissant de personnes souffrant d'une intolérance au lactose, la dyslipidémie et le végétarisme renforce l'importance du développement des produits probiotiques non laitiers (**Garcia et al., 2016**). Les produits alimentaires crus ont récemment fait l'objet d'études approfondies en tant que substrats potentiels pour la production d'aliments probiotiques non laitiers (**Martins et al., 2013**).

Les produits d'origine végétale, tels que les fruits, peuvent être considérés comme des substrats idéaux pour les probiotiques car ils contiennent des nutriments tels que les vitamines, les minéraux, les glucides, les fibres et les composés antioxydants (**Bakr Shori, 2015**), ces aliments ne contiennent aucune substance allergène, présente dans les produits laitiers pouvant limiter leur consommation (**Martins et al., 2015**).

Les produits probiotiques à base de fruits sont fabriqués à partir d'ananas, de canneberge, de fraise, de citron vert, de mangue, de raisin, de pomme de cajou, d'olive et d'orange (**Panghal et al., 2018**). La demande croissante de nouveaux aliments probiotiques a stimulé le développement dans le monde entier aussi des produits non laitiers, principalement l'exploration de jus de fruits comme un moyen pour les probiotiques (**Santo et al., 2011**). Le chou végétal, la racine de carotte, la tomate, la betterave, l'oignon, le gingembre, les arachides, sont utilisés comme véhicules de probiotiques. Les bactéries comme *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* et *B. longum* peuvent être utilisées pour comme probiotiques dans les aliments à base de légumes (**Panghal et al., 2018**).

Cependant, il existe certaines limites qui pourraient empêcher la production de probiotique non laitiers au niveau industriel, comme les caractères sensoriels, l'acceptation globale et, plus important encore, la survie des probiotiques pendant le stockage (**Perricone et al., 2015**).



Etude
Expérimentale

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, durant la période Mai- Juin 2018. Ce travail avait pour objectifs de réaliser les points suivants :

Etudier la survie *in vitro* de *Lactobacillus plantarum* S10 (culture libre et encapsulée) dans des conditions similaires à celles bucco- gastro-intestinales, et évaluation de son activité antioxydante avant et après son passage à travers les trois étages digestifs. D'autre part, évaluer l'activité antioxydante des extraits phénoliques du concombre et de fraises, et tester leurs effets sur la viabilité, l'activité antioxydante et l'adhésion de la souche dans les mêmes conditions bucco-gastro-intestinales.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

Au cours de cette étude, nous avons utilisé ce qui suit :

- ✓ Une bactérie lactique, *Lactobacillus plantarum* codée S10 a été utilisée, cette dernière a été isolée du rumen de chèvre de race locale ;
- ✓ Un légume, le concombre et un fruit, la fraise ont été achetés du marché (1Kg). Ils ont servi pour la préparation de jus et d'extraits ;
- ✓ Les cellules épithéliales de l'espèce *Gallus gallus* ont été préparées au niveau du laboratoire et elles ont servi pour le test d'adhésion.

II.1.2. Les milieux de culture

Un seul milieu de culture avec les deux formes, bouillon et gélose a été utilisé. Il s'agit du milieu MRS (Composition en Annexe)

II.1.3. Produits chimiques et réactifs

La réalisation de notre étude a demandé l'utilisation de ce qui suit :

- ✓ **Les sels :** Chlorure de calcium CaCl_2 (0.5M et 0.3M) ; Chlore de potassium KCl (0.5M), Chlore de sodium NaCl (2M), Bicarbonate d'ammonium $\text{NH}_4 (\text{CO}_3)_2$ (0.5M), Carbonate de sodium (75g/ml), FeSO_4 , Trichlorure d'aluminium AlCl_3 (2%), $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (0.15M), KH_2PO_4 (0.5M), NaHCO_3 (1M).
- ✓ **Les acides, bases et alcool :** HCl (6M), NaOH (1M), Sels biliaires, Acide gallique, Méthanol .

- ✓ **Les enzymes, réactifs et autres :** Pepsine (2000U/ml), α -amylase (75U/ml), Phénophtaléine, Folin-Ciocalteu (1/10), 2,2-Diphényl- picrylhydrazyl DPPH°, Pancreatine, H₂O₂(9.8M), Alginate de sodium (1%), Phenotrauline.
- ✓ **Les Tampons:** Tampon phosphate salin PBS, Tampon phosphate potassique pH=07(2M).
- ✓ **Les colorants :** Violet de Gentiane, Lugol, Fushine, Cristal violet.

II.1.4. Appareillage

Lors de la réalisation de notre étude, nous avons utilisé ce qui suit :

- ✓ Bec Bunzen ;
- ✓ Autoclave (Sili 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 ;
- ✓ Agitateur magnétique chauffant (Heidolph MR 3002), Vortex (VWR) ;
- ✓ Réfrigérateur (ENIEM) ;
- ✓ Rotavapor(BUCHI) ;
- ✓ Microscope à caméra, Microscope optique.

II.2. Méthodes

II.2.1. Revivification de la souche

La revivification de la souche est effectuée par ensemencement dans du bouillon et gélose MRS, suivi d'une incubation à 37°C/24h. La pureté de *Lactobacillus plantarum* S10 a été vérifiée par observation macroscopique (aspects des colonies sur gélose) et observation microscopique (coloration de Gram).

II.2.2. Encapsulation de *L. plantarum* S10 dans un gel d'alginate de sodium à 1%

L'encapsulation de la bactérie a été effectuée en suivant le protocole décrit par **Sifour et al. (2012)** avec quelques modifications. 2ml d'une culture de 20h de la souche *L.plantarum* S10 (dans le bouillon MRS) a été centrifugé (15minutes, 50000g) et le culot obtenu a subi deux lavages à l'eau physiologique stérile, puis suspendu dans 10ml d'eau physiologique (suspension à encapsuler).

Cette suspension a été mélangée à 90ml de la suspension aqueuse d'alginate de sodium (1% pH7) préalablement stérilisée à l'autoclave (120°C, 20min) ce qui a permis d'obtenir un inoculum bactérien. Ce dernier a été introduit dans une seringue de 5ml surmontée d'une aiguille de taille (22G). La pression manuelle exercée sur le piston de la seringue, a permis de laisser tomber goutte à goutte le contenu de la seringue dans une solution stérile de CaCl₂ (0.5M, 300ml).

Après un temps de contact d'une heure, les gouttes gélifiées (les billes formées) obtenus ont été séparées de la solution de CaCl₂, cette dernière a été aspirée plusieurs fois à l'aide une micropipette.

Les billes obtenues ont été rincées deux fois avec l'eau distillée stérile, et conservées dans l'eau physiologique à 4°C jusqu'à leur utilisation.

II.2.3. Préparation des extraits et dosages (composés phénoliques et flavonoïdes)

Les composés phénoliques et flavonoïdes ont été extraits à partir du concombre et de la fraise par deux méthodes différentes : Extraction par macération dans le méthanol aqueux, extraction avec le méthanol recombiné avec un processus de centrifugation.

Pour la préparation de la matière première, les concombres et fraises ont subi un triage et un lavage à main, puis épluchés (concombre), broyés (mixeur) et enfin tamisés pour séparer la pulpe qui servira par la suite pour la préparation des extraits.

II.2.3.1. Extraction par macération dans le méthanol aqueux (extraction solide/liquide) à partir de la pulpe du concombre

La macération (extraction solide-liquide) est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale (broyat) dans le méthanol aqueux pour extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes).

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par **Hamia et al. (2014)** avec quelques modifications. Le protocole de la macération de ce légume est le suivant : 10g de la pulpe du concombre a été mis dans un bécher contenant 100 ml de méthanol aqueux (70/30 : v/v), le tout a été chauffé jusqu'à ébullition puis refroidi sous agitation. La mixture est laissée macérer pendant 24 h, ensuite filtré sur du papier filtre Wattman N°1. Le filtrat a été récupéré dans un flacon stérile. Pour optimiser l'extraction, la procédure a été répétée trois fois, par macération du retentât dans 100 ml de méthanol aqueux bouillant. Enfin, les macéras hydro-alcooliques de 3 jours sont placés dans un seul récipient.

Les macéras hydro alcoolique obtenus ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif, ou Rotavapor (**BUCHI**) à température de 45°C et une vitesse de rotation de 27/ min. Après élimination du méthanol, le ballon du rotavap a été retiré et laissé refroidir. Le contenu du ballon (l'extrait) a été recueilli dans de l'eau chaude (100 ml) puis laissé décanter pendant 24 h à température ambiante. Enfin, le contenu du ballon a été filtré sur papier filtre Wattman N°1 pour éliminer les boues (graisse et résine).

II.2.3.2. Extraction des composés phénoliques à partir des pulpes de fraises

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par **Michiels et al. (2017)**. Les polyphénols sont extraits par macération de 5g de la pulpe dans 15 ml de méthanol sous agitation à l'obscurité (condition réalisée par enrobage du bécher par du papier aluminium) pendant 60 min, ce qui empêche l'oxydation des composés phénoliques. Après centrifugation (20minutes, 5000g), le surnageant contenant les polyphénols est récupéré. Nous procédons à une deuxième extraction identique sur le culot pour extraire 30% de polyphénols supplémentaires (**Boizot et al., 2006**), donc obtenir un dosage plus exhaustif. Les surnageants sont mélangés avec 5ml de méthanol et stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

II.2.3.3. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits et des jus a été déterminée en utilisant la méthode du Chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) décrite par **Quettier-Deleu et al. (2000)** qui consiste à mélanger 1 ml d'extrait et 1 ml de la solution de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$ à 2% dans le méthanol). Le mélange est laissé 10 min à l'obscurité et à température ambiante. Après incubation, l'absorbance est mesurée à 415nm. Un témoin a été préparé en remplaçant l'extrait par le même volume du solvant d'extraction.

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait est calculée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine, elle est exprimée en milligrammes équivalent quercétine par gramme de matière sèche (mg E.Q/g MS).

II.2.3.4. Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénols totaux des extraits et des jus a été effectuée en utilisant le protocole décrit par **George et al. (2005)**.

A un volume de 250 µl de chaque extrait est ajouté 1.25 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10), après 2 min de repos dans l'obscurité, 1 ml de carbonate de sodium (75g/l) est ajouté, le tout est agité puis incubé pendant 15 min au bain Marie à 50 °C. Après cette période, le mélange

réactionnel est laissé refroidir. L'absorbance de la coloration bleue développée est mesurée à 750 nm.

Un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par le solvant d'extraction et la teneur en composés phénoliques de chaque extrait est calculée à partir de la courbe d'étalonnage préparée avec l'acide gallique, elle est exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

II.2.4. Détermination *in vitro* de l'activité antioxydante de *L. plantarum* S10

II.2.4.1. Préparation de la suspension bactérienne

La souche *L. plantarum* S10 a été cultivée sur bouillon MRS (1% : V / V) à 37 ° C pendant 18 h. Les cellules bactériennes ont été récoltées par centrifugation (6000 g, 10 min, 4 °C), lavée trois fois et mise en suspension dans le tampon phosphate salin (PBS). Le nombre de bactéries dans le culot cellulaire a été ajusté à une absorbance de 0.9 (environ 10⁹ UFC / ml) (Li *et al.*, 2012).

II.2.4.2. Préparation des surnageants cellulaires

Le bouillon MRS a été inoculé avec 1% (V / V) de la culture bactérienne puis mis à incuber à 37 °C pendant 18 heures. Le surnageant de la culture a été obtenu par centrifugation de la culture à 10 000 tours par minute pendant 5 minutes à 4 ° C (Afify *et al.*, 2012).

La suspension bactérienne et son surnageant ont été soumis aux différents tests antioxydants à savoir :

- a. **Résistance au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ Scavenging activity):** La méthode décrite par Li *et al.* (2012). a été appliquée. La culture d'une nuit de la *L. plantarum* S10 a étéensemencée à 1% (v / v) dans du bouillon MRS contenant 0.4, 0.7 et 1.0 mM de peroxyde d'hydrogène suivi d'une incubation à 37 C pendant 8 h. La croissance cellulaire a été mesurée par spectrophotométrie (specord plus) à 600 nm. Les résultats ont été donnés en densité optique (DO). La culture sur bouillon MRS a été utilisée comme témoin.
- b. **Activité de piégeage des radicaux hydroxyles :** L'essai de piégeage des radicaux hydroxyles a été réalisé par application de la méthode décrite par Zhang *et al.* (2011). Brièvement, à un mélange de réaction contenant 1 ml de Phenotrauline (0.75mM), 1 ml de FeSO₄ (0,75 mM), 1ml de H₂O₂ (0,01% : v / v) et 1,5 ml du PBS (0,15M), 1ml de chaque préparation (suspension bactérienne, surnageant) a été ajouté et le tout a été incubé à 37°C pendant 30 min. Après cette période d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 536 nm. Le

changement d'absorbance du mélange réactionnel indique la capacité de piégeage des radicaux hydroxyles par *L. plantarum* S10.

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

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [(A_s - A_0) / (A - A_0)] \times 100$$

Avec :

A_s : l'absorbance l'échantillon.

A_0 : l'absorbance du témoin.

A : l'absorbance sans l'échantillon et le système de réaction.

- c. **Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)** : Ce test a été mesuré en utilisant le mode opératoire décrit par Heo *et al.* (2005). Pour 500µl de chaque préparation bactérienne, 3 ml d'une solution fraîchement préparée de 2,2-diphényl-2-picryle hydrate de hydrazyl (DPPH) (0.05mM) a été ajouté, le mélange a été incubé en obscurité pendant 30 min. Après cette période, l'absorbance a été mesurée à 517nm.

Une suspension contienne que du Méthanol et des cellules a servi de blanc et un contrôle a été préparé en remplaçant les 500 µl de la préparation bactérienne par du méthanol.

Les lectures ont été faites en triple exemplaire et la valeur d'absorbance moyenne a été calculée.

Le pourcentage d'activité de piégeage des radicaux a été calculé selon l'équation

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

Avec :

A sample : absorbance d'échantillon

A blank: absorbance du blanc

A contrôle : absorbance du contrôle

II.2.5. Comportement des billes dans une solution de KH_2PO_4

Le protocole consiste à préparer deux solutions de KH_2PO_4 (0,2M) avec des pH simulants celui des conditions stomacales (solution de KH_2PO_4 :0,2M à pH2 et à pH3) et celui intestinal (solution de KH_2PO_4 : 0,2M à pH7). Par la suite, évaluer le comportement des cellules de *L.plantarum* S10 emprisonnées dans des billes d'alginate de sodium dans les deux milieux.

Pour se faire, chaque gramme de billes a été introduit dans un volume de 9 ml de la solution de KH_2PO_4 aux différents pH et l'ensemble a été incubé à 37°C. Après 2h, 4h, 24h et 48h d'incubation,

l'absorbance a été mesurée à 600nm. Les solutions de KH_2PO_4 aux différents pH ont servis de blanc.

II.2.6. Activité antioxydante des différents extraits

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par un seul test, l'activité anti radicalaire DPPH°. La mesure de l'activité anti radicalaire DPPH a été effectuée par application de la méthode décrite par **Brand-Williams et al. (1995)**.

A un volume de 50 μl de chaque extrait est ajouté 2 ml de la solution méthanolique de DPPH préparée à 0.004%. Le mélange est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min et la décoloration est mesurée à 517 nm contre un blanc, contenant le DPPH• et le solvant d'extraction. Un contrôle est préparé avec un mélange de 50 μl de méthanol et 2 ml de DPPH°.

Et le Trolox est utilisé comme étalon d'activité antioxydante

Le pourcentage d'inhibition du DPPH° des extraits a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH}^\circ = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: absorbance du control;

A_{extrait} : absorbance de l'extrait.

II.2.7. Fabrication des jus de concombre et de fraises et fermentation

II.2.7.1. Préparation des jus

Les deux jus sont préparés de la même méthode, pour le légume aussi bien que pour le fruit 500g a été lavé (les deux matières premières) et épluché (pour le concombre), coupés et broyés (mixeur), addition d'un volume d'eau stérile, puis chaque produit a été congelé (une nuit), suivi d'une décongélation et centrifugation pour but de clarifier les jus, les jus ainsi récupérés sont mis dans des flacons stériles. L'ensemble a été stérilisé par trempage dans un bain Marie réglé à 95°C pendant 20min (**Breidt et Caldwell, 2011**).

II.2.7.2. Fermentation des jus et évaluation de quelques paramètres

Pour chaque flacon de jus déjà stérilisé, nous procédons à son ensemencement soit par la souche *Lb.plantarum* S10 libre (5%) ou par la culture encapsulée (les billes : 5%). La fermentation a été lancée à l'étuve agitatrice pendant 24heures.

Durant la fermentation des jus, nous avons suivis trois paramètres, le pH, l'acidité et le nombre de cellules viables, cela lors de l'ensemencement puis après 2h, 4h et 24h d'incubation à 37°C.

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH mètre (HANNA), en prolongent l'électrode du pH mètre dans 20 ml des jus et la valeur affichée sur l'écran a été notée (AOAC, 2000).

La mesure d'acidité a été effectuée par la titration de 10 ml de jus en présence de 10 gouttes de phénolphaléine, avec du NaOH (0.1N) (Idoui, 2013).

La valeur est donnée selon l'équation suivante $\text{Acidité } (^{\circ}\text{D}) = V_{\text{NaOH}} \times 10$

Avec V_{NaOH} : Volume de la soude utilisé pour titrer les 10ml de jus

Le comptage des colonies lors de la fermentation des jus a été réalisé par la méthode de numération sur milieu solide (gélose MRS), en suivant les étapes suivantes : Nous commençons par la préparation des dilutions, en transférant 1ml de jus dans un tube à essai contenant 9ml d'eau physiologique, ainsi s'obtient la dilution 10^{-1} . Ce geste est répété jusqu'à aboutir à la dilution de 10^{-9} . Une fois les dilutions prêtes, nous procédons à l'ensemencement par étalement des boîtes de Pétri contenant la gélose MRS à partir de la dilution 10^{-9} . Les boîtes sont mises à incuber à 37°C pendant 24h. Le nombre d'UFC est calculé comme suit (Sharma *et al.*, 2013) :

Nombre (UFC) = la moyenne du nombre de colonies comptées sur deux boîtes \times l'inverse du facteur de dilution.

II.2.8. Mesure des activités antioxydantes de la bactérie après 24heures de fermentation

Après 24 h de fermentation, l'activité antioxydante des cellules de *L. plantarum* S10 a été évaluée. Les mêmes tests de l'activité déjà décrits en II.2.4. Ont été appliqués.

II.2.9. La digestion bucco-gastro-intestinale *in vitro*

Pour réaliser ce test, nous avons adopté la méthode décrite par Minikus *et al.* (2014). L'avantage de cette technique est la continuité de la digestion par écoulement et mélange des liquides de la bouche vers l'intestin.

II.2.9.1. 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 simulant la partie inférieure du tractus; solution de liquide intestinale). La composition des liquides est mentionnée dans le tableau 04. Les solutions préparées ont été autoclavées à 120°C pendant 15min.

Tableau 04. Composition des solutions simulées de la digestion (Minikus *et al.*, 2014)

	Solution mère ajoutée pour préparer 250ml (LS)	Solution mère ajoutée pour préparer 250ml (LG)	Solution mère ajoutée pour préparer 250ml (LI)
KCl (0.5M)	7.55mL	3.45mL	3.4mL
KH ₂ PO ₄ (0.5M)	1.85mL	0.45mL	0.4mL
NaHCO ₃ (1M)	3.4mL	6.25mL	21.25mL
NaCl (2M)	/	5.9mL	4.8mL
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ (0.15M)	0.25mL	0.2mL	0.55mL
NH ₄ (CO ₃) ₂ (0.5M)	0.03mL	0.25mL	/
HCl(6M)	0.045mL	0.65mL	0.7mL

II.2.9.2. Protocole expérimental de la digestion bucco -gastro-intestinale *in vitro*

Les étapes du protocole sont mentionnées dans la **figure 4**. Le protocole a pour but de tester la viabilité et la survie de la souche libre et encapsulée aux conditions bucco- gastro-intestinales et de tester l'effet des jus (matrices alimentaires comme véhicules de la bactérie probiotique) sur la viabilité et la survie de la souche libre et encapsulée aux mêmes conditions de la digestion, d'autre part tester la bio accessibilité des composés phénoliques des extraits à ces conditions, et l'effet de la combinaison de ces extraits avec la bactéries sur ses aptitudes à survivre dans les mêmes conditions.

Le schéma suivant, illustre la méthode adoptée pour réaliser ce test.

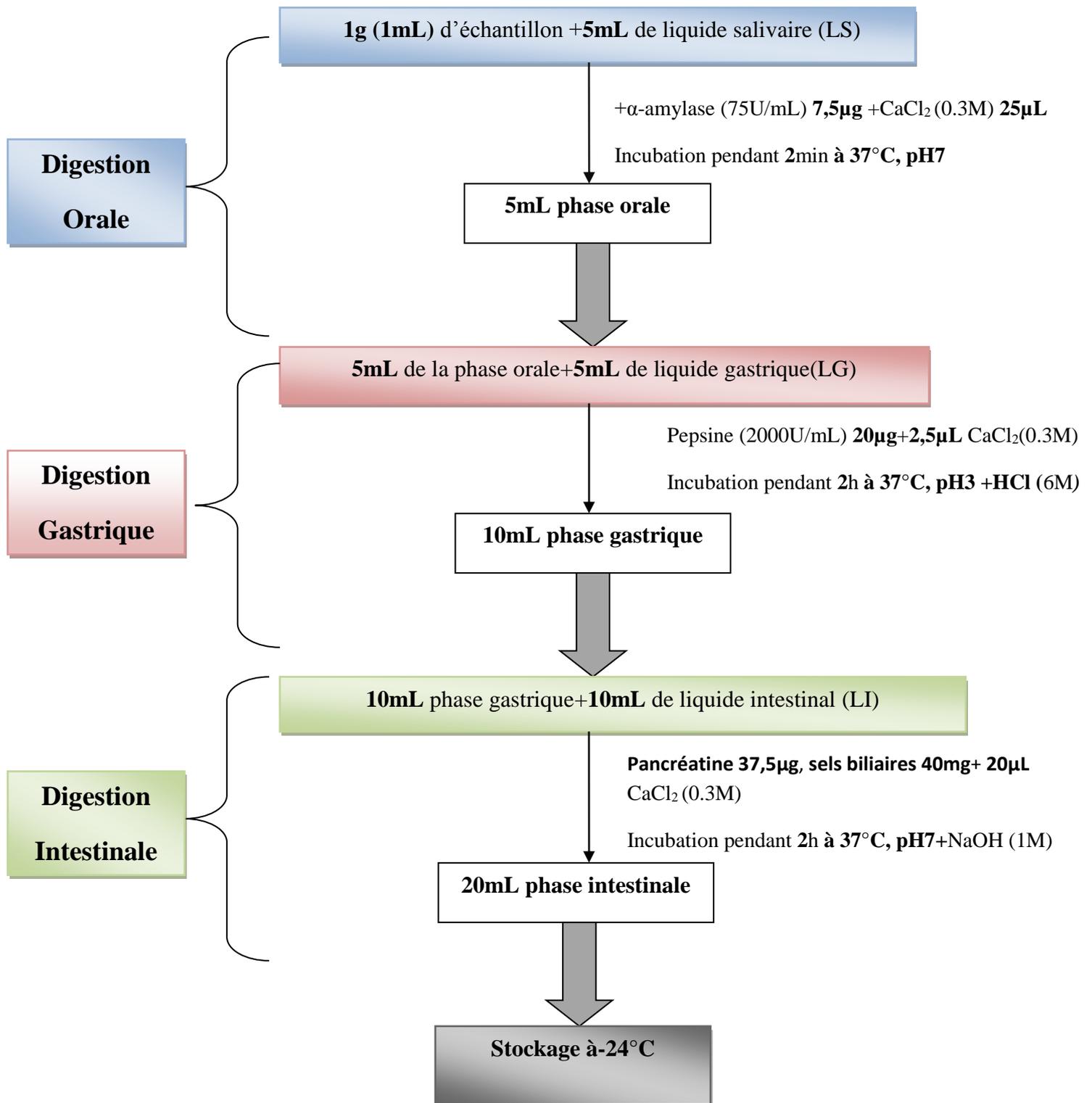


Figure 4. Schéma de la digestion bucco-stomaco-duodénale *in vitro*

a. Pour la culture libre et encapsulée : nous avons réalisé les tests suivants :

- ✓ Survie et viabilité de la culture libre et encapsulée après chaque phase de digestion ;
- ✓ Survie et viabilité de la culture à T= 0h dans les jus (Les jusensemencés par les billes sont laissés 1h à température ambiante avant la réalisation de ce test);
- ✓ Survie et viabilité de la culture après 24 h de fermentation.

La survie a été déterminée par la comparaison du nombre de bactéries après chaque phase de la digestion, avec le nombre initial.

La mise en évidence des résultats (le nombre de cellules viable) des trois tests est effectuée par :

- ✓ **Le dénombrement direct sur boîte de Pétri :** A l'aide d'une pipette stérile, nous prélevons 1ml de chaque contenu digestif que l'on introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, nous obtenons alors la dilution 10^{-1} , à partir de cette dernière on refait la même opération pour aboutir à la dilution 10^{-9} . L'ensemencement est réalisé en étalant en double 1ml de la dilution 10^{-9} en surface de la gélose MRS préalablement coulée et solidifiée. L'incubation s'est effectuée à 37°C pendant 48h. Après cette durée, on dénombre les colonies bactériennes (**Sharma et al.,2013**).

Une évaluation du nombre initial de cellules de la culture libre a été effectuée. De même, le dénombrement du nombre initial des bactéries encapsulées (dans un 1g de bille) a été effectué, en libérant les bactéries des capsules par séquestration des ions calcium par le tampon phosphate potassique (2M).

- ✓ **La mesure de la DO à 600nm :** Chaque échantillon de chaque étage digestif a été soumis à une lecture de sa DO à 600nm.
- ✓ **Le comptage des cellules par la cellule de Malassez :** Pour le comptage des cellules bactériennes viables, la technique décrite par **Sadok et al (2015)** a été appliquée:
 - **Préparation des micro-dilutions :** L'échantillon prélevé (contenu buccale, stomacale ou intestinale) a été bien homogénéisés et des micro-dilutions ont été préparées (100µl du l'échantillon dans 900µl de l'eau physiologique stérile). La micro-dilution a été poussée jusqu'à 10^{-9} .
 - **Préparation de la cellule de Malassez :** la lame a été rincée et séchée. Pour réaliser le remplissage de la cellule, nous avons humidifié les glissières latérales puis, nous avons déposé la lamelle sur les rebords. Enfin, l'extrémité de la micropipette a été placée contre la lamelle et l'inoculum a été délivré par capillarité.

- **Observation microscopique et comptage des cellules:** la cellule est portée au microscope optique à l'objectif $\times 100$, les cellules vivantes sont comptées, et le nombre de cellules a été calculé selon la formule suivante :

$$N_c = N_g \cdot 100.1/Z$$

Avec :

- **N_c** : nombre de cellules ;
- **N_g** : nombre de cellules comptées sous microscope optique ;
- **Z** : la dilution utilisée.

- ✓ **Évaluation de l'activité antioxydante :** Les mêmes tests mentionnés en **II.2.4.** ont été appliqués pour évaluer cette activité de la bactérie après la phase orale, la phase gastrique et la phase intestinale.

b. Test de digestion *in-vitro* des extraits : Ce test a été réalisé par le dosage des polyphénols et des flavonoïdes après chaque phase de digestion. Les mêmes méthodes décrites en **II.2.3.3, II.2.3.4** ont été appliquées.

c. Test de digestion *in-vitro* de la combinaison bactérie libre/extraits (du concombre et de fraise)

Ce test a également été réalisé, en évaluant la survie et la viabilité de la bactérie en présence de l'extrait après chaque phase de digestion. Les méthodes pour la mise en évidence des résultats sont les mêmes que celles utilisées avec la culture libre.

Dans le même objectif, nous avons procédé au dosage des polyphénols et des flavonoïdes après chaque phase de digestion avec usage des mêmes protocoles utilisés précédemment.

II.2.10. Test d'adhésion *in-vitro* aux cellules épithéliales

Le test est effectué en se basant sur la méthode décrite par **Lin et al. (2007)**.

- ✓ **Préparation de la culture bactérienne :** Les cellules bactériennes (culture d'une nuit de la souche *L.plantarum* S10) ont été récoltées par centrifugation (7000 g, 10 min, 4°C), lavées trois fois et mise en suspension dans le tampon phosphate salin PBS. Pour la standardisation de notre culture et afin de s'assurer que notre inoculum qui va servir pour le

test est à une concentration des cellules de 1×10^8 cellules/ml, nous nous sommes servi d'une cellule de comptage « cellule de Malassez » pour la standardisation.

- ✓ **Préparation des cellules épithéliales :** Pour la préparation des cellules épithéliales, un segment de l'iléum d'un poulet a été bien lavé et nettoyé puis ouvert et lavé avec du tampon phosphate salin stérile (PBS pH 7.2), ce dernier a été mis à 4°C pendant 30 min. Les cellules ont été récupérées dans du PBS, en grattant la surface tapissant ce segment intestinal par une lame stérile. Des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10^{-4} , cette suspension cellulaire a été examinée par microscope pour assurer qu'elle n'était pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales est approximativement 5×10^4 cellules/ml.
- ✓ **Réalisation du test :** 1ml de chaque culture est mélangé avec 1ml de la dilution 10^{-4} de la suspension des cellules épithéliales déjà préparée. Après incubation à 37°C pendant 40 minutes, une préparation de frottis et une coloration au cristal violet 0.5% pendant 5 min a été réalisée pour observer l'adhésion au microscope optique. Le test est considéré comme positif si le nombre de bactéries adhérentes est supérieur à 15.

Ce test sert de témoin pour la comparaison avec le test d'adhésion réalisé après passage de la bactérie dans les liquides simulant la digestion intestinale.

Pour le test expérimental, c'est-à-dire effet de la digestion sur la capacité d'adhésion, nous avons procédé comme suit : après passage du contenu buccal vers le contenu stomacal puis le tout vers le contenu intestinal, nous avons ajouté un volume équivalent en cellule épithéliale de la dilution 10^{-4} , le mélange est incubé à 37°C . Après 1h et 2h d'incubation, nous réalisons le même test cité en haut pour dénombrer les cellules adhérentes.

Après 1h d'incubation et après 2h d'incubation, nous préparons des frottis que nous colorons au cristal violet 0.5% pendant 5 min, puis nous passons à l'observation microscope pour dénombrer les cellules bactériennes adhérentes.



*Résultats et
Discussion*

III.1. Encapsulation de *L. plantarum* S10 dans un gel d'alginate de sodium à 1%

La souche *L. plantarum* est encapsulée dans l'alginate de sodium dont la forme des billes est de type sphérique ou ovale. La photo **01** illustre une masse des billes obtenues. Après libération des cellules emprisonnées, nous avons obtenu une concentration finale estimée à $7,33 \times 10^{13}$ cellules/bille. Le poids d'une bille est en moyenne de 5,67mg.



Photo01 : Photographie des billes d'alginate de sodium à 1%.

III.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique. Nous avons calculé la teneur en flavonoïdes des différents échantillons (extraits et jus), en utilisant une courbe d'étalonnage ($y = 24,15x + 0,057$ ou $R^2 = 0,999$) où la quercétine est considérée comme un standard.

D'après les résultats des teneurs en flavonoïdes illustrés par la figure **04**, nous avons constaté la présence d'une variété des teneurs en ce paramètre, non seulement entre les types des matières végétales (concombre, fraise), mais aussi entre leurs extraits.

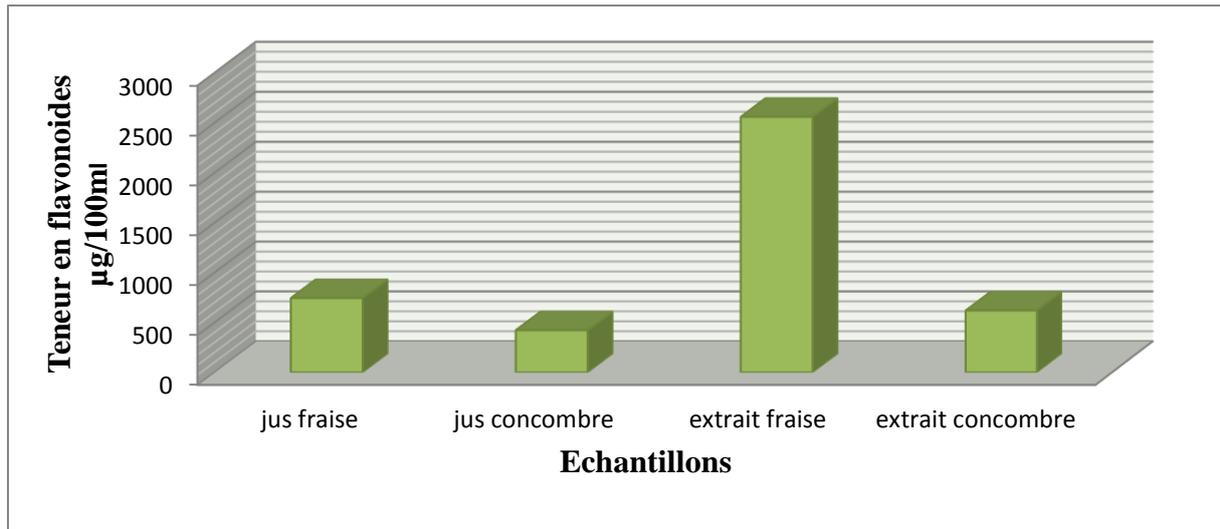


Figure04 : Teneurs en flavonoïdes dans les jus et leurs extraits.

Les résultats présentés dans la figure, montrent que les concentrations en flavonoïdes sont très différentes. La teneur en flavonoïdes dans le jus de fraise est de 744,53µg/100ml avec une concentration de 2560µg/100ml pour son extrait. **Arizaa et al. (2018)** ont trouvé des résultats proches aux nôtres avec une concentration en flavonoïdes entre 1983-2960 pour des extraits méthanolique des fraises.

La teneur en flavonoïdes dans la fraise est supérieure à celle du concombre, ou nous avons obtenu pour ce légume une teneur allant de 422µg/ml pour le jus et 620µg/ml pour l'extrait. **Carmona-Hernandez et al. (2018)** ont montré la présence des concentrations moyennes en flavonoïdes dans le concombre (640,03µg/ml).

Les différences entre les échantillons peuvent être liées aux conditions climatiques qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les flavonoïdes la région et la date de récolte ainsi que la méthode d'extraction et les solvants utilisés (**Fallah et al., 2008**).

III.3.Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols nous donne une estimation globale de la teneur en différentes classes des composés phénoliques contenus dans le concombre et la fraise. Le dosage de ces composés a été réalisé par des réactions chimiques en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Pour calculer les concentrations, nous avons utilisé une courbe d'étalonnage ou l'acide gallique est considéré comme standard avec l'équation : $Y = 0,012X$, $R^2 = 0,99$.

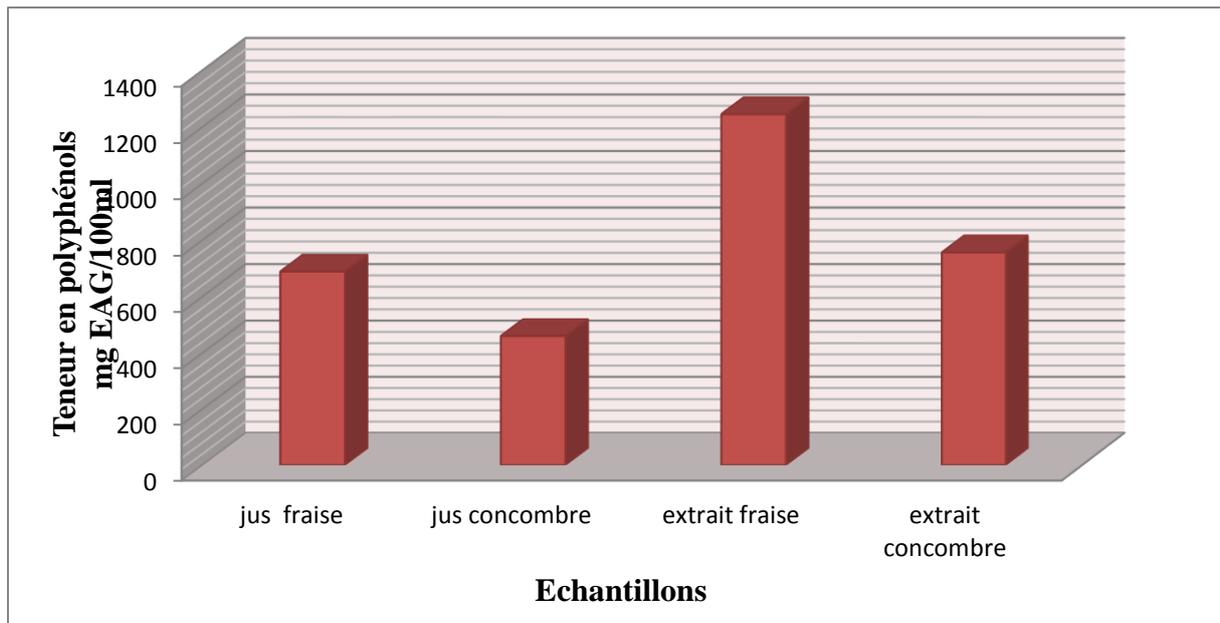


Figure05 : Teneurs en polyphénols totaux

Les résultats montrent que les composés phénoliques sont abondants dans le jus et l'extrait de fraise. La teneur élevée en polyphénols dans les extraits est liée à la solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires, grâce à la richesse en groupement hydroxyle (**Ghedaba et al., 2014**). D'après les résultats obtenus, la fraise a donné des teneurs plus importantes en polyphénols totaux, qui varient de 1245mg EAG/100gMS pour l'extrait, 688mgEAG/100ml pour le jus avec une différence de celles trouvées pour le concombre qui varient de 756 mg EAG/gMS pour l'extrait et 460mgEAG/ml pour le jus.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques. **Cheurfa et Allen (2016)** ont montré que les facteurs extrinsèques (facteur géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également la maturation de la matière végétale et la durée de stockage à une forte influence sur le contenu en composés phénoliques.

Nos résultats, présentés précédemment sur la fraise, se concordent et ceux obtenus par **Luthria (2006)** qui a trouvé un taux de polyphénols dans l'extrait de fraise de l'ordre de 2903.20 mg EAG/100 g.

III.4.Détermination *in vitro* de l'activité antioxydante de *L. plantarum* S10

III.4.1.Résistance au peroxyde d'hydrogène

L'effet du peroxyde d'hydrogène sur l'activité antioxydante de S10 est représenté par la **figure 06**. La souche *L. plantarum* S10 a montré une résistance modérée vis-à-vis des

différentes concentrations d'H₂O₂ comparativement au résultat obtenu avec le témoin. Les résultats ont révélé que la souche est capable de tolérer une concentration de 0.4mM d'H₂O₂, tandis qu'à 0.7mM, 1.0 mM d'H₂O₂, la croissance a été réduite avec des densités optiques, inférieures à 0,65 après incubation pendant 8 h.

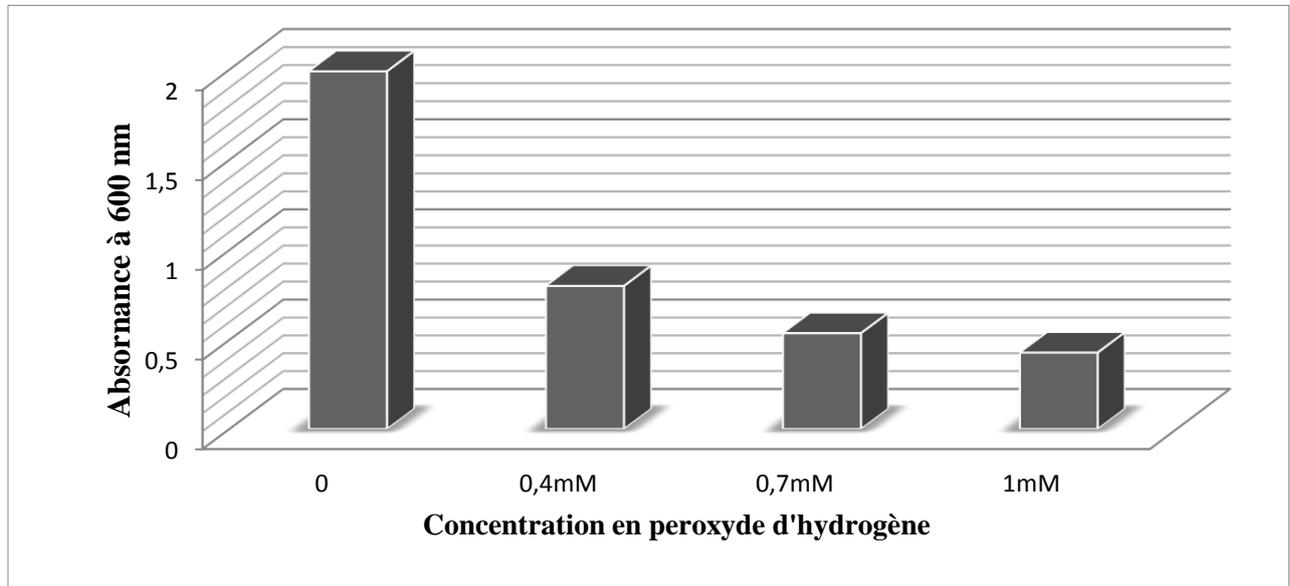


Figure 6: Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité de *L.plantarum* S10.

Nos résultats rejoignent ceux de **Wang et al .(2009)** qui ont trouvé que la souche *L. fermentum* peut survivre avec plus de 90% des nombres initiaux des cellules viables après 4 h d'incubation en présence de peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations d'H₂O₂. Le mécanisme de la résistance au peroxyde d'hydrogène par différentes souches de *Lactobacillus* n'est pas connu ou pas bien établi (**Li et al., 2012**).

III.4.2.Activité de piégeage des radicaux hydroxyles

Les résultats de l'activité de piégeage des radicaux hydroxyles par *L. plantarum* S10 sont regroupés dans l'annexe. Le résultat a révélé que la souche avait une forte capacité de piégeage des radicaux hydroxyles, avec un taux d'inhibition de 78. 56 % (1 ml de cellules à une absorbance de 0.9). Le surnageant de la culture a représenté aussi une capacité modérée de piégeage des radicaux hydroxyles avec un taux d'inhibition de 44.31%.

Les radicaux hydroxyles sont principalement responsables de la lésion oxydative des biomolécules, et ceux-ci proviennent principalement de la réaction de Fenton en présence de métaux de transition tels que le fer (Fe²⁺) et le cuivre (Cu²⁺). La chélation de ces ions par

certaines antioxydants peut inhiber la production de radicaux hydroxyles (**Kao et Chen, 2006**). Certaines souches de bactéries lactiques, telle que *Bifidobacterium longum*15708 (**Lin et Yen, 1999**), et *L.casei* KCTC 3260 (**Lee et al ., 2005**), ont été signalées comme possédant une activité antioxydante par l'élimination des ions de ces métaux, autrement dit, pourraient participer à des réactions de type Fenton génératrices d'hydroxyle radicalaire.

III.4.3. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Le résultat a révélé que le surnagent de la culture de *L.plantarum* S10 avait une capacité de piégeage des radicaux hydroxyles, avec un taux d'inhibition de 53.05 %, et la suspension des cellules a montré une capacité de piégeage des radicaux plus élevée, estimée à 63.22%.

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par **Arasu et al.(2014)**, ces auteurs ont testé la capacité d'une souche de *L.plantarum* à piéger des radicaux libres et ont trouvé que le taux d'inhibition du radical libre est égale à 59,88%. Le mécanisme de l'activité peut être due à l'existence d'enzymes, telles que la NADH-oxydase, la SOD, le peroxyde de NADH et les catalases non hémiques (**Zhang et al., 2010**).

III.5.Comportement des billes dans une solution de KH₂PO₄

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 7. Il apparait qu'entre 2h et 4h d'incubation des billes dans les solutions KH₂PO₄ aux pH simulées à ceux de l'estomac et de l'intestin, l'alginate de sodium a joué un rôle de protection contre ces pH hostiles et pour lesquels, les DO restent dans des valeurs de limite très proches du point de départ, c'est-à-dire aucune libération de cellules de *L.plantarum* dans le milieu .

Au-delà de 4h d'incubation (temps nécessaire pour la digestion d'un repas), nous constatons qu'il y à une fragilisation des billes avec probablement une désintégration et libération de cellules dans les milieux. Au-delà de cette période, il y a une séparation des courbes déjà tracées en fonction de l'absorbance à 600 nm dont l'absorbance et plus importante avec le milieu à pH2, puis avec pH3. Avec les milieux simulés à la digestion stomacale, l'effet sur les capsules est trop prononcé au niveau du milieu pH2 (estomac à jeun) ou, l'absorbance a connu une augmentation assez importance après 8h et 24h d'incubation, ce qui laisse supposer qu'il y à une forte libération accompagnée probablement d'une forte dégradation de l'alginate de sodium. En revanche, nous assistons à une bonne résistance des billes au milieu simulé à

celui de la digestion intestinale ou l'absorbance (DO) a connu une faible augmentation, donc une faible libération de cellules dans ce milieu.

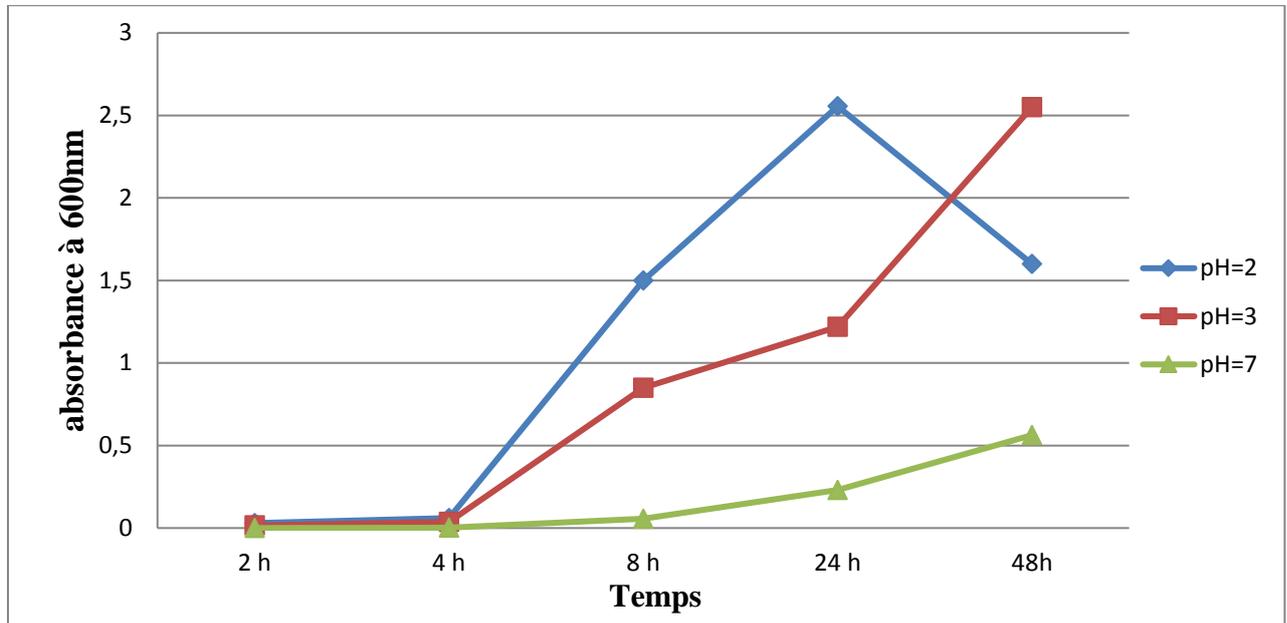


Figure7 : Comportement des billes d'alginate de sodium dans des solutions de KH_2PO_4

On peut déduire de ces résultats, que si la durée de la digestion stomaco-duodénale ne dépasse pas 4 à 6h, l'alginate de sodium servira de matrice pour délivrer les bactéries probiotiques, à leur site d'action, l'intestinal .

III.6. Activité antioxydante des différents extraits

L'activité antioxydante des différents extraits (concombre et fraise) vis-vis du radical DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune (Nur *et al.*, 2013).

Les résultats du piégeage du radical libre DPPH sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre (figure8).

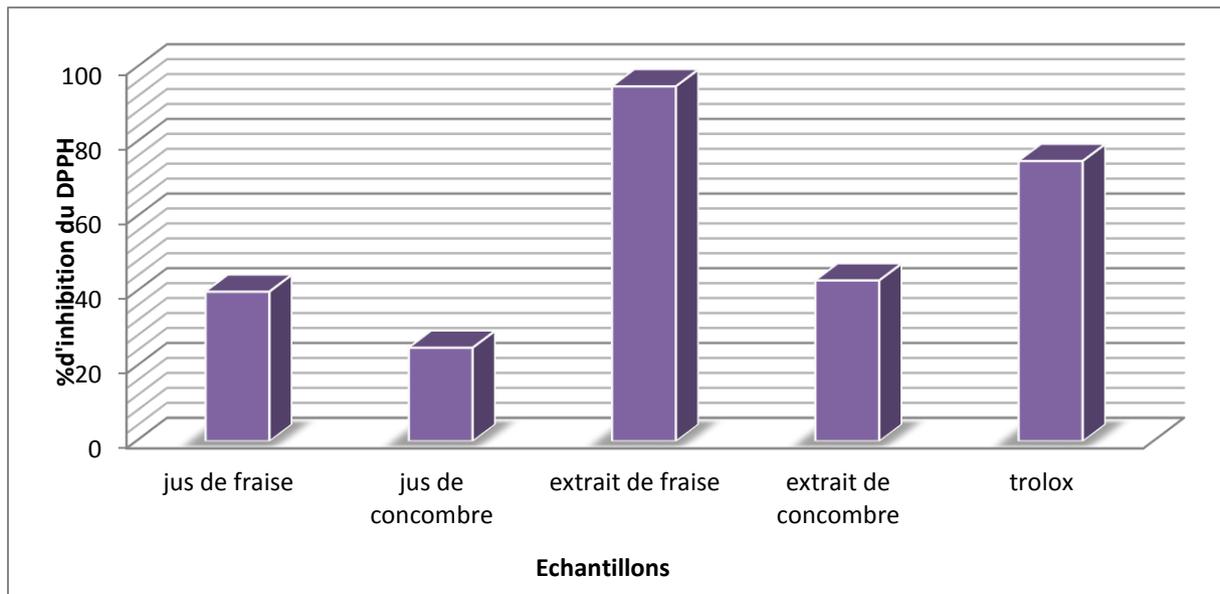


Figure 8: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH°

D'après les résultats obtenus, nous avons trouvé que l'extrait des fruits de la fraise est le plus actif avec une activité anti radicalaire importante comparativement à celle de l'antioxydant utilisé comme standard le Trolox et comparativement à celui du concombre. Ces résultats peuvent être justifiés par l'étude de **Ferrão et al. (2017)** qui ont trouvé que les extraits des fraises ont une forte capacité d'inhibition du DPPH.

D'après les résultats obtenus, la variation du pouvoir antioxydant des extraits pourrait s'expliquer par la richesse différentielle en polyphénols, selon **Turkmen et al. (2007)**, les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale.

D'après les résultats des dosages des polyphénoles et des flavonoïdes totaux, on peut déduire que la fraise a un effet anti radicalaire, qui est fort probablement lié à la présence des ces composés.

III.7. Evolution de quelques paramètres de fermentation

III.7.1. Evolution du pH et d'acidité

Avant de lancer la fermentation, le jus brut de concombre a un pH de 5.6, ce résultat est proche de celui obtenu par **Tyagi et al. (2016)** (un pH égale à 6 pour le jus du même légume). Cependant, le jus frais de fraise avait un pH de 4, cette valeur est proche de celle trouvée par **Garzón et Wrolstad (2006)** (pH égale à 3,98 pour un jus du même fruit).

Nous trouvons que les valeurs de pH ont diminué au cours de la fermentation du jus de fraise aussi bien que celui du concombreensemencés par la culture libre et encapsulée de la souche *L.plantarum* S10. Les figures 9 et 10 résument l'évolution du pH et d'acidité des jus au cours de la fermentation.

Nous remarquons que la valeur du pH reste inchangée au moment d'ensemencement des jus par la culture encapsulée, mais l'ensemencement par la culture libre a montré une diminution de la valeur de pH à 5.4 pour le jus de concombre et à 3.8 pour le jus de la fraise. Après 24heures de fermentation, nous remarquons un abaissement progressif de la valeur de pH des deux jus ensemencés par la culture libre pour atteindre une valeur de 2.5 pour le jus de concombre et 1.8 pour le jus de fraise, par contre les valeurs de pH des jus ensemencés par la même culture encapsulée ont montré une faible diminution pour atteindre après le même temps d'incubation, 4.1 pour le jus de concombre et 2.9 pour le jus de fraise.

Cette diminution du pH est due au métabolisme de fermentation des matières organiques présentes dans les jus dont le principal produit de fermentation est l'acide lactique.

La faible diminution de pH des jus ensemencés par la culture encapsulée peut être justifiée par la faible concentration des cellules dans les jus car les billes ne libèrent pas toutes les bactéries encapsulées en ces conditions.

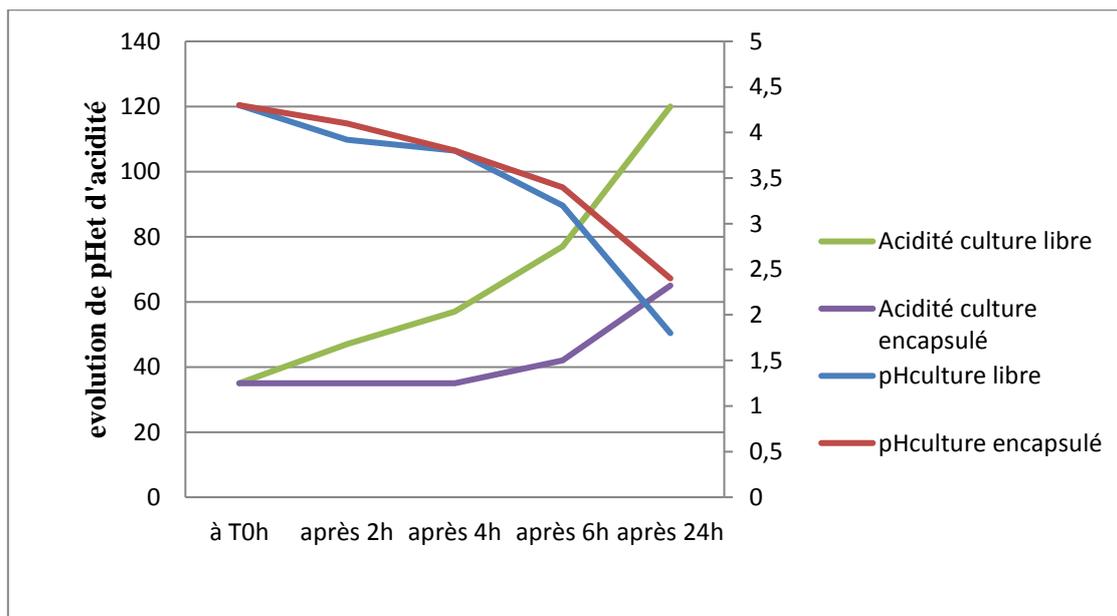


Figure 9 : Evolution du pH et d'acidité au cours de la fermentation de jus de fraise par culture libre et encapsulée.

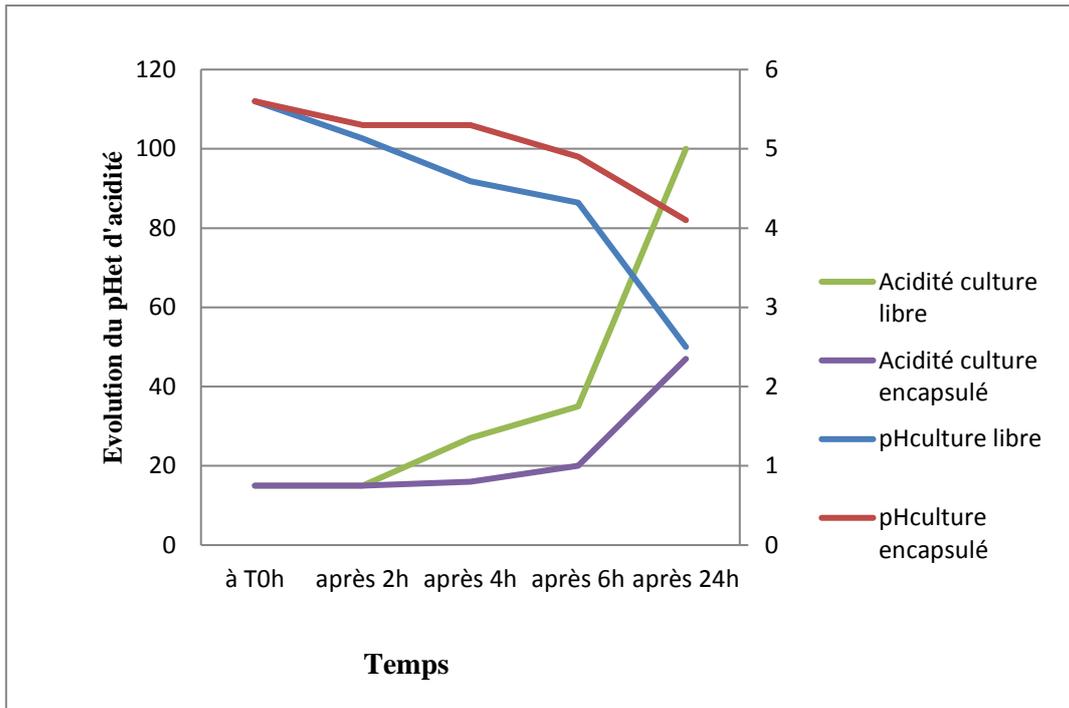


Figure 10 : Evolution du pH et d'acidité au cours de la fermentation de jus de concombre par culture libre et encapsulée.

Les études menées par **Sharma et al. (2013)**, **Nosrati et al. (2014)** et **Reddy et al. (2015)** ont montré que les valeurs de pH diminuent au cours de la fermentation des jus de légumes et des fruits.

En ce qui concerne l'acidité des échantillons après 24 heures d'incubation et d'après les résultats des figures **9** et **10**, nous trouvons que l'acidité des jus augmente au cours de la fermentation pour atteindre les valeurs de 10g/l pour le jus de concombre fermenté par la culture libre, 4.7g/l pour le jus de concombre fermenté par celle encapsulée, 12g /l pour le jus de fraise fermenté par la culture libre et 6.5g/l pour le jus fermenté par la culture encapsulée

Les résultats trouvés après 24h de fermentation par la culture libre sont supérieurs à ceux trouvés par **Lavinia et al. (2012)** qui ont obtenu, après le même temps d'incubation une acidité produite par *L. acidophilus* dans un jus de concombre de 9.36g/l. En revanche, il est clair, que l'acidité produite dans les mêmes jus en présence de notre culture encapsulée est trop faible, par manque de libération de cellules dans les mêmes matrices alimentaires.

La différence dans les résultats est due au statut fermentaire des souches, notre souche à un statut fermentaire incomparable à celui de souches utilisées dans d'autres études.

III.7.2. Evolution du nombre de cellules

Au cours de la fermentation du jus de fraise et celui du concombre par la culture libre et encapsulée, le nombre de cellules viables a été suivi et calculé en utilisant le dénombrement direct sur boîte de Pétri (UFC/ml). D'après les résultats des figures 11 et 12, il apparaît que le nombre de cellules viables de *L.plantarum* augmente durant la fermentation pour atteindre en fin de fermentation 130×10^9 UFC/ml et 58×10^9 UFC/ml pour le jus de fraise et le jus de concombre fermentés par la culture libre respectivement. Pour les mêmes jus fermentés par la culture encapsulée, le nombre était de 40×10^9 UFC/ml pour le jus de concombre et 42.3×10^9 UFC/ml pour le jus de fraise.

L'analyse des courbes montre un phénomène de diauxie, pour lequel, entre 4 et 6h de fermentation pour les deux jusensemencés par la culture libre, il y a eu une phase stationnaire, mais au-delà il y a eu une reprise de la croissance.

Pour les jus fermentés par la culture encapsulée, l'analyse de la courbe montre un manque de croissance entre 2h à 4h mais au-delà, il y a une reprise de croissance et la duplication de la souche.

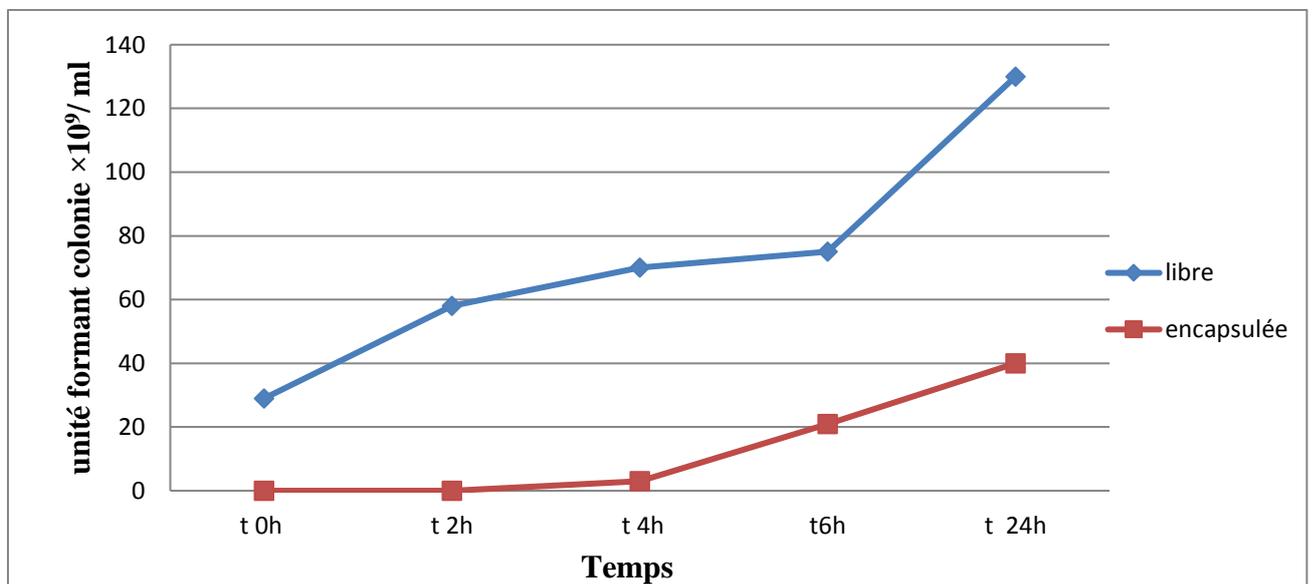


Figure11 : Evolution du nombre des cellules au cours de la fermentation du jus de concombre.

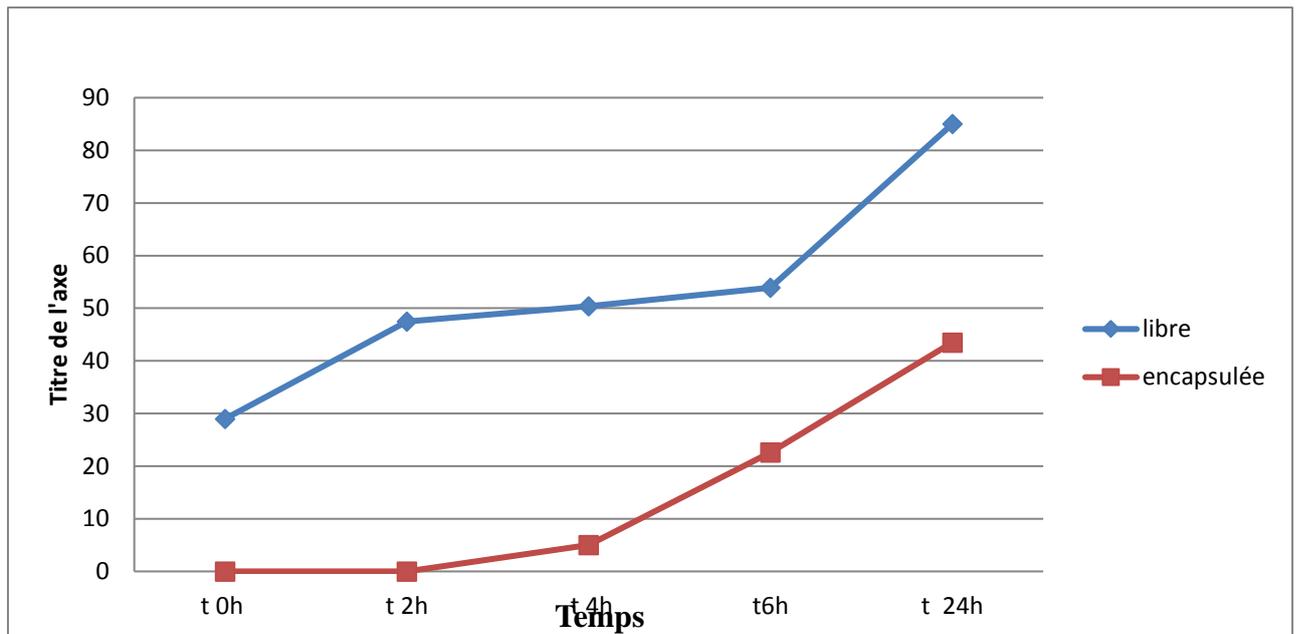


Figure 12: Evolution du nombre des cellules au cours de la fermentation du jus de fraise

Nos résultats sont proches de ceux trouvés par **Lavinia et al.(2012)** et de **Reddy et al.(2015)** qui ont montré l'augmentation du nombre de bactéries lactiques durant la fermentation des légumes et fruits. Dans l'étude menée par **Lavinia et al. (2012)**, la croissance de la souche *L.acidophilus* dans le jus de concombre a augmenté pour atteindre 18.6×10^{14} UFC/ml après 8 heures de fermentation.

III.8.Activités antioxydantes de la bactérie après 24heures de fermentation

Ce test avait comme objectifs, la vérification de la perte ou non des activités antioxydante de la souche véhiculée par deux matrices alimentaires fermentées, le jus de concombre et le jus de fraise .

III.8.1.Résistance au peroxyde d'hydrogène

L'effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité de la souche S10 après 24h de fermentation dans les jus de fraise et de concombre est représenté sur **la figure13**.

On trouve qu'il y a une amélioration de la résistance de la souche *L. plantarum* S10 après 24heures de fermentation vis-à-vis de différentes concentrations d' H_2O_2 par rapport au témoin, on remarque que l'échantillon de jus de fraise présente une meilleure valeur de la résistance comparativement à celle de concombre.

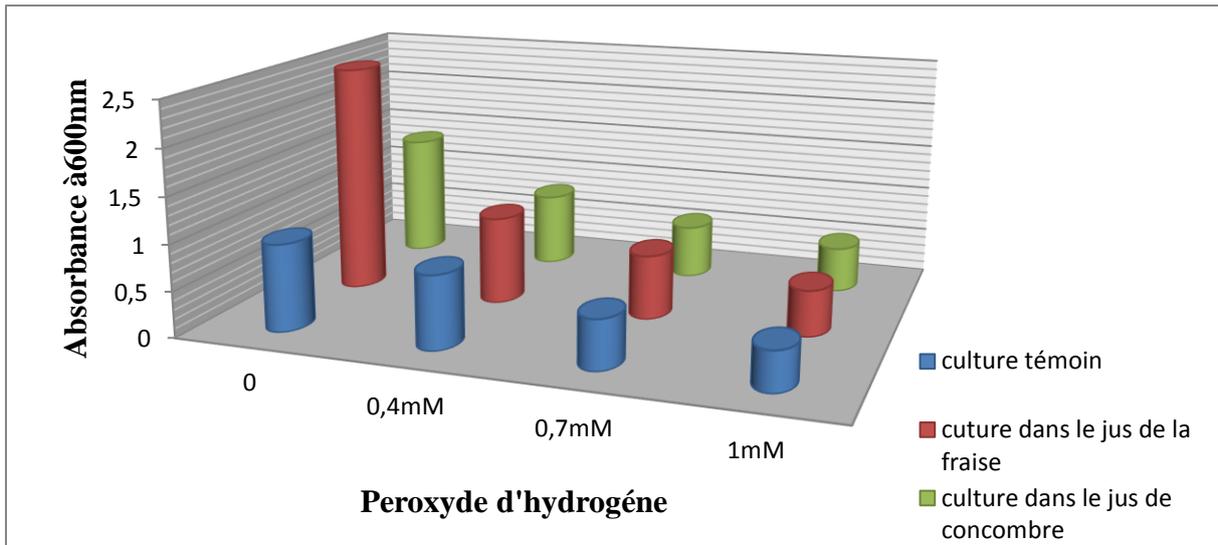


Figure 13: Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité de *L.plantarum* S10 après 24h de fermentation.

III.8.2. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles

Les résultats des pourcentages de piégeage des radicaux hydroxyles après 24 heures de fermentation des jus par *L.plantarum* S10 sont groupés sur la figure 14. Les résultats ont révélé que la capacité de piégeage de ces radicaux a augmenté, montrant ainsi, un taux d'inhibition de 95.52% pour l'échantillon de jus de fraise et 80.01% pour l'échantillon de jus de concombre.

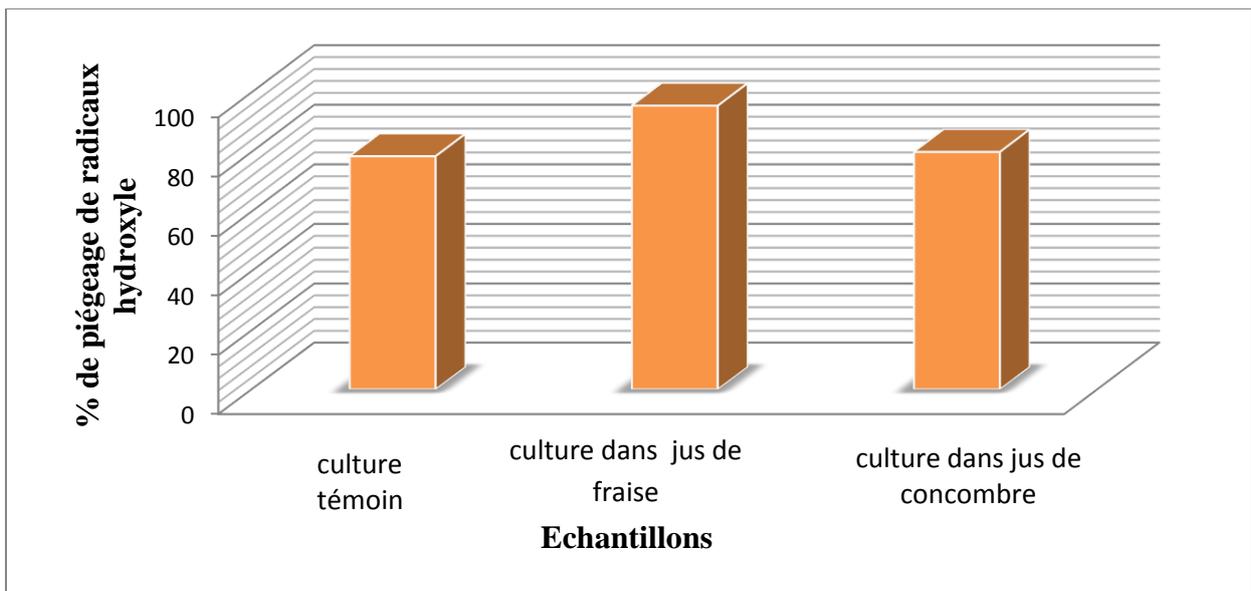


Figure 14: Pourcentage de piégeage de radical hydroxyle après 24h de fermentation des jus par *L. plantarum* S10

III.8.3. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Les résultats des pourcentages de piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl après 24 heures de fermentation des jus par *L. plantarum* S10 sont illustrés par la figure 15.

La lecture des résultats obtenus, montre que la culture du jus de fraise donne la meilleure activité d'inhibition avec un pourcentage de piégeage des radicaux libres de 75.06%. De même, la même culture ayant servi à la fermentation du jus de concombre a donné une capacité de piégeage des radicaux de 66.23%. En revanche, la culture témoin a donné le plus faible pourcentage d'activité anti radicalaire.

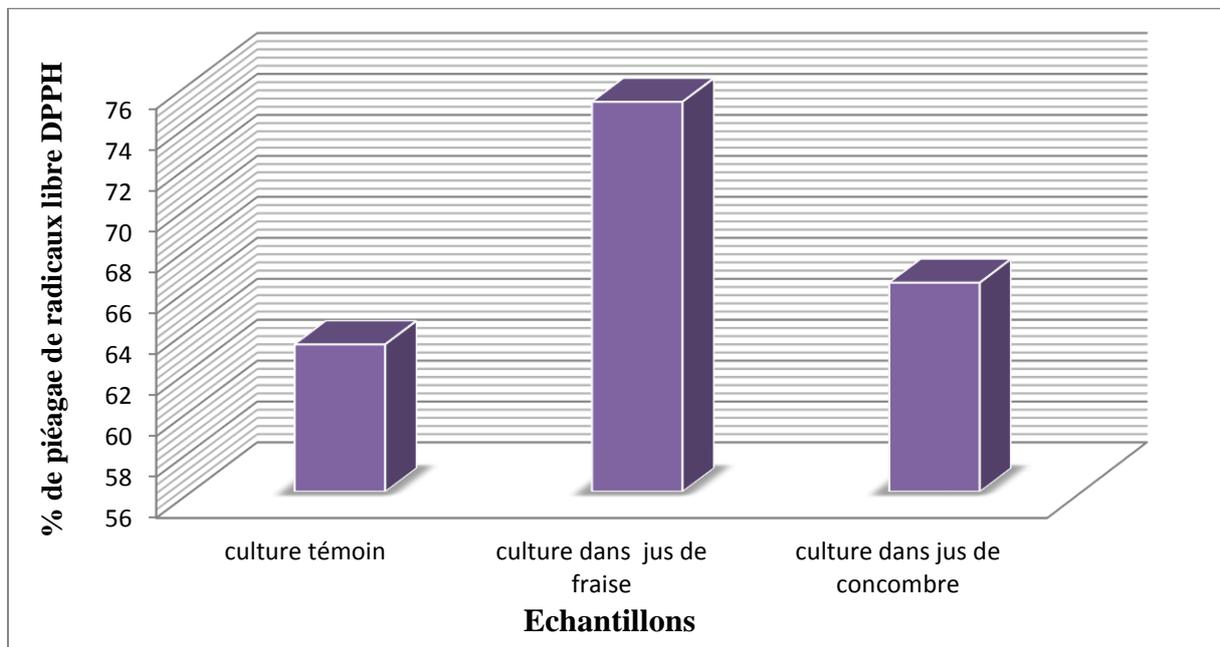


Figure 15: Pourcentage de piégeage de radicaux libres DPPH après 24h de fermentation des jus par *L.plantarum* S10

L'augmentation des activités antioxydants de la bactérie peut être due aux augmentations du nombre des cellules au cours de la fermentation (24heures) avec une contribution probable des composés contenus dans les jus. L'étude menée par **Lin et al. (2012)** a montré que les valeurs des différents tests d'activité antioxydante y compris la résistance aux peroxyde d'hydrogène, l'inhibition de radical hydroxyle et libre ont augmenté avec l'augmentation de la concentration en cellules de *Lactobacillus* au cours de la fermentation.

III.9. La digestion bucco-gastro-intestinale *in vitro*

III.9.1. Survie et viabilité de la culture libre et encapsulée après les phases de la digestion

L'effet de la digestion sur la viabilité et la survie des cellules libres et encapsulées est représenté sur les figures 16 et 17.

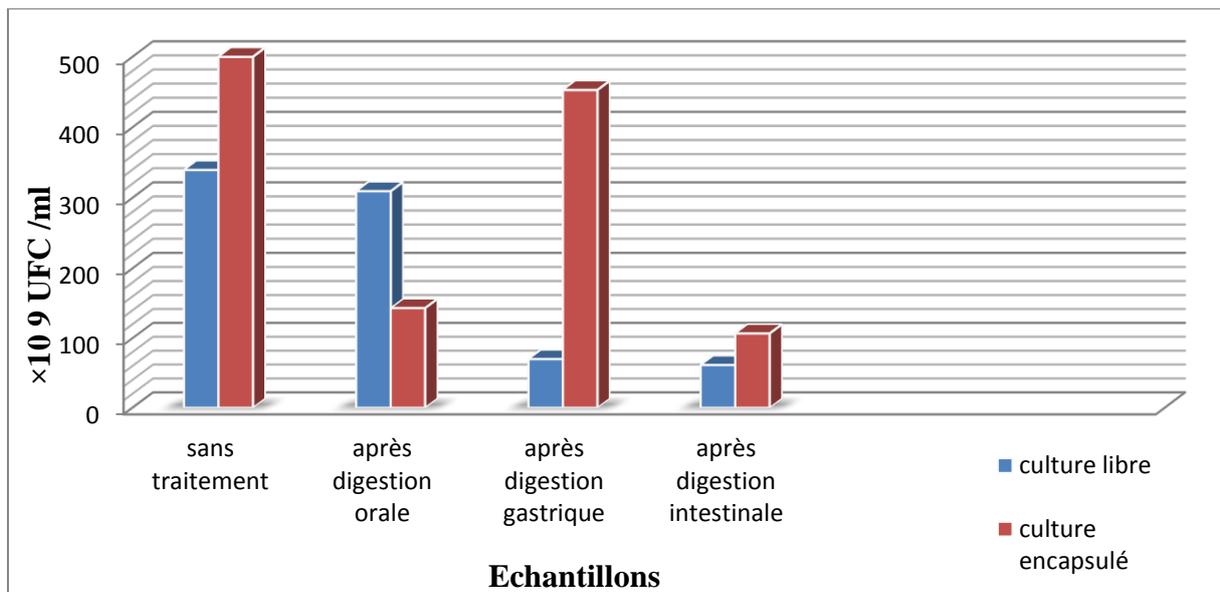


Figure16 : Effet de la digestion sur la viabilité et la survie des cellules de *L.plantarum* S10 libres et encapsulées (UFC/ml)

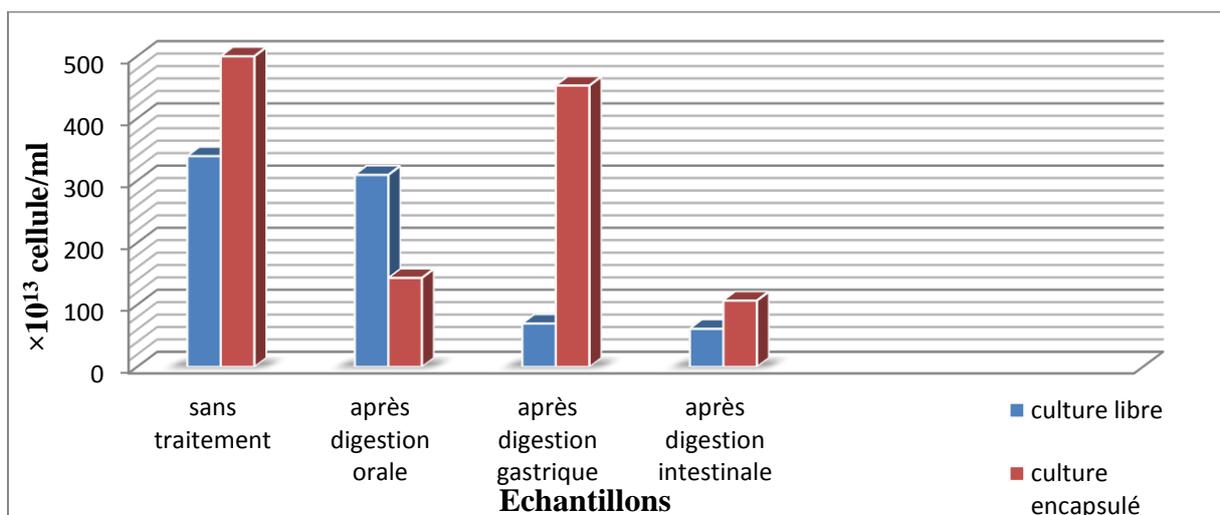


Figure17 : Effet de la digestion sur la viabilité et la survie des cellules de *L.plantarum* S10 libres et encapsulées (cellules/ml).

Les résultats des figures 16 et 17 montrent que la souche *L.plantarum* S10 est résistante aux conditions similaires de la digestion orale (la présence de α -amylase (75U/ml et pH de 7) après 2min d'incubation avec un pourcentage de survie égale à 61.9%. Après la digestion stomacale, nous constatons une réduction de la survie qui est reflétée par une diminution de la population cellulaire, de même, il se trouve qu'après digestion intestinale, le nombre a baissé mais la survie reste toujours.

Par ailleurs, la souche encapsulée dans l'alginate de sodium à 1% a passé par les mêmes conditions de la digestion bucco-gastro-intestinale dont les résultats de dénombrement montrent une protection de la souche contre ces conditions et le pourcentage de la survie est égale à 35% contre 15% obtenu avec les cellules de la culture libre.

Les résultats obtenus avec la culture libre et encapsulée, rejoignent ceux de **Cai et al. (2014)** qui ont trouvé que l'encapsulation de la souche *L. acidophilus* CGMCC1.2686 dans une matrice d'alginate de sodium a augmenté la survie de cette dernière aux conditions de la digestion par un pourcentage de 22%.

D'après les résultats, il est très remarquable qu'au niveau de digestion gastrique, la matrice utilisée pour le processus de l'encapsulation a permis la libération du plus grand nombre de cellules (environ 80% des cellules sont libérés des billes).

III.9.2.Survie et viabilité de la culture libre et encapsulée à T= 0h dans les jus

III.9.2.1. Survie dans le jus de fraise

L'effet de la digestion sur la viabilité et la survie des cellules de la culture libre et encapsulée à T= 0h est représenté sur les **figures 18 et 19**.

Les résultats montrent que les méthodes appliquées ont donné des résultats différents mais sans contradiction. Il apparaît, qu'avec la numération cellulaire, le nombre de cellules obtenu après les trois phases de digestion est presque stable comparativement au témoin (16×10^{13} cellule/ml). Pour la culture encapsulée, le nombre de cellules libéré au cours des trois phases de digestion a chuté en phase orale (10×10^{13} cellule/ml). et il a connu une augmentation graduelle au cours du reste des phases de digestion ($29,66 \times 10^{13}$ cellule/ml) après la phase gastrique et de ($45,9 \times 10^{13}$ cellule/ml) après la phase intestinale.

Par ailleurs, la numération en UFC par ml, montre une bonne concordance des résultats avec une bonne survie des cellules libres au cours des trois phases de digestion, de même, il y a

une reproduction des résultats avec les cellules encapsulées ou, il y a une faible viabilité (63×10^9 UFC/ml) en phase buccale, puis on assiste à une augmentation de la libération des cellules sous l'effet des conditions qui règnent au niveau stomacale ($190,5 \times 10^9$ UFC/ml) et intestinale ($410,5 \times 10^9$ UFC/ml) et qui s'est traduit par une augmentation du nombre d'UFC

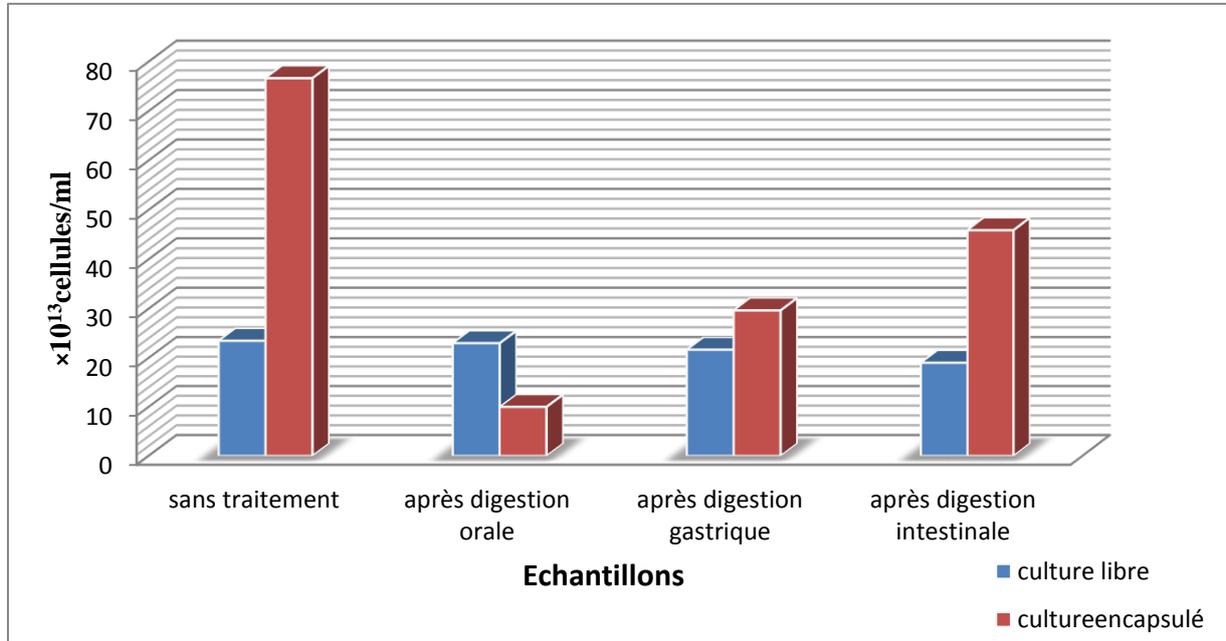


Figure 18 : Effet de la digestion sur la viabilité et la survie de *L. plantarum* S10 libre et encapsulée ensemencée dans le jus de fraise (cellules/ml)

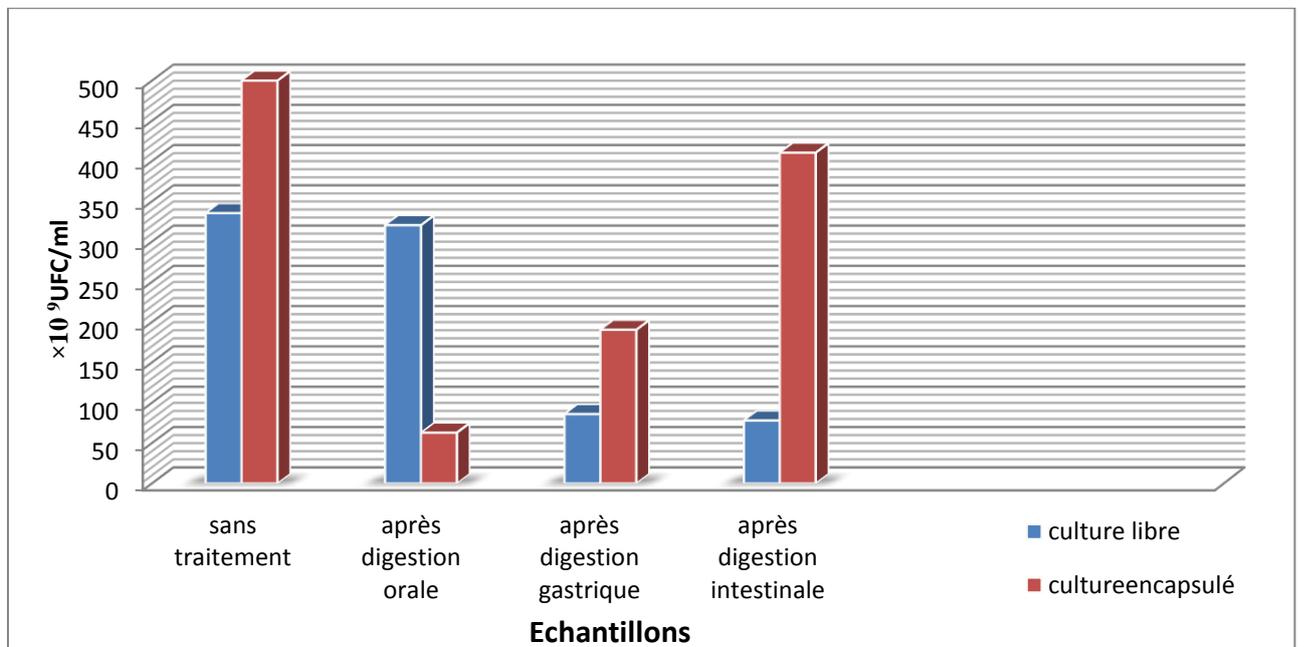


Figure19: Effet de la digestion sur la viabilité et la survie de *L. plantarum* S10 libre et encapsulée ensemencée dans le jus de fraise (UFC/ml).

III.9.2.2. Survie dans le jus de concombre

L'effet de la digestion sur la viabilité et la survie des cellules de la culture libre et encapsulée à T= 0h est représenté sur les figures 20 et 21.

Les résultats des figures 20, 21 montrent qu'il y a un taux de survie de *L.plantarum* S10 libre et encapsulée dans le jus de concombre presque comparable à celui trouvée avec le témoin (90%) et ce au cours des trois phases de digestion.

Il est remarquable, que pour les cellules encapsulées, la digestion intestinale a permis la libération d'un bon nombre de cellules emprisonnées dans la matrice (460×10^9 UFC/ml) et de (60×10^{13} cellule /ml), ce qui laisse supposer que cette composition permet la détérioration de la matrice d'encapsulation, ce qui libère les cellules de *L.plantarum* S10 avec un taux de survie important que se soit exprimé par rapport aux UFC/ml ou en Cellules/ml

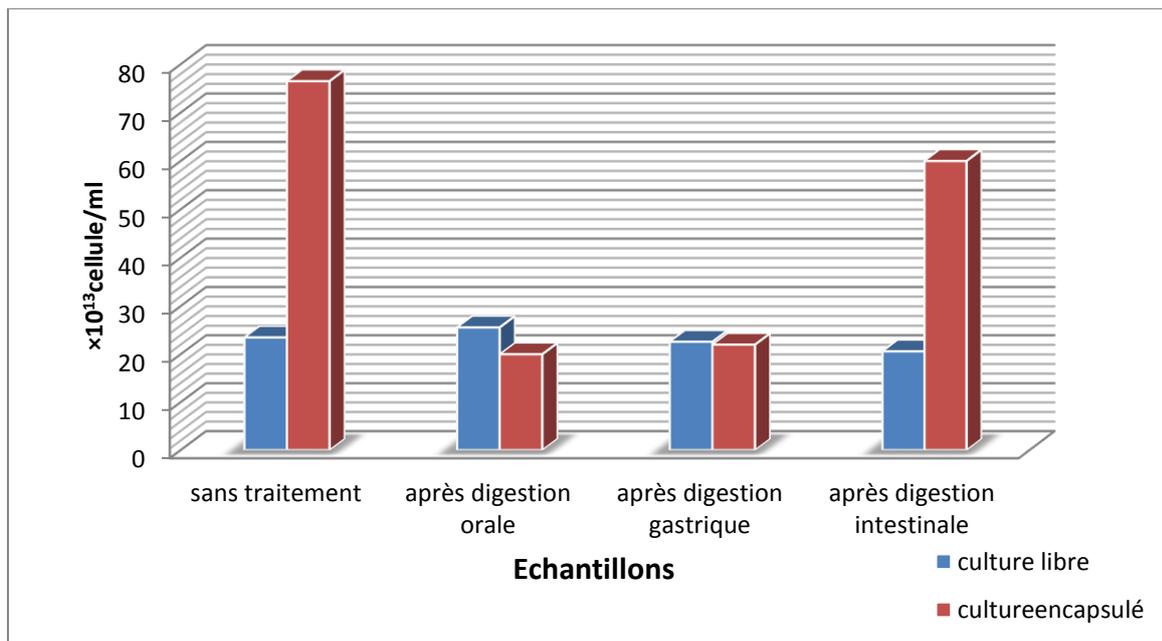


Figure20: Effet de la digestion sur la viabilité et la survie de *L.plantarum* S10 libre et encapsulé ensemencé dans le jus de concombre (Cellules/ml).

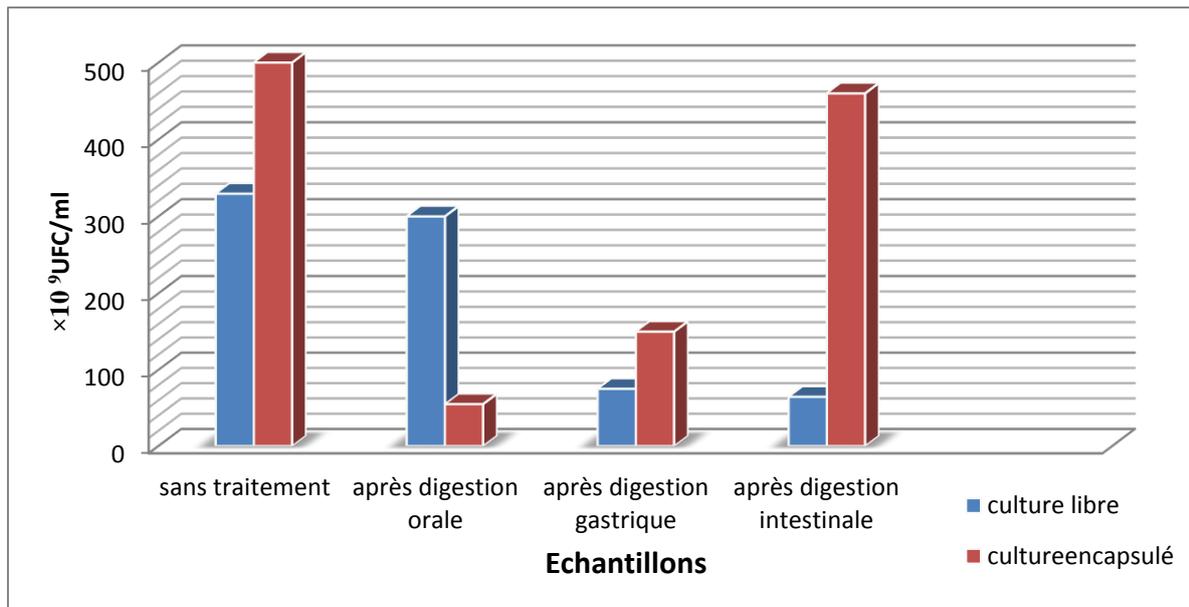


Figure 21: Effet de la digestion sur la viabilité et la survie de *L. plantarum* S10 libre et encapsulé ensemencé dans le jus de concombre (UFC/ml)

III.9.3. Survie et viabilité de la culture après 24 h de fermentation

III.9.3.1. Survie de la culture libre et encapsulée après 24 heures de fermentation dans le jus de fraise

D'après les résultats de la **figure 22**, après 24 heures de fermentation du jus de fraise par la souche *L. plantarum* S10 libre, on remarque que le taux de survie a diminué au cours des phases de digestion (50%), cela peut s'expliquer par l'effet inhibiteur des composés entrant dans la formulation de ce type de liquides simulant les conditions de digestion. Ajouter à cela, l'effet de l'acide lactique produit par la souche lors de la fermentation et qui peut causer des dommages pariétaux.

En revanche, il apparaît que pour la souche encapsulée, le taux de survie a connu une augmentation en fonction de chaque étage digestif, pour laquelle, nous constatons une libération de cellules plus importante au niveau intestinale (43%).

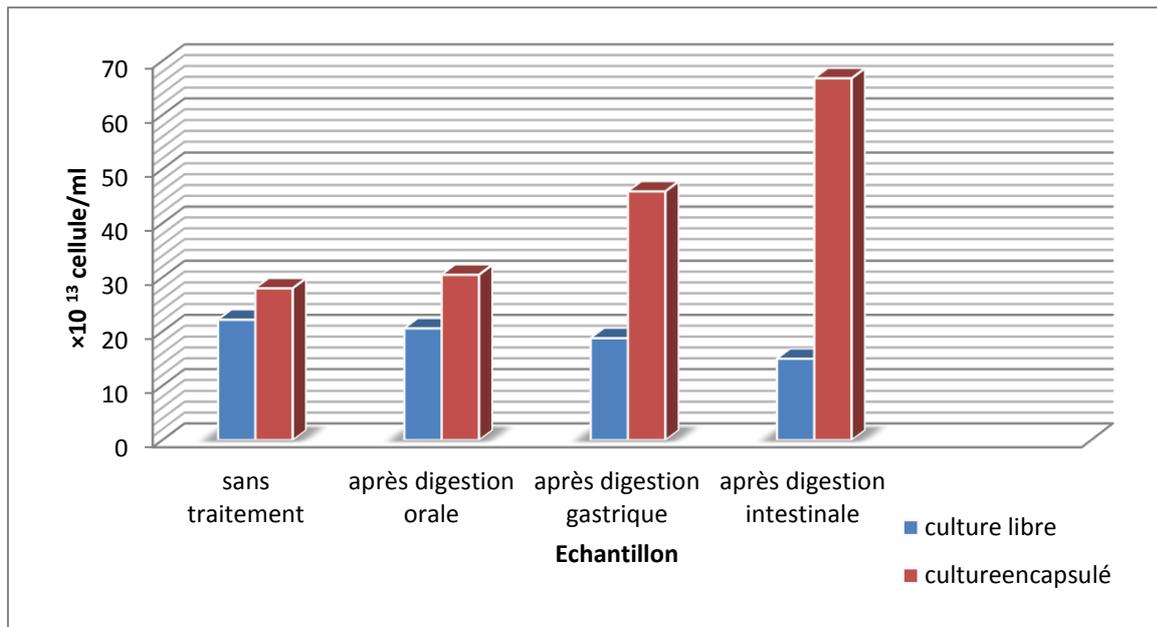


Figure 22: Effet de la digestion sur la viabilité et la survie de *L. plantarum* S10 libre et encapsulée après 24 heures de fermentation du jus de fraise

III.9.3.2. Survie de la culture libre et encapsulée après 24 h de fermentation du jus de concombre

Après 24 heures de fermentation de jus de concombre par la souche *L. plantarum* S10 libre (**figure 23**), nous remarquons que le taux de survie a diminué environ (40%) à cause probablement de la production de métabolites fermentaires comme l'acide lactique, cependant, pour la souche encapsulée, l'effet protecteur de l'alginate de sodium apparaît très clairement pour lequel, la libération de cellules dans les différents contenus de digestion a connu une augmentation graduelle pour atteindre un maximum au niveau intestinal, lieu d'exercer les fonctions probiotiques demandées d'une souche.

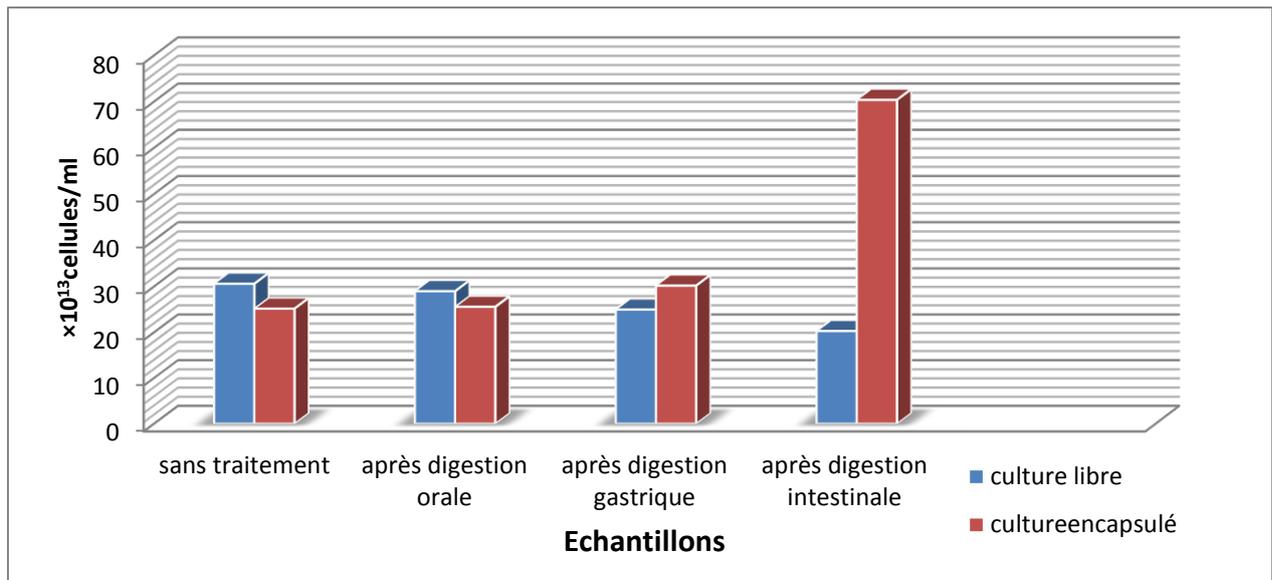


Figure23: Effet de la digestion sur la viabilité et la survie de *L.plantarum* S10 libre et encapsulée après 24heures de fermentation du jus de concombre.

Enfin, d’après les résultats de la survie de la bactérie après T=0h dans les jus et celles de 24h de la fermentation des jus on trouve une augmentation similaire de la survie et de la viabilité cellulaire après T= 0h et 24h de fermentation par rapport à celle trouvée avec les cultures témoins (libre et encapsulée). Avec des pourcentages de survie plus élevés pour la bactérie dans les jus après 24 heures de fermentation.

III.9.4.Evaluation de l’activité antioxydante de la bactérie après digestion bucco-gastro-intestinale

III.9.4.1.Activité de piégeage des radicaux hydroxyles

L’effet de la digestion *in vitro* sur le pourcentage de piégeage d'hydroxyle est illustré par la **figure 24**. Les résultats ont révélé que la capacité de piégeage des radicaux hydroxyles a diminué au cours du passage de cette dernière dans les conditions similaires de la digestion *in vitro*, avec une diminution de 50% du taux d’inhibition. Cela dit, il est fort probable que la perte en cellules est la cause de cette perte en activité.

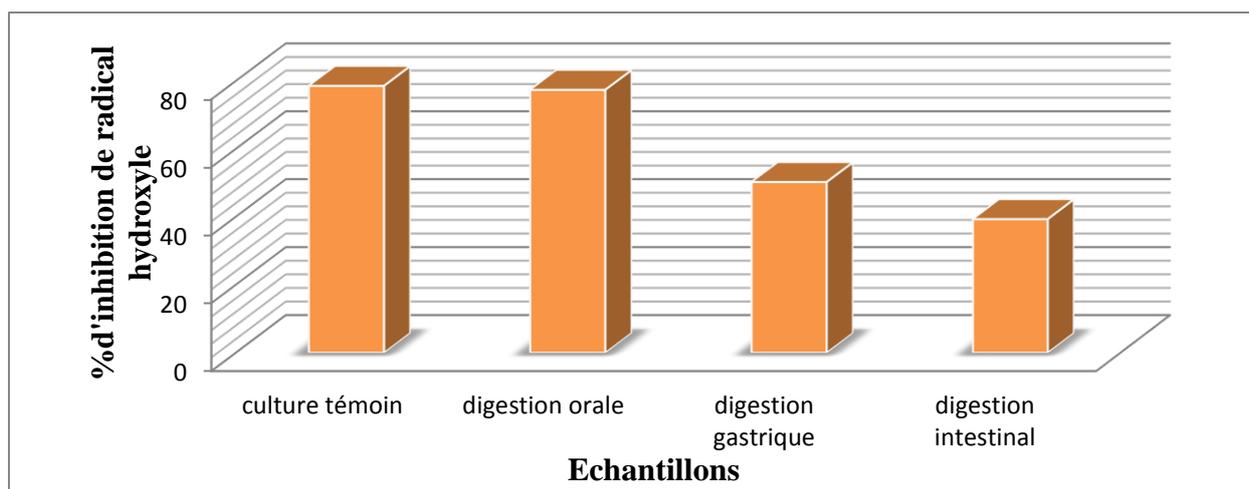


Figure 24: Pourcentage de piégeage de radical hydroxyle après digestion *in vitro*.

III.9.4.2. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Les résultats du pourcentage de piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl du *L. plantarum* S10 après digestion *in vitro* sont illustrés par la figure 25.

D'après les résultats de cette figure, après les trois phases de la digestion bucco-gastro-intestinal, le pourcentage de piégeage a connu une diminution pour aboutir à un pourcentage de 19%, ces résultats montrent clairement qu'il y a une forte perte en capacité d'inhibition de radical libre DPPH.

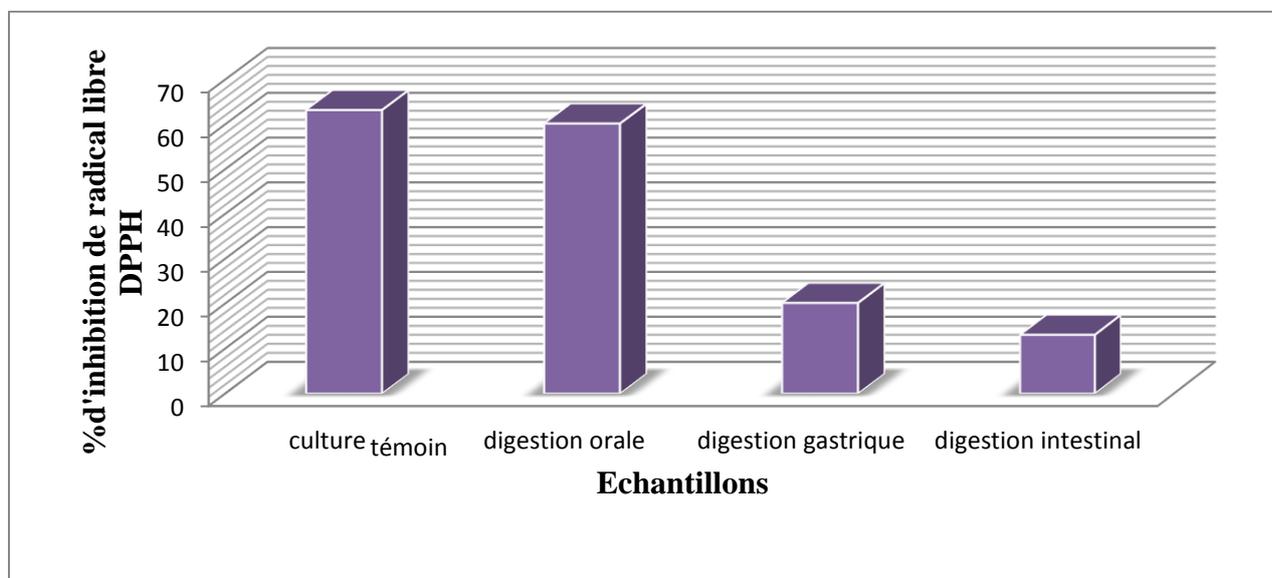


Figure 25: Pourcentage de piégeage de radicaux libres DPPH après digestion *in vitro*.

Nos résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante de la bactérie après digestion bucco-gastro-intestinale, sont similaires à ceux de Li *et al.* (2012) qui ont trouvé également une

diminution d'environ 80% de l'activité antioxydante d'une souche *L.plantarum* après les différents traitements (pH bas, traitement par la pepsine et autres enzymes).

Certains auteurs ont montré que l'activité antioxydante de quelques souches de bactéries lactiques peut être attribuée à la production de composés de surface cellulaire, par exemple, des polysaccharides extracellulaires produits par *Lactococcus lactis subsp. lactis* 12 (**Pan et Mei, 2010**) et *Bifidobacterium animalis* RH (**Xu et al., 2011**) et la présence de l'acide lipotéichoïque sur la surface des bifidobactéries (**Yi et al., 2009**).

Notre étude laisse supposer que les protéines de surface cellulaire ou des polysaccharides de *L. plantarum* S10 sont impliqués dans l'activité antioxydante de cette souche, car la présence des enzymes tels que la pepsine et la pancréatine provoque la suppression de ces composés de surface cellulaire qui a entraîné par la suite une diminution significative de la capacité de l'activité de la souche.

III.9.5.Digestion *in-vitro* des extraits

Ce test a été réalisé par le dosage des polyphénols et des flavonoïdes après chaque phase de digestion, l'effet de la digestion sur la bioaccessibilité des composés actifs (polyphénols, flavonoïdes) est représenté sur les figures 26 et 27.

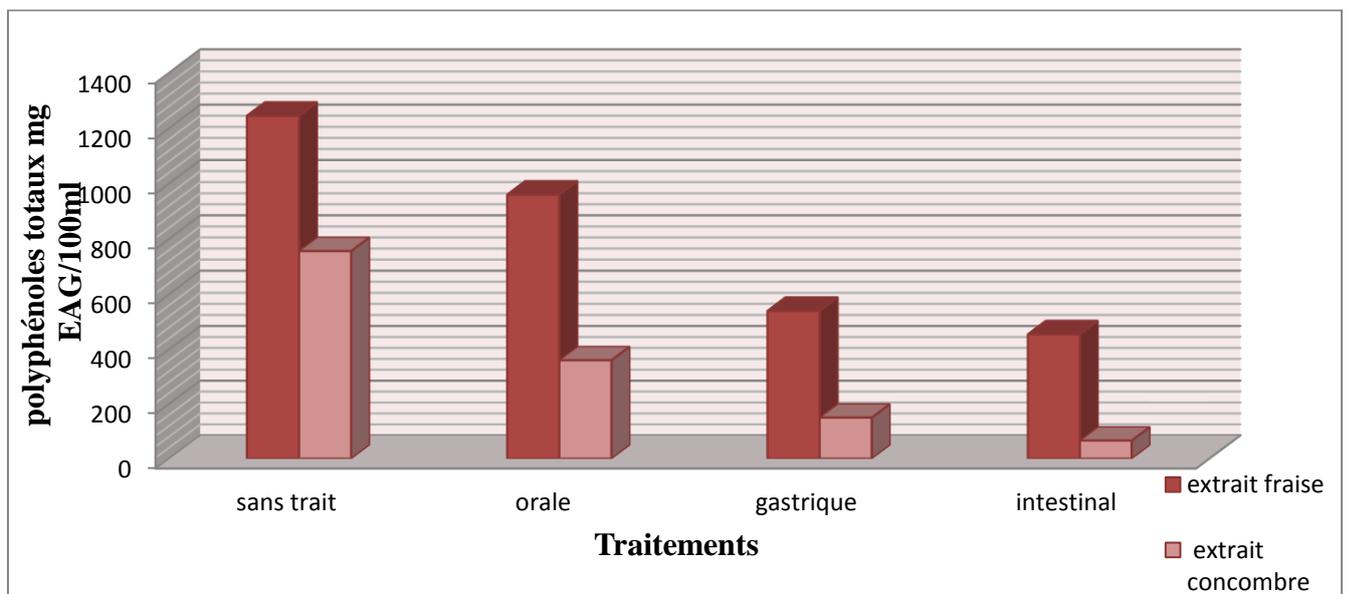


Figure 26 : Effet de la digestion *in vitro* sur la bioaccessibilité des polyphénols.

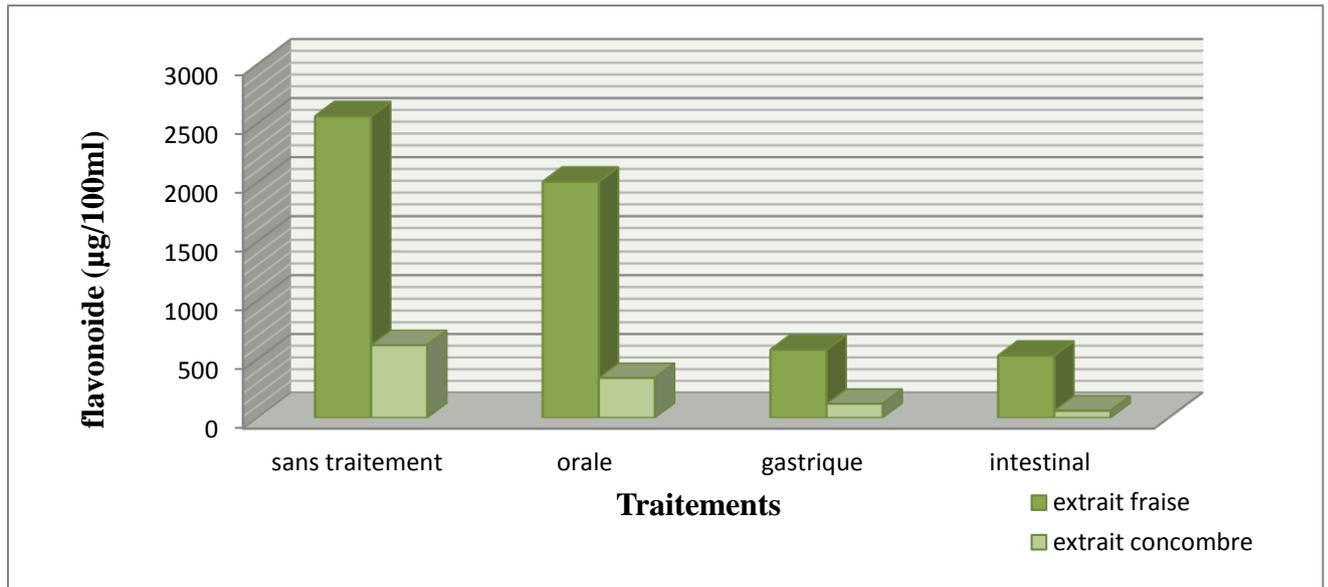


Figure 27: Effet de la digestion *in vitro* sur la bioaccessibilité des flavonoïdes.

Selon les résultats des figure 26 et 27, la teneur en flavonoïdes et en polyphénols est en diminution continue, il est a constater que les extraits bruts renferment des teneurs en polyphénols et flavonoïdes élevés, après la digestion bucco-gastro-intestinale *in vitro* la teneur en ces molécules bioactives a connu une diminution, c'est-à-dire la digestion a affecté la bioaccessibilité des ces composés.

Ces résultats peuvent être justifiés par Ariza *et al.* (2018), qui ont rapporté que la digestion *in vitro* a un effet direct sur les micronutriments (polyphénols, flavonoïdes) dont elle contribue à la perte de ces composés par un phénomène d'oxydation.

III.9.6. Digestion *in-vitro* en combinant bactéries libres/extraits (du concombre et de fraise)

Les résultats de la survie et la viabilité de la bactérie en présence de l'extrait (fraise, concombre) après chaque phase de digestion sont groupés sur les figures 28 et 29.

D'après les résultats de la survie de la bactérie libre combiné avec les extraits dans des conditions similaires de la digestion, nous remarquons qu'au niveau buccal, aucune différence n'a été observée comparativement aux résultats témoins, cependant au niveau gastrique, il y a une diminution du nombre de cellules qui était de 25×10^{13} cellules /ml en présence de l'extrait de fraise et $22,33 \times 10^{13}$ cellules/ml en présence de l'extrait de concombre. Par ailleurs, la digestion intestinale, il y a une bonne survie de *L.plantarum* en présence de l'extrait de la fraise (180×10^9 UFC/ml) comparativement à celle obtenue en présence de l'extrait du concombre (120×10^9 UFC/ml).

Le maintien de la survie à un nombre appréciable peut être justifié par la capacité de notre bactérie à métaboliser les substances bioactives présentes dans les extraits.

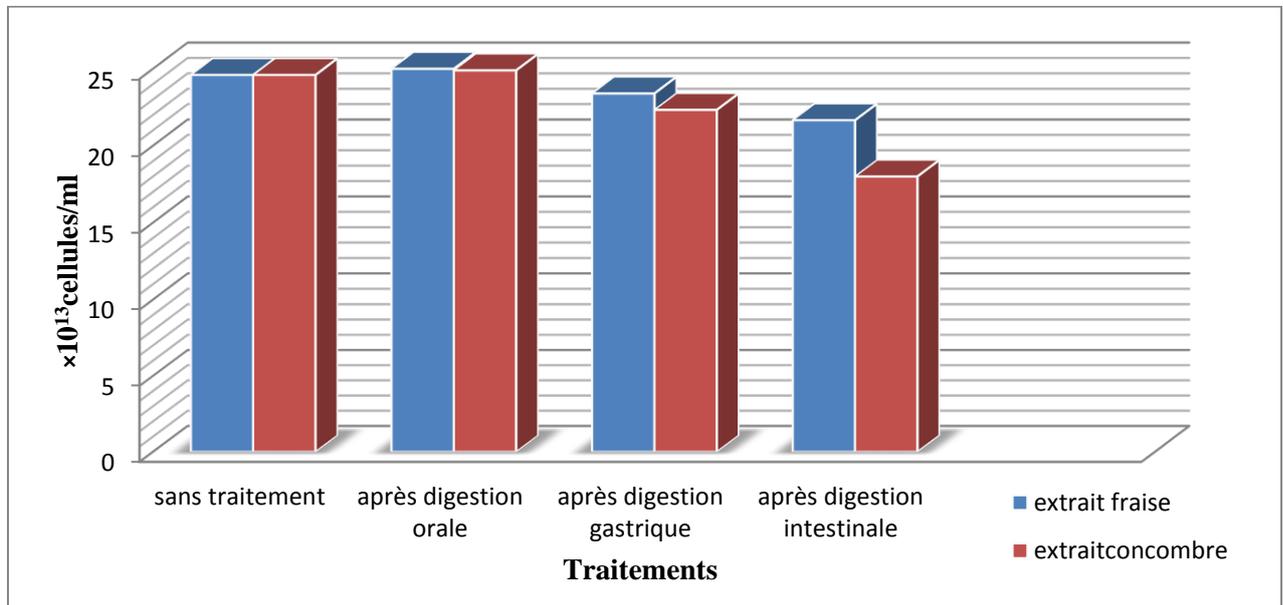


Figure 28 : Effet de l'extrait sur la viabilité et la survie des cellules libres de *L. plantarum* S10 au cours de la digestion *in vitro* (cellules /ml).

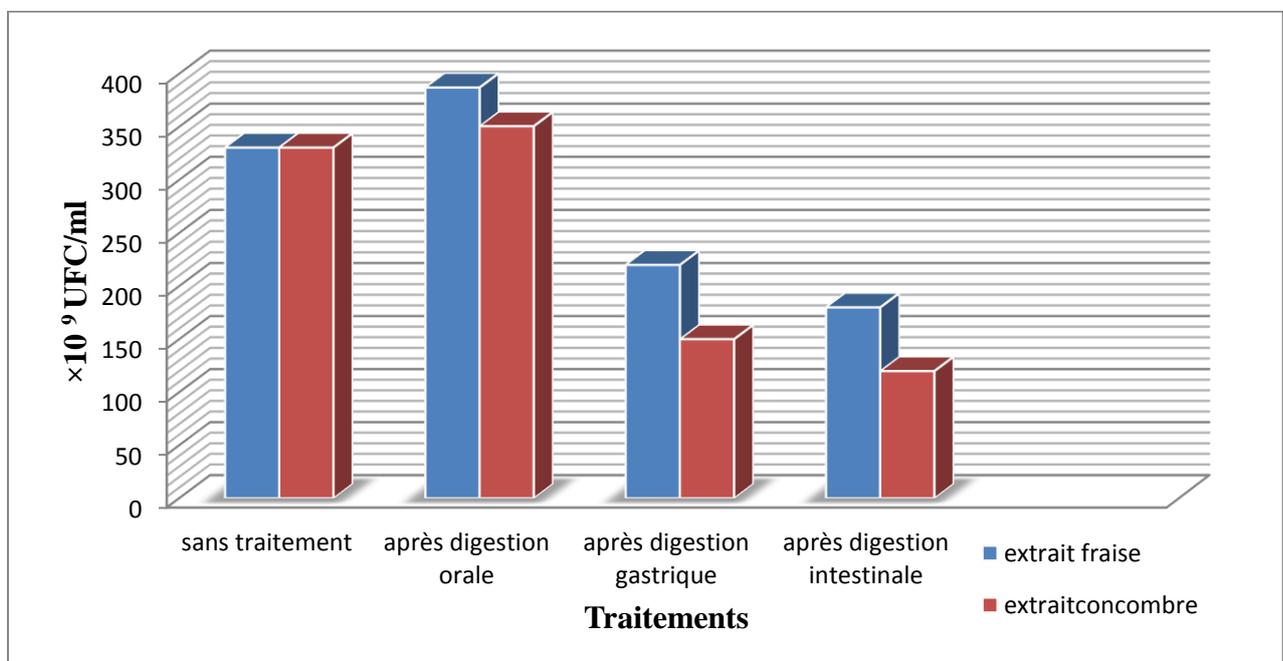


Figure 29: Effet de l'extrait sur la viabilité et la survie des cellules libres de *L. plantarum* S10 au cours de la digestion *in vitro* (UFC/ml).

III.9.7. Dosage des polyphénols et flavonoïdes après les phases de digestion

Les résultats des dosages après les phases de la digestion sont illustrés dans les figures 30 et 31.

Il apparaît que la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes a diminué d'une manière plus élevée comparativement à celle obtenue avec la digestion des extraits, cela confirme qu'il y a une dégradation de ces composés par la bactérie *L.plantarum* S10.

L'analyse des résultats de la digestion montre une perte en flavonoïdes avec les deux combinaisons « extrait de fraise- *L.plantarum* » et « extrait de concombre -*L.plantarum* », pour aboutir au niveau intestinal à une concentration de 530µg/100ml avec la première combinaison et 60,66µg/100ml avec la deuxième combinaison.

Par ailleurs, le même constat a été noté à l'égard de l'effet de la digestion sur l'évolution de la teneur en poly phénols, pour les deux combinaisons. Après la digestion intestinale, la concentration en ces composés était de 266 mg EAG/100ml avec la combinaison « extrait de fraise- *L.plantarum* » et de 35 mg EAG/100ml avec la combinaison « extrait de concombre-*L.plantarum* »

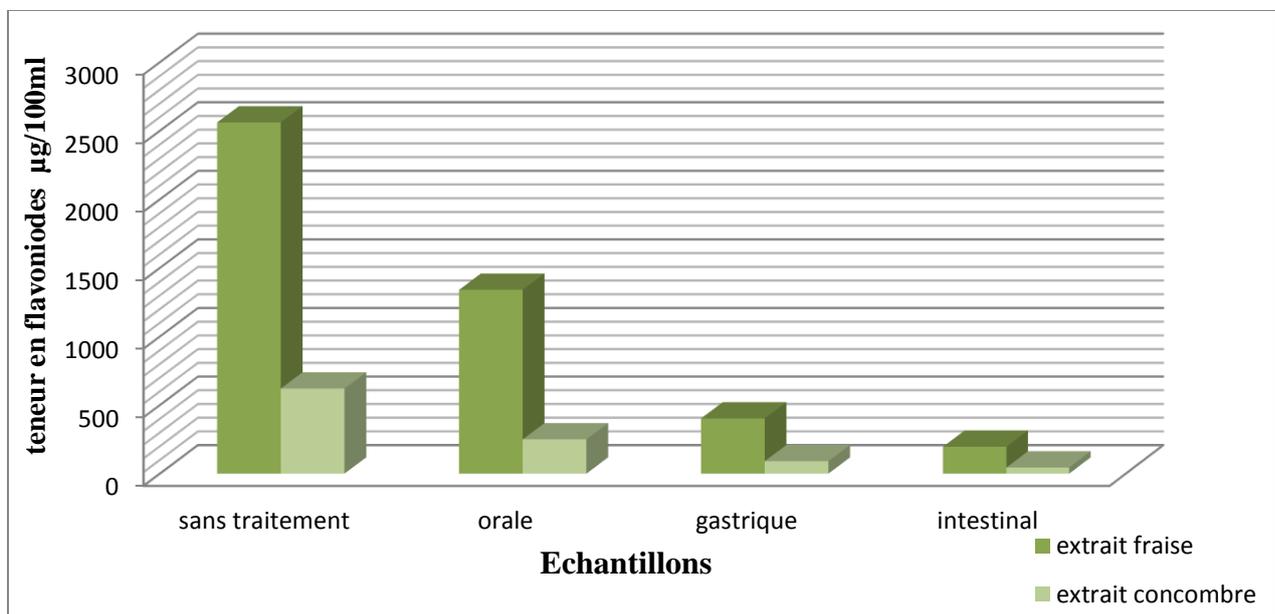


Figure30 : Effet de la digestion *in vitro* sur la teneur en flavonoïdes (µg/100ml).

Nos résultats, rejoignent ceux de **Pacheco-Ordaz et al. (2017)** qui ont montré que les composés phénoliques représentent des prébiotiques pour les bactéries probiotiques et que

l'incubation des composés phénoliques avec les souches *L.rhamnosus* GG et *L. acidophilus* a permis de maintenir leurs survie et viabilité.

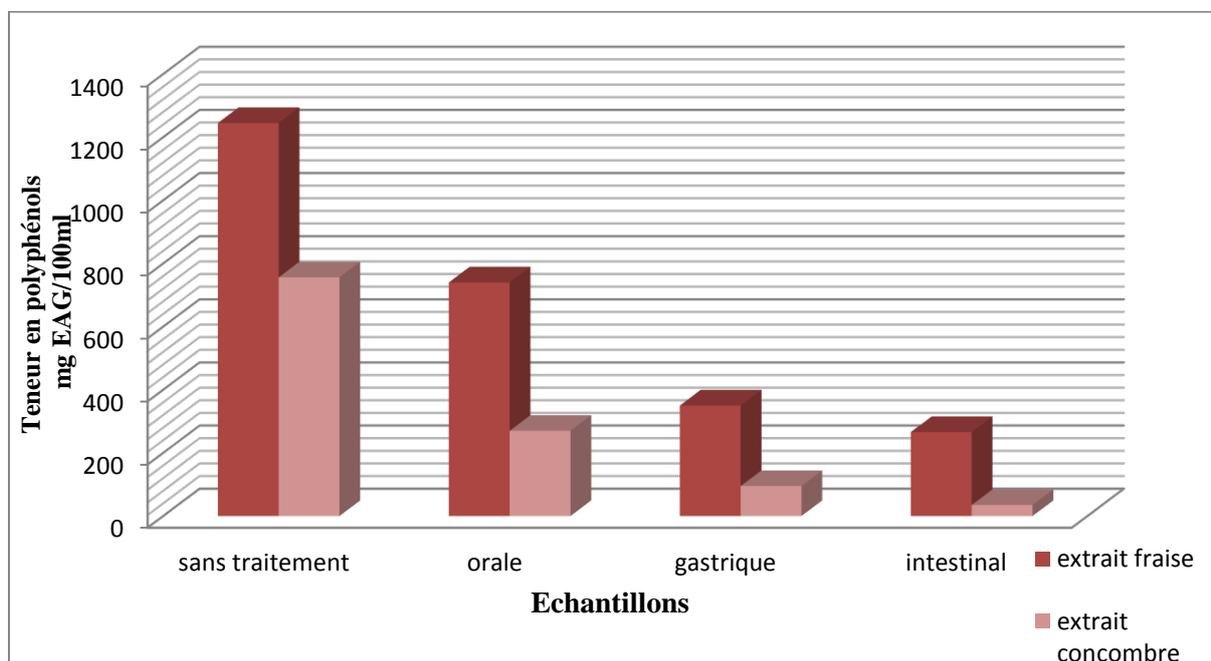


Figure 31 : Effet de la digestion *in vitro* sur la teneur en polyphénols (mg EAG/100ml).

II.10. Test d'adhésion *in vitro* aux cellules épithéliales du poulet

Les difficultés liées à l'étude de l'adhésion des bactéries *in vivo* ont conduit à développer des modèle d'adhésion *in vitro* (Kos et al., 2005). Avant la réalisation du test, nous avons confirmé que nos cellules épithéliales sont indemnes de contaminants par une coloration, suivie d'une observation microscopique dont la photographie 2 illustre que le tissu est dépourvu de contaminants.

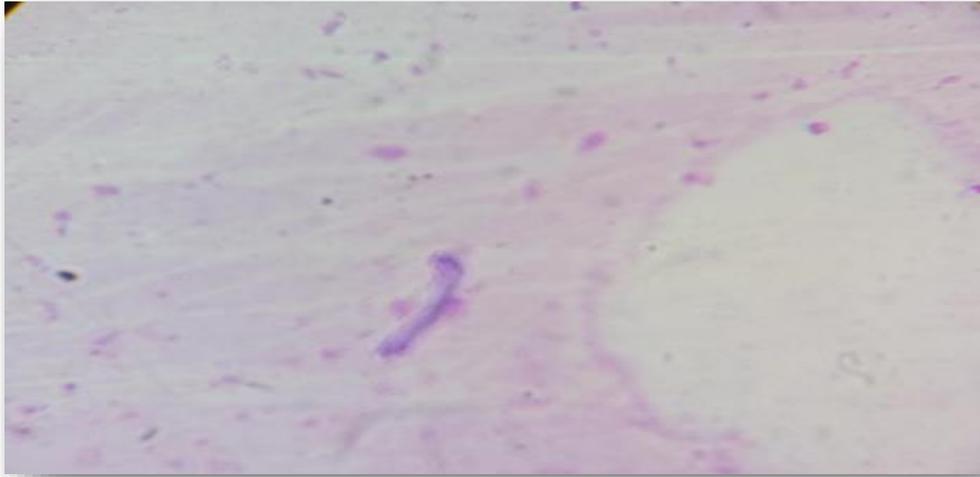


Photo02 : Photographie des cellules épithéliales témoins (grossissement $\times 40$)

Pour le test témoin, nous avons obtenu un nombre de cellules adhérentes de 120. Par ailleurs, pour les résultats du test expérimental, nous avons eu après 1h de digestion intestinale, un nombre de cellules adhérentes de 70, après 2h de digestion intestinale, nous avons compté 50 cellules de *L.plantarum* adhérentes.

En analysant les résultats obtenus (**figure 32**), nous pouvons conclure que la digestion bucco-gastro-intestinale affecte la capacité de *L.plantarum* à adhérer aux cellules épithéliales.

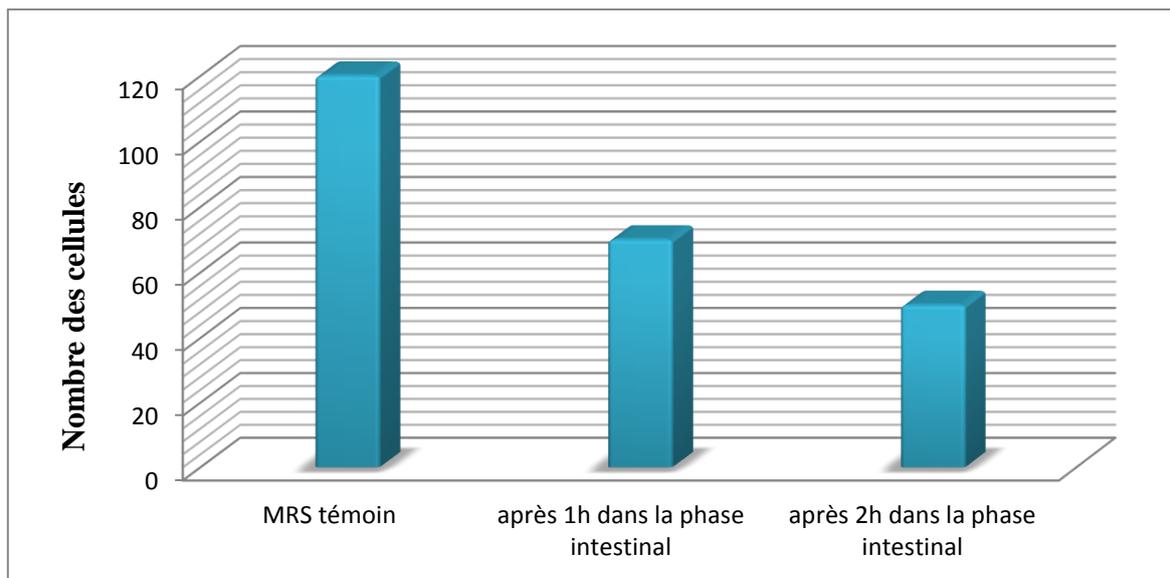
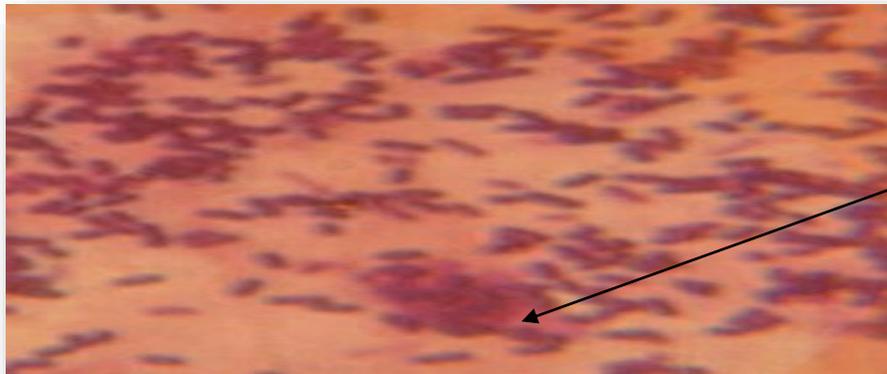


Figure 32: Nombre de cellules adhérentes aux cellules épithéliales (culture ré-isolée du liquide intestinal de la digestion).

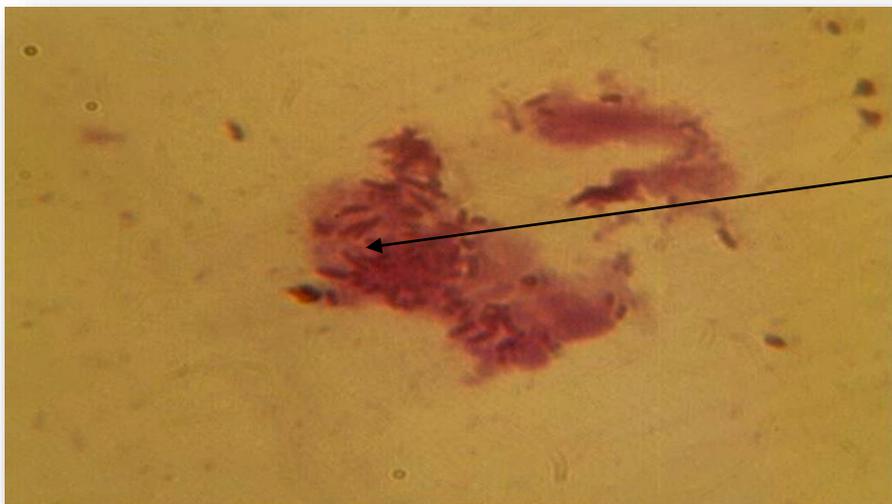
La photo **03** représente l'observation microscopique des cellules adhérentes aux cellules épithéliales.



Cellules adhérentes

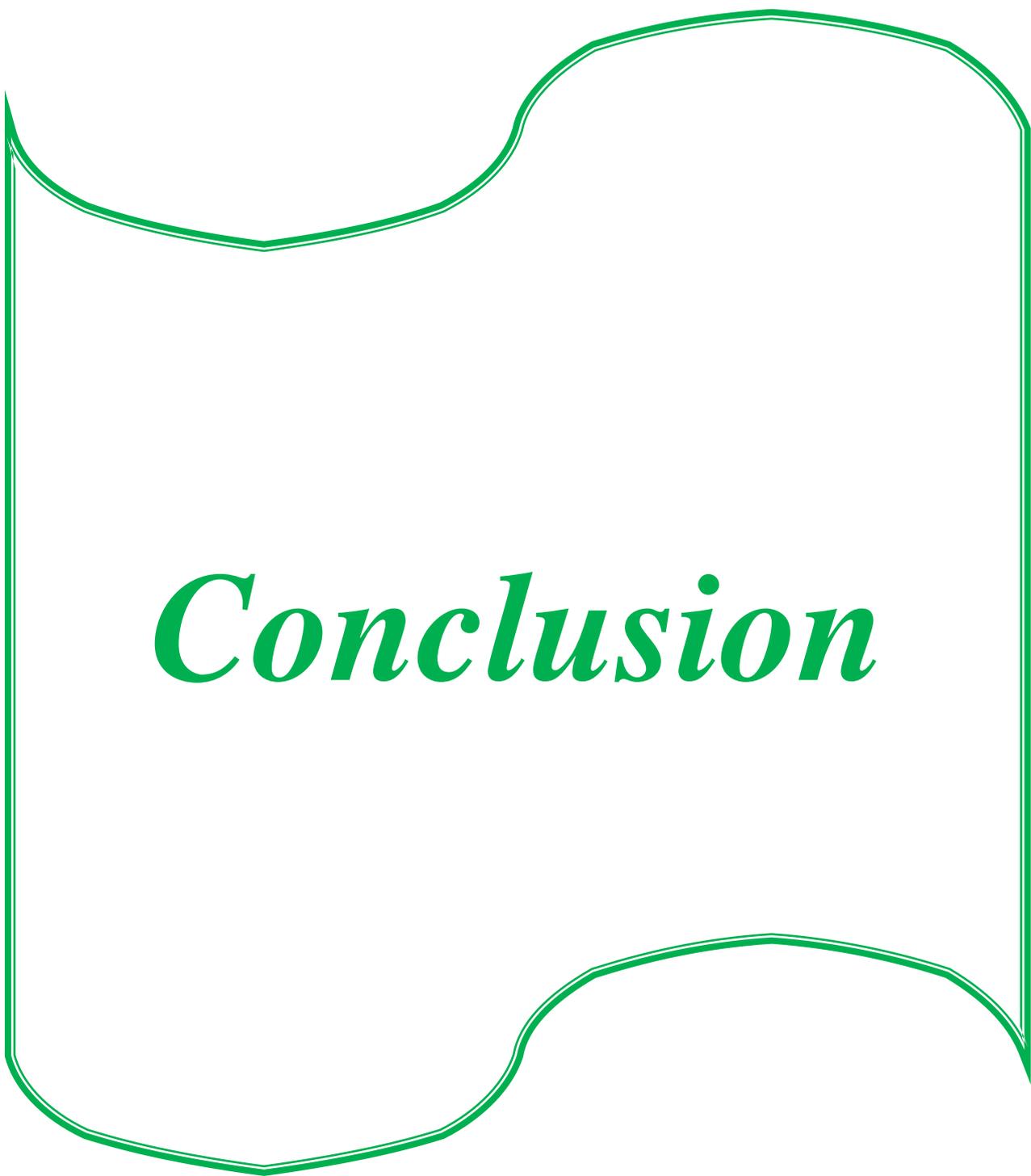
Photo 03 : Photomicrographie d'adhésion de *L.plantarum* S10 (culture témoin) aux cellules épithéliales (grossissement $\times 100$).

Le nombre des cellules adhérentes aux cellules épithéliales après phase intestinale sont illustrés par la photo **04**.



Cellules adhérentes

Photo 04 : Photomicrographie d'adhésion de *L.plantarum* S10 aux cellules épithéliales après 2 h d'incubation dans la phase intestinale (grossissement $\times 100$).



Conclusion

D'après les résultats obtenus *L. plantarum* S10 est résistante aux conditions de digestion bucco-gastro-intestinale. Cette dernière peut survivre aux conditions hostiles pour arriver au niveau intestinal à un niveau de population important. Cette souche répond à un critère de sélection de souche probiotique, la survie.

La micro encapsulation par l'alginate de sodium a contribué fortement à l'amélioration du taux de survie de *L.plantarum*, en la protégeant contre les activités enzymatiques, les bas pH, les sels biliaires et la pancréatine.

Les résultats ont montré que la matrice jus de concombre améliore la survie de la souche *L.plantarum* S10 au cours de la fermentation et lors du passage à travers les trois cavités simulées, par contre la survie est moins appréciée avec le jus de fraise.

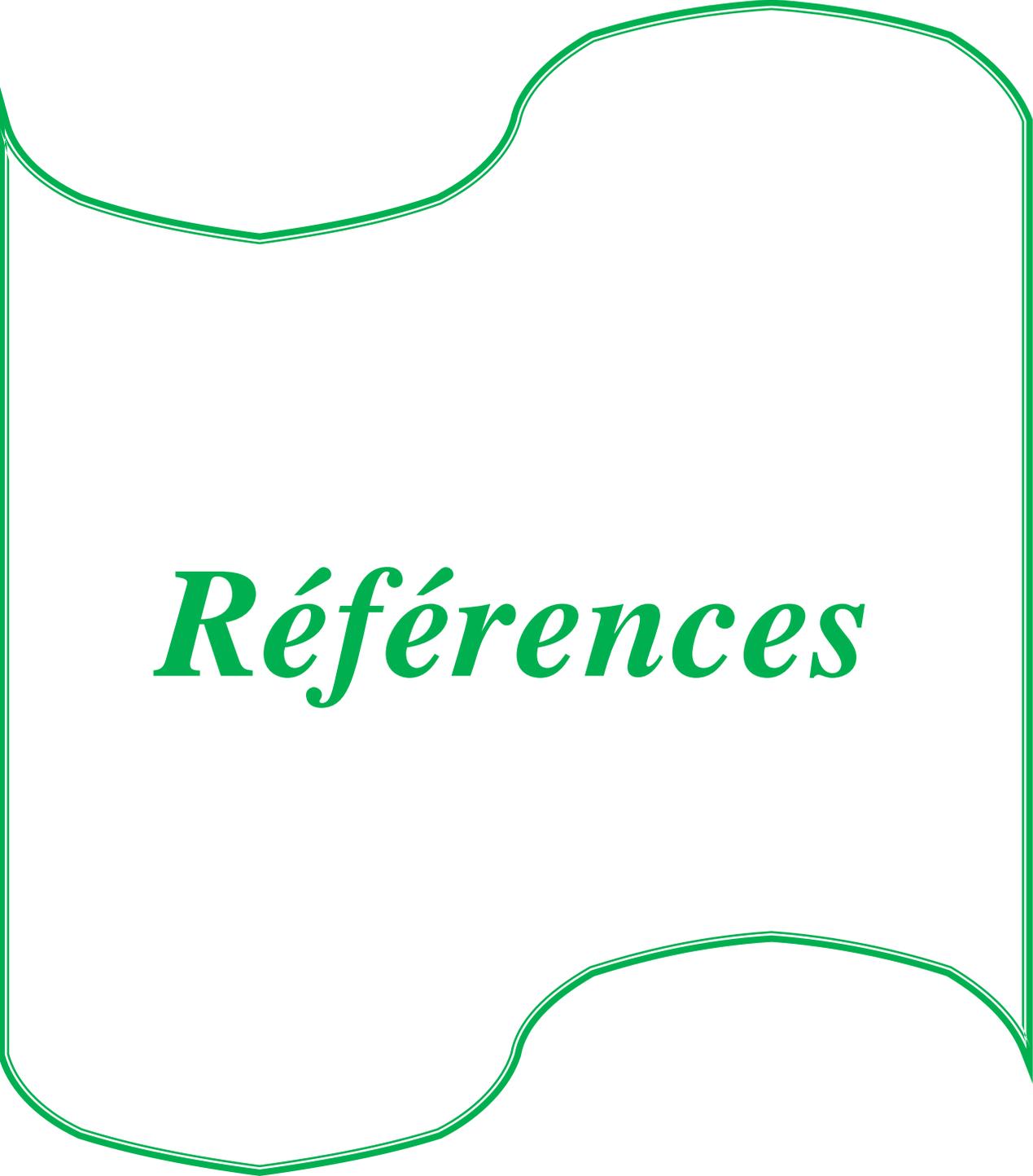
Notre souche a une bonne activité antioxydante. Elle montre une bonne résistance au peroxyde d'hydrogène, peut piéger les radicaux hydroxyles ainsi que ceux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl. Cette activité a été démontrée dans les jus de fraise et de concombre, après digestion en conditions simulant les tractus digestif et en présence des extraits des deux matrices alimentaires.

La combinaison bactéries libres - extraits de fraise ou de concombre et leur passage dans le liquide simulant la digestion montre une bonne survie de *L.plantarum* avec une évolution du statut des poly phénols et des flavonoïdes d'un segment intestinal à l'autre.

Les résultats du test d'adhésion ont montré que la digestion bucco-gastro-intestinale affecte la capacité de *L.plantarum* à adhérer aux cellules épithéliales.

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives pour compléter ce travail, ainsi nous proposons :

- Une évaluation *in vivo* de la survie et de la viabilité de cette souche dans le tube digestif.
- Une évaluation *in vivo* de leur profil antioxydant.



Références

A

Adriouch S , Kesse-GuyoE , 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.

Afify A M, Ramy M , Shaimaa R I M, Sultan M, Hussein M,2012.Antioxidant activity and biological evaluations of probiotic bacteria strains. *International Journal of Academic Research Part A*, 4(6), 131-139.

Ahire J.J, Mokashe N U, Patil H J, Chaudhari B L,2013. Antioxidative potential of folate producing probiotic Lactobacillus helveticus CD6. *J Food Sci Technol* , 50, 26–34.

Ait Seddik H, Bendali F, Gancel1 F, Fliss I , Spano G , Drider1 J,2017.Lactobacillus plantarum and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics & Antimicro Prot*, 9,111–122.

Alexandre Y, Le Blay G , Boisramé-Gastrin S, Le Gall F, Héry-Arnaud G , Gouriou S, ... et Le Berre R,2014. Probiotics: A new way to fight bacterial pulmonary infections? . *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(1), 9-17.

AOAC , 2000 .official Methods of Analysis .17thED .Maryland .U .S .A .360 .

Asemi Z, Zare Z, Shakeri H ,Sima-sadat S, Esmailzadeh H ,2013.Effect of Multispecies Probiotic Supplements on Metabolic Profiles, hs-CRP, and Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes . *Ann Nutrition and Metabolisme* ,63,1–9.

Ariza T A ,Patricia R ,Lucía C, Carmen S, Elsa M , Carmen Go , Beatriz C , Maurizio B, Jesús S,2018. Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs, *Food Chemistry*, 248 155–165

B

Basu A, Nguyen A, Betts N M, Lyons TJ,2014. Strawberry as a functional food: an evidence-based review. *Crit Rev Food Sci Nutr* ,54(6), 790–806.

Behnsen J , Deriu E , Sassone-Corsi M, Raffatellu M, 2013. Probiotics: properties, examples and specific applications.

Borriello P , Hammes W , W. Holzapfel, Marteau P , Schrezenmeir J , Vaara M , and.

Valtonen V, 2002. “Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria.” *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*,36, 775–780,

Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J ,Munoz-Quezada S, Gomez-Llorente C ,Gil A,2012.Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160–174.

Boizot N, Charpentier J P ,2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le Cahier des Techniques de l'INRA, Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, 79-82.

Botes M, van Reenen CA , Dicks L M T,2008. Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastro-intestinal model with infant milk formulations as substrate. *International Journal of Food Microbiology* ,128, 362-370.

Bourlioux P ,2014. Actualité du microbiote intestinalCurrent view on gut microbiota. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 72(1), 2014, 15-21.

Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology* ,28(1):25-30.

Breidt F , Caldwell J M ,2011. Survival of *Escherichia coli* O157 :7 in cucumber Fermentation Brines .*Journal of food science* ,76,198-203.

Buchmeier N , Bossie S , Chen C Y , Fang F C , Guiney D G, Libby S J,1997 . a transcriptional regulator of *Salmonella typhimurium*, is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophages. *Infection and Immunity*, 65, 3725–3730.

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

Butel M. J ,2014b. Probiotic .gut microbiota and health.

C

Cammarota G , Ianiro G , Bibbo S , Gasbarrini A ,2014 .Gut microbiota modulation: probiotics antibiotics or fecal microbiota transplantation. *Intern Emerg Med* 9:365–373.

Canani H. J, Flint S, Salminen , 2014. Expert consensus document : The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514.

Carlos J, Hernandez C, Ceballos-López L M , González-Correa C H, 2018. Polyphenols and Flavonoids in Colombian Fruit and Vegetables - Applications and Benefits: A Review.” *Journal of Food and Nutrition Research*, 6(3), 176-181.

Caselli M F, Cassol G C , Holton J, Zuliani G , Gasbarrini A,2013. Actual concept of "probiotics" : Is it more functional to science or business . *World journal of gastroenterology : WJG*, 19 (10), 1527.

Chang MH, Hong SF, Chen JH, Lin MF, Chen CS, Wang SC, 2016. Antibacterial activity Lactobacillus plantarum isolated from fermented vegetables and investigation of the plantaricin genes. *Afr J Microbiol Res* ,10,796–803.

Chen C Y O , Robles-Sanchez M , Gonzalez-Aguilar G A, 2014. Phenolic compounds: Their journey after intake. *Food & Function*, 5(2), 189–197.

Chourfa M, Allem R, 2016. Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'Aloesia triphylla. *Phytothérapie* , 14(3),181-187.

Chiha F, Benkara Y, Sellami A , Karouche S, 2016. Stress Oxydant : influence d'une complémentation nutritionnelle en antioxydant et adaptational exercice physique. *Science humains* 45(B), 52-63

Chu Y F, Sun J, 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agric Food Chem* ,50 (6),6910-6.

Collins J,2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin : correlation with in vivo findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 386s–392s.

D

Daglia M,2012. Polyphénols en tant qu'agents antimicrobiens. *Opinion actuelle en biotechnologie* , 23(2) 174-181

De LeBlanc A M ,LeBlanc J G, Perdigon G, Miyoshi A, Langella P, Azevedo V, Sesma F,2008. Oral administration of a catalase-producing Lactococcus lactis can prevent a chemically induced colon cancer in mice. *J. Med. Microbiol*,57, 100–105.

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

De Vries M C , Vaughan E E , Kleerebezem M, de Vos W M, 2006. Lactobacillus plantarum survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16, 1018-1028.

Drouault S , Corthier G ,2001 . Health effects of lactic acid bacteria ingested in fermented milk. *Vet Res.* 32(2): 101-17.

Duda-Chodak ,2012 . The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota.

Dunne C L, Murphy L., Thornton G, Morrissey D., Halloran S. , Feeney M., Flynn S , G. Fitzgerald, C. Daly B, Shanahan F, Collins S, (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin : correlation with *in vivo* findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73, , 386–392.

E

Erattea D, Dowlinga K , Barrowb CJ, Adhikaric B, 2018.Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review *.Trends in Food Science & Technology*,17,121-131

F

Falah S, Suzuki T, Katayama T, 2008. Chemical constituents from Swietenia macrophylla bark and their antioxidant activity.*Pak J Biol Sci* .

FAO/WHO, 2001.Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

G

Garcia E F , Luciano WA , Xavier D E, Whyara C , Da Costa A , Oliveira DS , Franco OL, Marcos A , Júnior DM, Brígida T L ,Lucena R, Picão C, Serela MM, de Souza LE ,2016 .Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected *Lactobacillus* Strains *.Frontier in Microbiologie* ,30,150-155.

Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot MJ,2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products.*Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5),1370-1373.

Ghadimi D, Folster H , De vrese M ,Winkler P ,Heller KJ ,Schrezenmeie J,2008.. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. *Immunobiology*. 213 : 677–692.

Ghedadba N, Bousselsela H, Hambaba L, Benbia S, Mouloud Y, 2014. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de Marrubium vulgare L. *Phytothérapie* , 12(1),15-24.

Ghedadba N, Hambaba L, Ayachi A, Aberkane M, Bousselsela H, Oueld-Mokhtar S, 2015. Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de Marrubium deserti de Noé. *Phytothérapie* .13(2) ,118-129.

Golowczyc M A , Silva J , Teixeira P , De Antoni G L , Abraham A G , 2011. Cellular injuries of spray-dried Lactobacillus spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 556-560.

Cömert, E. D., & Gökmen, V. (2017). Antioxidants bound to an insoluble food matrix: Their analysis, regeneration behavior, and physiological importance. *Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 382–399

H

Hamia C , Guergab A , Rennane N , Birache M , Haddad M , Saidi M , Yousfi M,2014. Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du rhanterium adpressium. *Annales des sciences et technologie*, 6 (1),22-27.

Heleno S A, Martins A , Queiroz M J R P , Ferreira I C. F R,2015. Bioactivity of acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*,

Heo S J , Park J E, Lee K W , Jeon YJ, 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*, 96(4) ,1529-1632.

I

Idoui T ,2013 .Changes of microbial Population and Some Composition in Carrot Juice During Fermentation With Selected Autochthonous Lactobacillus fermentum SK5 isolated from vagina of a healthy woman . *Clinicl microbiology* ,333,1-8

Iravani S , Korbekandi H, Mirmohammadi SV ,2014.Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products .*J Food Sci Technol* , 6,3-6.

J

Jamaly N, Benjouad A, Bouksaim M, 2011. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from known popular traditional Moroccan dairy products. *British microbiology research Journal*,1(4) 79-94.

Jiménez-Pranteda, M L , Poncelet D , Náder-Macías M E , Arcos A , Aguilera M., Monteoliva-Sánchez M , Ramos-Cormenzana A,2011. Stability of Lactobacilli encapsulated in various microbial polymers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.

Jose NM, Bunt CR, Hussain M A , 2015. Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms.Journal of Physiology and Pharmacology*, 63, 497–503.

K

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

Kawabata K, Sugiyama Y., Sakano T., Ohigashi, H. (2013). Flavonols enhanced production of anti-inflammatory substance(s) by Bifidobacterium adolescentis: Prebiotic actions of galangin, quercetin, and fisetin. *BioFactors*, 39, 422–429.

Karlund A, Hanhineva K, Lehtonen M, Karjalainen R, Sandell M,2015. Nontargeted metabolite profiles and sensory properties of strawberry cultivars grown both organically and conventionally. *J Agric Food Chem*. 63(3): 1010-19

Kenny H, Smidt E, Mengheri, Miller B, 2010. Probiotics – do they have a role in the pig key factor in the therapeutic effects of polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 3,198–212.

Khemariya P, Singh S, Jaiswal N, Chaurasia SNS ,2016. Isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* from vegetable samples. *Food Biotechnol*, 30,94–62.

Klaenhammer T R, et Kullen M J, 1999. Selection and design of probiotics. *International journal of food microbiology*, 50(1), 45–57.

Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M , Frece J Matosic S,2005. Adesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92 .*Journal of applied microbiology*,94,981-987.

L

Lavinia B C , Manea I ,Bratu M G , Avram D , Nicolescu C L ,2012 .Evaluation of the cabbage and cucumber juices as substrate for *Lactobacillus acidophilus* LA-5 .*Romanian biotechnological Letters* ,17 ,7418-7429.

Le Blanc J G, Del Carmen S, Miyoshi A. Azevedo V ,Sesma F, Langella P, Bermudez-Humaran L, Watterlot L, Perdigon G,2011. Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice. *J. Biotechnol*, 151, 287–293.

Lee J , Hwang K , Chung M , Cho D , Park C,2005. Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to reactive oxygen species (ROS): Role for a metal ion chelating effect. *Journal of Food Science*, 70, 388–391.

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

Lin T Y , Chien M F C,2007. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria .*Food Science And Technology-New York-Macel Dekker* , 139,175-198.

Lin M , Yen C,1999 . Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1460–1466.

Lopez M , LI N , KATARIA J , RUSSELL M. , NEU J,2008. Live and ultraviolet-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease flagellin-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*,138 , 2264–2268.

Loveleen K S ,Arora M ,2015. Probiotics, Prebiotics and Microencapsulation - A Review, Critical Science and Nutrition Luthria D L,2006. Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(14), 2266–2272.

M

Maleki D, Azizi A, Vaghef E, Balkani S, Homayouni A,2015. Methods of Increasing Probiotic Survival in Food and Gastrointestinal Conditions. *Prensa Med Argent*, 10,14-20

Manach ,Williamson Morand C, Scalbert A, Rémésy C,2005 . Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in human ;Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.*;81(1).

Martínez-Ferria E, González-Barreiró C, Cancho-Grandeb B, Battinoc M, Simal-Gándarab J,2018. Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. *Food Chemistry* ,248, 155–165.

Martins E M , Ramos A M , Vanzela E S L, Stringheta P C, Pinto C L D, Martins J M, 2013. Products of vegetable originI a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51(2), 764-770.

Martins E M F, Ramos A M , Martins M L, Rodrigues M Z, 2015. Research and development of probiotic products from vegetable basesI a new alternative for consuming functional food. In V. R. Rai J. A. Bai. Benefiial microbes in fermented and functional foods .*Boca RatonI CRC Press*,207-233.

Marcos A , Junior DM, Brígida T L ,Lucena R, Picão C, Serela MM, de Souza LE , 2016 .Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected Lactobacillus Strains .*Frontier in Microbiologie* ,30,16-18

Melgar-Lalanne G, Rivera-Espinoza Y, Hernández-Sánchez H ,2012. Lactobacillus plantarum: An overview with emphasis in biochemical and healthy properties.

Michida H , Tamalampudi S , Pandiella S S, Webb C , Fukuda H, Kondo A, 2006. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of Lactobacillus plantarum under gastrointestinal tract conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 28,73-78.

Michiels J A, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J O, Dommes J,2017. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chem*, 130,986–993.

Minikus M, Alminger A, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carriere T, Boutrou R, Corredig M, Dupont D, 2014. A standartized static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food Funct*, 5, 1113-1124.

Mueller D, Junga K, Wintera M, Rogollb D, Melcherb R, Kulozic U, Schwarzd K, Richlinga E,2018.Encapsulation of anthocyanins from bilberries – Effects on bioavailability and intestinal accessibility in humans. *Food Chemistry* ,248 ,217–224

O

Ozidal T, Sela D A , Xiao J , Boyacioglu D , Chen F , Capanoglu E,2016. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients*, 8(2).

P

Panghal A , Janghu S , Virkar K ,Gat Y, Kumar V ,Chhikara N, February 2018. Potential non-dairy probiotic products A healthy approach . *Food Bioscience*, 21, 80-89.

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 .

Q

Qhairul N , Izzreen M, Fadzelly M A, 2013. Phytochemicals and antioxidant properties of different parts of *Camellia sinensis* leaves from Sabah Tea Plantation in Malaysia. *International Food Research Journal* , 20(1).

Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx M, Cazin M, Cazin J C, Bailleul F, Trotin F, 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology* ,72(1),35-42.

Qurat A R , Masud T, 2013. Recent Trends and Applications of Encapsulating Materials for Probiotic Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(3), 231-244 .

S

Sadok S , HASSEN A , BOUSAID B ,2016. Evaluation de la qualité des huitres creuses *crassostrea gigas* au cours du stockage réfrigéré:suivi de viabilité cellulaire.*Scien. Tech.Mer de Salammbô* , 42,87-90 .

Sánchez B ,Delgado S , Blanco-Míguez A , Lourenço A , Gueimonde M ,Margolles A,2016 .Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease .*Mol.Nut .Food Res* , 61(1),160-240

Santarmaki V, Kourkoutas Y, Zoumpopoulou G, Mavrogonatou E, Kiourtzidis M, Chorianopoulos N, Tassou C, Tsakalidou E, Simopoulos C, Ypsilanti P, 2017. Survival, Intestinal Mucosa Adhesion, and Immunomodulatory Potential of *Lactobacillus plantarum* Strains. *Current Microbiology*, 74(9), 1061–1067

Santo D E, Perego P , Convertib A , Oliveira N M ,2011.Influence of food matrices on probiotic viability A review focusing on the fruity bases. *Trends in Food Science & Technology* ,22 ,377-385

Scalbert A , Manach C, Morand C, Rémésy C , Jiménez L ,2005. Polyphénols alimentaires et la prévention des maladies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306.

Shori A B , 2015.The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage, *Biocatalysis and AgriculturaBiotechnology* ,4(4) ,423-431.

Shori B A , 2017.Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24 ,1-5.

Siezen R.J, HylckamaV, Vlieg J E, 2011. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum* a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories* , 10, 1-13.

Sifour M, Ouled-Haddar H, Idoui T, January 2012. Microencapsulation d'un *Lactobacillus plantarum* probiotique isolé du jabot de poulet: Etude de la stabilité dans les conditions du tube digestif.

Sirigne S O , Fall A D, Gueyel R, Diopl A, Diatta K, Diopl N, Ndiayel B , Diopl M.Y , 2015. Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenacea) International. *Journal of Biological. Chemical. Science*, 9(3), 1263-1269.

Sökmen B B , Aydın S, Kınalıoğlu K,2012 . Antioxidant and antibacterial properties of a lichen species *Diploschistes scruposus* (Schreb.).*Journal of Biology*, 71(1), 43-51.

Spyropoulos B G, Misiakos E P, Fotiadis C, Stoidis C,2011.Antioxidant properties of probiotics and their protective effects in the pathogenesis of radiation-induced enteritis and colitis. *Dig. Dis. Sci*, 56, 285–294.

Stratil P, Klejdus B, Kuban V, 2006 .Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *J Agric Food Chem*, 54(3):607-16.

T

Taale E, Savadogo A, Sina H, Zongo C ,Karou S D, Baba-Moussa L and Traore A S ,2016.Searching For fermented Food in Burkina Faso By Molecular Methods. International Journal of Applied Pharmaceutical Technology,244,129-137.

Turkmen N, Velioglu YS, Sari F, Polat G. 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules* 12(3):484-496.

Tripathi M K , Giri S K,2014 .Probiotic Functional Foods survival of probiotic during processing and storage. *Journal of functional foods*,9,225-241

Tufarelli V, Laudadio V, 2016 .An overview on the functional food concept :prospective applied reserches in probiotic,probiotic and synbiotics. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 4 , 273-278

V

Valtonen V, March 2002.Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases, *Society of America*, 36, 775–780.

Velderrain-Rodriguez G R , Palafox-Carlos H , Wall-Medrano A , Ayala-Zavala J F ,Vijendra M ,Shah C ,Mokashe N , Chavan R, Yadav H ,Prajapati J ,2015. Probiotics as Potential Antioxydants :A Systèmatic Review .*J. Agricultural .food Chemestry* ,63(14),21-30

W

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

Wang Y , Li C , Liu P , Ahmed Z , Xiao P , Bai, X , 2010. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Journal of Applied Microbiology*,82, 895-903.

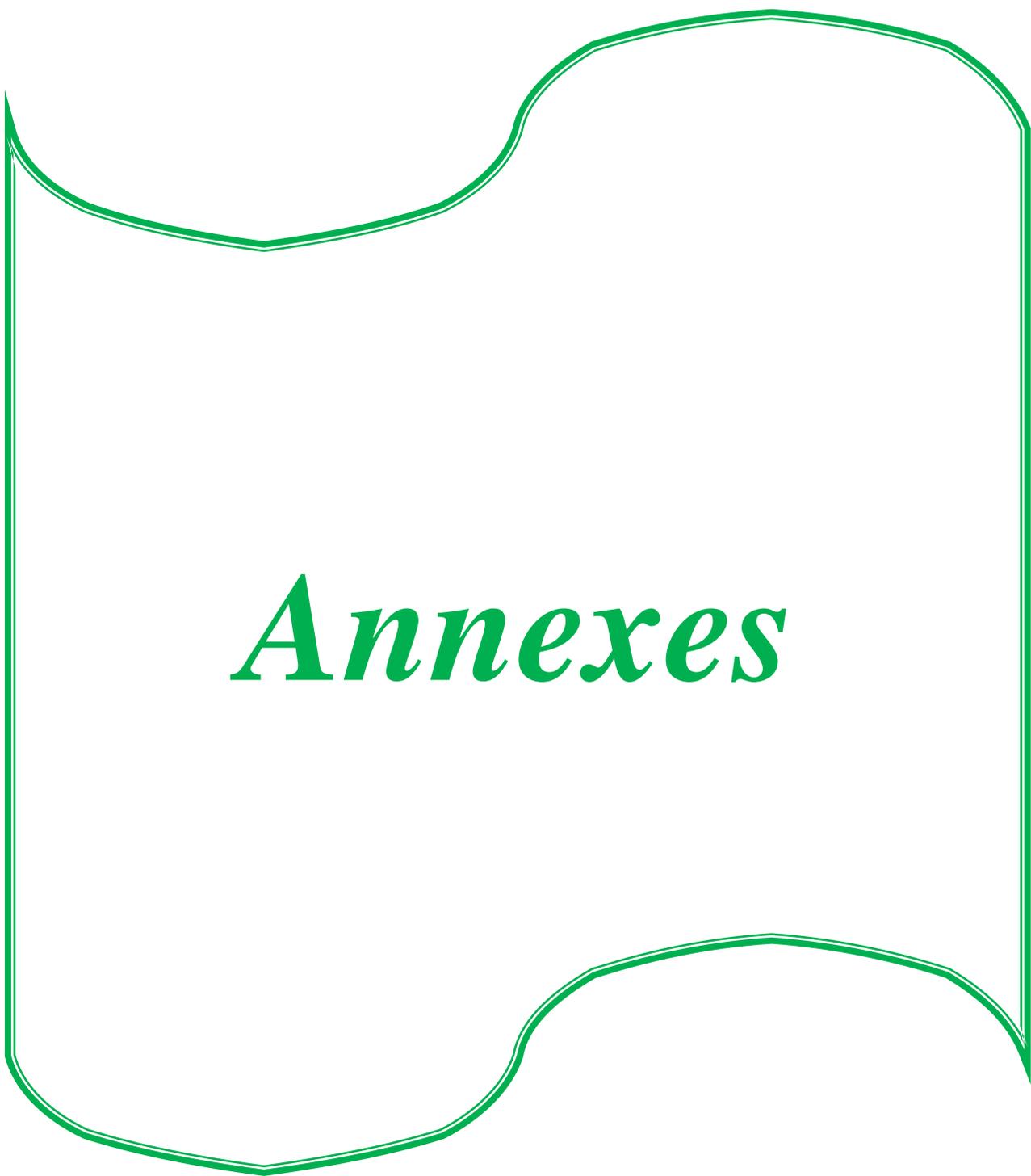
Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, Wang Y , Li W, 2017 . Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria .*Nutrients*, 9, 521-525.

Wassenaar T M , Lukjancenko O ,Chichester W,2014.Comparative genomics of *Lactobacillus* and other LAB. In: Holzapfel WH, Wood JB (eds) Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. *Current Microbiology*.

Z

Zago M, Fornasari M E , Carminati D, Burns P, Suàrez V, Vinderola G, Reinheimer J , Giraffa G, 2011.Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*. 28 (5), 1033-1040.

Zhu H , Hart C A , Sales D , Roberts N B , 2006. Bacterial killing in gastric juice – effect of pH and pepsin on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. 55, 1265-1270



Annexes

Annexes

1. Composition des milieux et des tampons

❖ Bouillon Man-Rogosa-Sharpe

Ingrédients	unité
Peptone	10g
Extrait de levure	4g
Extrait de viande	8g
Glucose	20g
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.05g
Tween 80	1mL
Eau distillée	1000mL

❖ Gélose MRS pH=6,2

Ingrédients	unité
Peptone	10g
Extrait de levure	5g
Extrait de viande	10g
Glucose	20g
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.05g
Tween 80	1,08mL
Agar agar	15g
Eau distillée	1000mL

❖ Tampon Phosphate Salin PBS

Ingrédients	unité
K ₂ HPO ₄	1.21g
KH ₂ PO ₄	0.34g
NaCl	8g
Eau distillée	1000mL

Annexes

❖ Tampon phosphate potassique (2M) pH=7

Ingrédients	unité
K ₂ HPO ₄	69.5
KH ₂ PO ₄	13.5
Eau distillée	1000mL

Annexes

Photos des résultats de la survie des cultures témoins : $\times 10^9$ UFC/ml

Culture libre :



Culture libre sans traitement



Après phase orale

Culture encapsulé



Culture encapsulée sans traitement



Après phase orale

Annexes

❖ Les courbes d'étalonnages

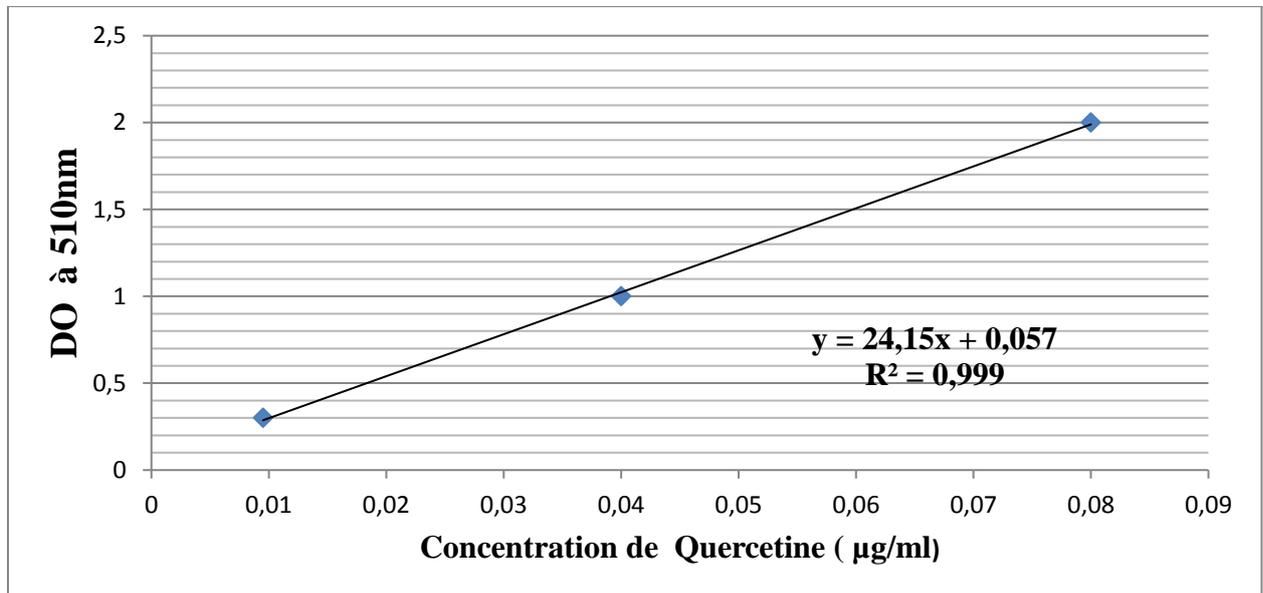


Figure 2 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

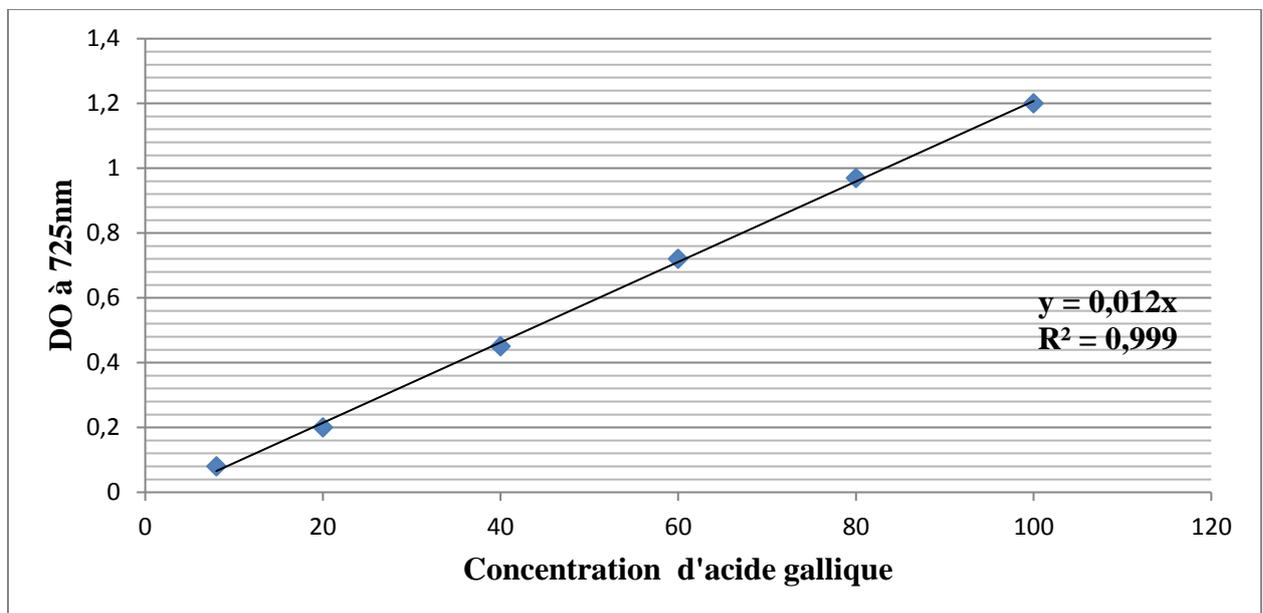


Figure 2 : Courbe d'étalonnage des polyphénols mg/ml (acide gallique).

Réalisé par : M ^{elle} Manel FERKHI M ^{elle} Hadjer CHEURFI	Encadreur : P ^r . Tayeb IDOUI.
	Date de soutenance : 04/07/2018

Thème : Viabilité et performances probiotiques de *Lactobacillus plantarum* S10 dans un système simulé au tube digestif

Résumé

Le but de notre travail est l'évaluation de la survie de *L.plantarum* S10 (culture libre et encapsulée) aux conditions simulées à la digestion, déterminer son activité antioxydante et celles des extraits de la fraise et du concombre et l'effet de la combinaison sur la viabilité et la survie lors de la digestion bucco-gastro-intestinale.

Les résultats ont montré que la souche est résistante *in vitro* aux conditions simulées à la digestion, que la micro encapsulation améliore le taux de survie aux mêmes conditions. Les matrices jus de fraise et jus de concombre améliorent la survie de la souche lors de la digestion *in vitro*, de même, ces matrices ont permis d'avoir une bonne activité antioxydante. La combinaison bactérie-extrait a montré une augmentation du taux de survie avec une perte en composés phénoliques et flavonoidiques et une diminution du pouvoir d'adhésion au cours du passage dans les différents contenus de digestion.

Mots clés : *L.plantarum* S10, survie, digestion, extraits, activité antioxydante, jus.

Abstract

The aim of our work is to evaluate the survival of *L.plantarum* S10 (free culture and encapsulated) under simulated digestion conditions, to determine its antioxidant activity and those of strawberry and cucumber extracts and the effect of combination on viability and survival during *in vitro* digestion.

The result showed that the strain is resistant *in vitro* to digestion simulated conditions, that micro encapsulation improves the survival rate under the same conditions. Strawberry juice and cucumber juice matrix improved the survival of the strain during *in vitro* digestion, and these matrixes permit to have good antioxidant activity. The bacterium-extract combination showed an increase in the survival rate with a loss of phenolic and flavonoid compounds, and a decrease in adhesion potential during the passage in different digestion contents.

Key words: *L.plantarum* S10, survival, digestion, extract, antioxidant activity, juice.

ملخص

الغرض من دراستنا هو تقييم مدى بقاء البكتيريا لاكتوباسيلوس س 10 على قيد الحياة (حررة و مغلفة) في شروط محاكية للجهاز الهضمي ، تحديد نشاطها المضاد للأكسدة، وكذا تحديد النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات الفراولة والخيار وتأثير الجمع بينهما على فعالية ومدى قدرة هذه السلالة على البقاء على قيد الحياة أثناء مراحل الهضم .

أظهرت النتائج أن هذه السلالة مقاومة للظروف المحاكية للجهاز الهضمي، وأن التغليف الجزئي يحسن معدل البقاء على قيد الحياة تحت نفس الظروف. و أن كل من عصير الفراولة و الخيار يحسنان من قدرة بقاء السلالة حية أثناء عملية الهضم خارج الخلية، و أن هذه المصفوفات تتمتع أيضا بنشاط مضاد للأكسدة جيد. أظهرت نتائج الجمع زيادة في معدل البقاء مع تناقص في تركيز المركبات الفينولية والفلافونويدات , و اثبتت النتائج أيضا انخفاض في قدرة الالتصاق الذاتي لسلالة اللاكت باسيلوس أثناء المرور خلال محتويات الهضم المختلفة.

الكلمات المفتاح : اللاكت باسيلوس س 10, البقاء على قيد الحياة, الهضم, مستخلص, نشاط مضاد للأكسدة, عصير

