

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 يحيى-جيجل

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



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم: الميكروبيولوجيا التطبيقية
وعلوم التغذية

Mémoire de fin d'études

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

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Performances probiotiques de *Lactobacillus plantarum* S10 lors
de la digestion bucco-gastro-intestinale en présence de deux
matrices végétales**

Membres de Jury

Président : Pr. Mohammed SIFOUR

Examineur : Dr. Tarek KHENNOUF

Encadreur : Pr. Tayeb IDOUI

Présenté par :

M^{elle} : Nadia ALIOUCHE

M^{elle} : Ibtissem CHEKIRED

Année Universitaire 2018-2019

Numéro d'ordre (bibliothèque) :



Remerciements

Nous espérons que les quelques mots que nous nous apprêtons à écrire réussiront à retranscrire fidèlement nos sentiments.

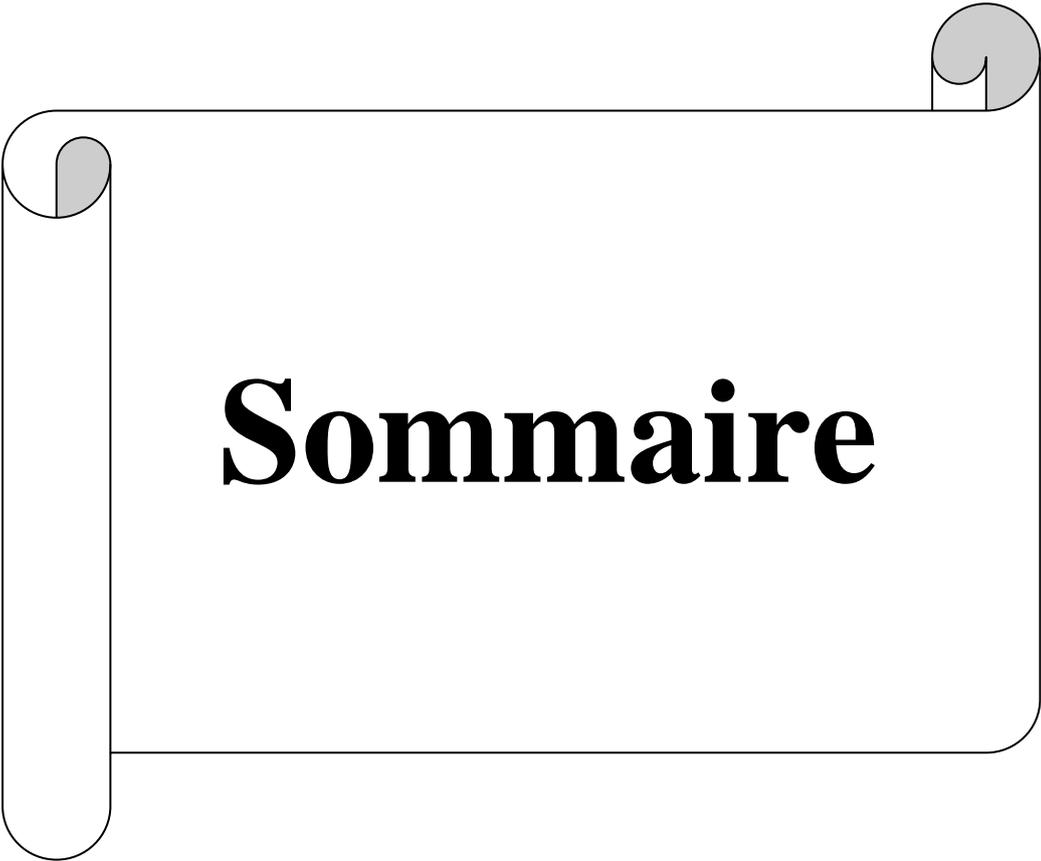
En premier lieu, nous remercions « Allah », le tout puissant, de nous avoir aidé à surmonter toutes les difficultés lors de nos études et qui nous avoir donné la patience, la volonté et le courage afin d'arriver à la finalité de ce travail.

*Notre première pensée va tout naturellement à notre encadreur, **Pr. Tayeb IDOUI** qui nous a fait l'honneur de veiller et diriger ce travail. Nous avons beaucoup apprécié sa confiance, ses conseils et sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nous tenons particulièrement à remercier les membres du jury **Pr. Mohammed SIFOUR** et **Dr. Tarek KHENNOUF** d'avoir accepté de juger ce travail.*

Enfin, nous remercions gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.





Sommaire

Liste d'abréviations	
Liste de figures	
Liste de tableaux	
Liste de photos	
Introduction.....	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
Chapitre I. Les probiotiques	
I.1. Historique et définition des probiotiques.....	3
I.2. Critères de sélections des probiotiques.....	3
I.2.1. Viabilité des probiotiques dans le tube digestif.....	5
I.2.1.1. Résistance aux conditions gastriques.....	5
I.2.1.2. Résistance aux conditions intestinales.....	6
I.2.1.3. Adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin	7
I.3. Les probiotiques commercialisées.....	8
I.4. Généralités <i>sur Lactobacillus plantarum</i>	11
I.4.1. Potentiel probiotique de <i>Lactobacillus plantarum</i>	12
Chapitre II : Les antioxydants et les matrices alimentaires	
II.1. Stress oxydatif et l'activité antioxydante.....	13
II.2. Les polyphénols de la fraise et du persil comme antioxydants.....	13
II.3. Propriétés antioxydantes des polyphénols et effet santé.....	15
II.4. Interaction entre les bactéries et les polyphénols.....	16
II.4.1. Métabolisme des polyphénols par la microflore intestinale.....	16
II.4.2. Modulation de microbiote intestinale.....	16
II.5. Activité antioxydante des probiotiques	17
II.6. Les aliments transmetteurs et protecteurs des probiotiques.....	19
II.6.1. Les légumes et les fruits comme véhicule de probiotique.....	20
Partie II : Etude expérimental	
II.1. Matériel biologique	21
II.2. Revivification de la souche et standardisation de l'inoculum	21
II.3. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques de <i>Lactobacillus plantarum in vitro</i>	22
II.3.1. Résistance au pH gastrique.....	22
II.3.2. Résistance aux sels biliaires.....	22
II.3.3. Test d'hydrophobicité	23
II.3.4. Test d'auto et co-agrégation	23

II.3.5. Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales.....	24
II.4. Détermination de l'activité antioxydante de <i>Lactobacillus plantarum in vitro</i>	25
II.4.1. Résistance à la toxicité du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂ Scavenging Activity)	25
II.4.2. Piégeage des radicaux libres de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)	25
II.4.3. Piégeage des radicaux hydroxyles	26
II.5. Préparation des extraits et dosages principes actifs	26
II.5.1. Extraction par macération à partir des feuilles et tiges de persil	27
II.5.2. Extraction des composés phénoliques à partir des pulpes de fraises	27
II.5.3. Dosage des principes actifs (composés phénoliques).....	27
II.5.3.1. Dosage des polyphénols totaux	27
II.5.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	28
II.6. Détermination de l'activité antioxydant des extraits.....	28
II.6.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	28
II. 6.2. Réduction de fer (FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power)	28
II.7. Préparation des jus de fraise et de persil lactofermentés.....	29
II.7.1. Evaluation de quelques paramètres de fermentation	30
II.8. Mesure de l'activité antioxydante de la bactérie après 24 heures de fermentation.....	31
II.9. Effet de la digestion bucco-gastro-intestinale sur <i>L. plantarum in vitro</i>	31
II.9.1. Préparation des solutions mères des liquides simulés de la digestion.....	31
II. 9.2. Protocole expérimental de la digestion bucco -gastro-intestinale <i>in vitro</i>	32
II.9.2.1. Effet de la digestion sur la survie, l'activité antioxydante et aptitudes probiotiques de <i>L. planarum</i> S10 <i>in vitro</i>	34
II.9.2.2. Effet de la digestion sur la biodisponibilité des polyphénols et des flavonoïdes <i>in vitro</i>	34
II.9.2.3. Effet de la digestion sur la survie, l'activité antioxydante et aptitudes probiotiques de <i>L. planarum</i> S10 en présence des extraits et des jus (persil, fraise) <i>in vitro</i>	34
II.10. Montage expérimental de la digestion <i>in vitro</i>	35
II. 11. Analyse statistique	35

Partie III : Résultats et discussion

III.1. Vérification de la pureté de la souche	36
III.2. Evaluation de quelques aptitudes probiotique de <i>L. plantarum in vitro</i>	36
III.2.1. Résistance au pH gastrique	36
III.2.2. Résistance aux sels biliaires	37
III.2.3. Hydrophobicité des surfaces cellulaires.....	37

III.2.4. Capacité d'auto/co-agrégation	39
III.2.5. Adhésion aux cellules épithéliales	40
III.3. Détermination <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante de <i>L. plantarum</i> S10	41
III.3.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène	41
III.3.2. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	43
III.3.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles	43
III.4. Dosages des composés phénoliques des extraits et des jus (fraise et persil).....	45
III.4.1. Dosage des polyphénols totaux.....	45
III.4.2. Dosage des flavonoïdes	46
III.5. Détermination de l'activité antioxydante de l'extrait et de jus de fraise et de persil	47
III.5.1. Piégeage de radical libre DPPH.....	47
III.5.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power)	48
III.6. Evaluation de quelques paramètres de fermentation	49
III.6.1. Evaluation du pH et d'acidité	49
III.6.2. Evaluation du nombre de cellules viables	50
III.7. Activités antioxydantes de la bactérie après 24heures de fermentation	51
III.7.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène.....	51
III.7.2. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	52
III.7.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles.....	53
III.8. Effet de la digestion sur la viabilité de <i>L. plantarum</i> S10 <i>in vitro</i>	54
III.8.1.Nombre de cellules viables	54
III.8.2. Aptitudes probiotiques de <i>L. plantarum</i> après la digestion bucco-gastro-intestinale	55
III.8.2.1. Résistance au pH gastrique	55
III.8.2.2. Résistance aux sels biliaires	56
III.8.2.3.Auto-agrégation et Hydrophobicité	57
III.8.3. Activité antioxydante de <i>L. plantarum</i> après digestion bucco-gastro-intestinale.....	59
III.8.3.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène	59
III.8.3.2.Activité de piégeage des radicaux libres de DPPH.....	59
III.8.3.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles.....	61
III.9. Digestion buco-gastro-intestinale de jus et des extraits	61
III.9.1. Dosage des polyphénols et flavonoïdes	61
III.9.2.Effet de la digestion sur l'activité antioxydante des jus bruts et leurs extraits <i>in vitro</i>	63
III.10. Digestion <i>in-vitro</i> en combinant bactéries /extraits, bactéries/ jus	65
III.10.1.Aptitudes probiotiques de <i>L. plantarum</i> dans sa matrice.....	65

III.10.1.1. Survie et viabilité de <i>L. plantarum</i>	65
III.10.1.2. Résistance au pH gastrique	66
III.10.1.3. Résistance aux sels biliaires.....	68
III.10.1.4. Capacité d'auto-agrégation	68
III.10.1.5. Hydrophobicité	69
III.10.2. Activité antioxydante de <i>L. plantarum</i> en combinaison avec les matrices.....	70
III.10.2.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène	70
III.10.2.2. Piégeage de radical DPPH	71
III.10.2.3. Piégeage du radical hydroxyle	72
III.11. Biodisponibilité des polyphénols et flavonoïdes après la combinaison de <i>L. plantarum</i> avec les matrices végétales (extrait / jus) lors de la digestion.....	73
III.12. Montage de digestion bucco-gastro-intestinale	75
Conclusion générale.....	77
Liste bibliographique	78
Annexes	

ATR : Acid tolerane reponse

BSH : Bile salt hydrolase

CAT : Catalase

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DO : Densité Optique

EAA : Equivalent Acide Ascorpique

EAG : Equivalent d'Acide Galique

EPS : Exopolysaccharides

EQ ; Equivalent Quercétine

ERO : Espèces Réactives d'Oxygène

FRAP : Ferric ion Reducing Antioxidant Power

GP_x : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathione réduit

M : Molaire ; **mM** : millimolaire

N : Normalité

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

pH : potentiel d'Hydrogène

UFC : Unité Formant Colonie

RL : Radicaux libres

rpm : rotation par minute

SOD : Superoxyde dismutase

TGI : Tractus gastro-intestinale

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

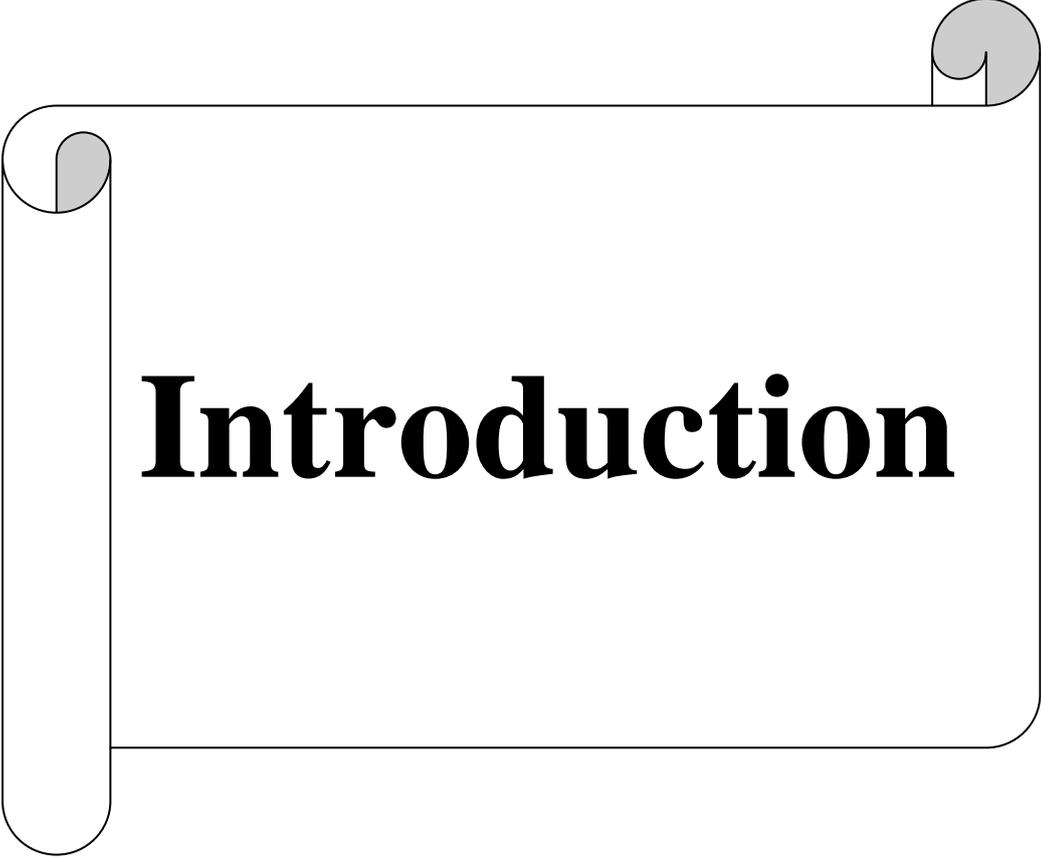
Figure	Page
Figure1. Mécanismes de réponse biliaire identifiés et caractérisés chez les lactobacilles.....	7
Figure 2. Classification des « aliments santé » et place des probiotiques	9
Figure 3. Métabolisme microbien des composés phénoliques dans le système gastro-intestinal..	16
Figure4. Modulation de l'activité antioxydante par les probiotiques.....	17
Figure 5. Classification et types d'aliments probiotiques.....	19
Figure 6. Diagramme de la préparation des jus de fraise et de persil lactofermentés.....	30
Figure 7. Schéma de la digestion bucco-gastro-intestinale <i>in vitro</i>	33
Figure 8. Taux de survie de <i>L. plantarum</i> S10 sur des milieux aux différents pH.....	36
Figure 9. Pourcentage d'hydrophobicité de <i>L. plantarum</i> S10	38
Figure10. Pourcentage de coagrégation de <i>L. plantarum</i> avec les trois souches pathogènes.....	40
Figure 11. Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité de <i>L. plantarum</i> S10.....	42
Figure 12. Capacité de <i>L. plantarum</i> S10 de son surnageant à piéger les radicaux libres de DPPH.....	43
Figure 13. Pourcentage de piégeage des radicaux hydroxyles par <i>L. plantarum</i> S10 et son surnageant.....	44
Figure 14. Teneur en polyphénols des jus de fraise et de persil et leurs extraits.	45
Figure 15. Teneur en flavonoïdes de jus de fraise et de persil et leurs extraits.....	46
Figure 16. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'extrait et le jus.....	47
Figure 17. Pouvoir réducteur de jus de fraise et de persil et leurs extraits.....	48
Figure18. Nombre des cellules viables dans le jus de fraise et de persil après 24h de fermentation.....	51
Figure 19. Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité de <i>L. plantarum</i> S10 après 24h de fermentation.....	52
Figure 20. Pourcentage de piégeage de radicaux libre de DPPH après 24h de fermentation	52
Figure 21. Pourcentage de piégeage de radical hydroxyle après 24h de fermentation.....	53
Figure 22. Effet de la digestion sur la viabilité et la survie des cellules de <i>L. plantarum</i> S10 (UFC/ml).....	54
Figure23. Taux de survie de <i>L. plantarum</i> aux différents pH après la digestion bucco-gastro-intestinale.....	55
Figure 24. Taux de survie de <i>L. plantarum</i> aux sels biliaires après la digestion bucco-gastro-intestinale.....	56

Figure 25. Pourcentage d'autoagrégation de <i>L. plantarum</i> après la digestion bucco-gastro-intestinale	57
Figure26. Pourcentage d'hydrophobicité de <i>L. plantarum</i> après la digestion bucco-gastro-intestinale.....	58
Figure27. Résistance de <i>L. plantarum</i> au peroxyde d'hydrogène après la digestion bucco-gastro-intestinale.....	59
Figure28. Pourcentage de piégeage des radicaux DPPH par <i>L. plantarum</i> après digestion bucco-gastro-intestinale.....	60
Figure29. Pourcentage de piégeage des radicaux hydroxyles par <i>L. plantarum</i> après digestion bucco-gastro-intestinale.....	61
Figure 30. Teneur en polyphénols après la digestion bucco-gastro-intestinale des extraits et de jus.....	62
Figure31. Teneur en flavonoïdes après la digestion bucco-gastro-intestinale des extrait et de jus.....	63
Figure 32. Pouvoir des extrait et de jus de piégeage des radicaux DPPH après la digestion bucco-gastro-intestinale.....	64
Figure33. Pouvoir réducteur des extraits et des jus après la digestion bucco-gastro-intestinale.....	64
Figure34. Nombre de cellules viables de <i>L. plantarum</i> combiné aux extrait et aux jus après digestion.....	65
Figure35. Survie aux bas pH de <i>L. plantarum</i> après la digestion (phase intestinale) combinée aux extraits et aux jus.....	66
Figure36. Survie en présence de 0.3% de sels biliaires de <i>L. plantarum</i> combiné aux matrices après la digestion (phase intestinale).....	68
Figure37. Capacité d'auto-agrégation de <i>L. plantarum</i> en présence de matrice végétale (Niveau intestinal).....	69
Figure38. Pourcentage d'hydrophobicité intestinale de <i>L. plantarum</i> en présence de matrice végétale (Niveau intestinal).....	70
Figure39. Capacité de <i>L. plantarum</i> à résister au peroxyde d'hydrogène en présence de matrice végétale (phase intestinale).....	71
Figure40. Piégeage de radicaux DPPH par <i>L. plantarum</i> en présence de matrice végétale lors de digestion.....	72
Figure 41. Piégeage des radicaux hydroxyles par <i>L. plantarum</i> combinée avec la matrice végétale lors de la digestion.....	73

Figure 42. Effet de la digestion <i>in vitro</i> sur la teneur en polyphénols en présence de <i>L. plantarum</i>	74
Figure 43. Effet de la digestion <i>in vitro</i> sur la teneur en flavonoïdes en présence de <i>L. plantarum</i>	75

Photo	Page
Photo1. Montage expérimental de la digestion bucco-gastro-intestinale <i>in vitro</i>	35
Photo 2 : Photomicrographie de l'auto-agrégation de <i>L. plantarum</i> S10 (G×40).....	39
Photo 3 : Photomicrographie de la co-agrégation de <i>L. plantarum</i> S10 (Gx40).....	40
Photo 4 : Photomicrographie de l'adhésion de <i>L. plantarum</i> aux cellules épithéliales (Gx100).....	41

Tableau	Page
Tableau1. Les critères de sélection des probiotiques.....	4
Tableau2. Gènes et protéines impliqués dans la réponse au stress acide.....	6
Tableau 3. Les produits probiotiques commerciaux en France.....	10
Tableau4. Polyphénols les plus courants consommés dans les aliments.....	14
Tableau5. Composition des solutions simulées de la digestion.....	31
Tableau6. Evaluation de pH et d'acidité dans le jus de fraise et de persil.....	49
Tableau 7. Les différents tests réalisés après le montage digestif.....	76



Introduction

Dès la naissance, notre tractus gastro-intestinal est colonisé par de nombreux microorganismes qui vont constituer le microbiote digestif. Cet écosystème peut être considéré comme un organe à part entier. Il contribue au bon fonctionnement intestinal grâce aux multiples activités qu'il exerce. Cependant, l'équilibre du microbiote est fragile et sa rupture peut conduire à des situations pathologiques au niveau intestinal, d'où l'idée d'administrer des microorganismes exogènes afin de moduler de façon positive le microbiote dans un sens favorable ou simplement d'utiliser leurs propriétés métaboliques, c'est le concept probiotique (**Shewale et al., 2014 ; Mureşan et al., 2017**).

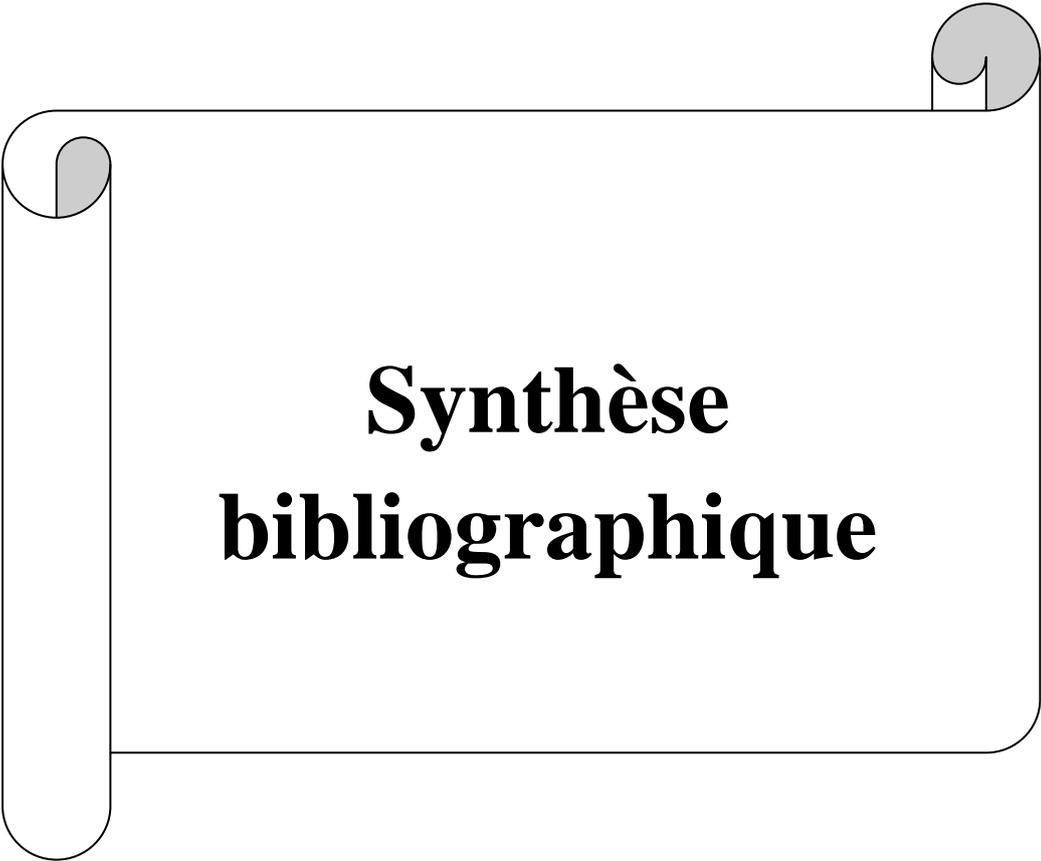
Pour que les probiotiques exercent des activités bénéfiques, une quantité suffisante de bactéries doit être vivante et fonctionnellement active sur le site d'action, c'est-à-dire doivent posséder d'une survie et diverses propriétés dans le tractus gastro-intestinal. Donc, ces micro-organismes ne doivent pas être tués par les mécanismes de défense de l'hôte et doivent être résistantes au suc gastrique puis le suc pancréatique et le mucus de l'intestin grêle (**Mureşan et al., 2017**).

Les matrices végétales, particulièrement les légumes et les fruits représentent une source importante doués de multiples vertus thérapeutiques. Ils jouent un rôle très important, principalement dans la lutte contre les cancers et les maladies cardiovasculaires ainsi que les maladies liés au stress oxydative (**Perricone et al., 2015**). En outre, l'incorporation des probiotiques avec une matrice végétale est considérée comme étant un paramètre majeur pour renforcer la viabilité et donc la fonctionnalité des souches probiotiques et de protéger ces bactéries de l'effet délétère de l'oxygène et des dérivés actifs de l'oxygène (**Patel, 2017**).

Ce travail consiste d'une part, à étudier la survie *in vitro* de *L. plantarum* S10 dans des conditions similaires à celles du tractus bucco-gastro-intestinale avec une évaluation des aptitudes probiotiques et son activité antioxydante avant et après passage à travers les trois étages digestifs, et d'autre part, à évaluer l'activité antioxydante des extraits et des jus de fraise et de persil et tester leurs effets sur la viabilité et l'activité antioxydante de la souche dans chaque compartiment digestif.

En outre, il était question d'étudier l'effet des jus de fraise et de persil fermentés sur la viabilité de la souche et l'activité antioxydante.

Ce manuscrit se compose de 3 parties dont la première est consacrée à une synthèse bibliographique sur les probiotiques (*L. plantarum*), leur survie, leur aptitude probiotique, leur activité antioxydante. En outre, un aperçu sur l'extrait et le jus de fruits et de légumes comme matrice végétale véhiculant les probiotiques. La deuxième est destinée pour présenter le matériel et les méthodes mise en œuvre pour réaliser ce travail, et la dernière partie comportera les différents résultats obtenus ainsi que leur discussion. Enfin, une conclusion générale, récapitulera les principaux axes de cette étude avec les perspectives envisagées, afin de poursuivre et d'améliorer cette thématique de recherche.



**Synthèse
bibliographique**

I.1. Historique et définition des probiotiques :

La naissance des probiotiques a été souvent liée aux travaux du scientifique et prix Nobel **Elie Metchnikoff** en 1907, lorsqu'il a remarqué que la longévité et la bonne santé des paysans Bulgares est liée à la consommation des produits laitiers fermentés. Plus tard, il a constaté que l'ingestion des bactéries lactiques influençait positivement la microflore intestinale en réduisant dans le tube digestif la population des bactéries putrifiantes ou produisant des toxines, ce qui améliorait l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie (**Gogineni et al., 2013**).

Le terme probiotique est dérivé du latin (pro) et du grec (bios) qui signifie littéralement « pour la vie ». Il a été utilisé pour la première fois par **Werner Kollath** en 1953 pour décrire de manière générique divers suppléments organiques et inorganiques censés avoir la capacité de rétablir la santé de patients souffrant de mal nutrition (**Behnsen et al., 2013**).

Dix ans après, **Lilly et Stillwell** parlaient des probiotiques comme étant des facteurs capable de stimuler la croissance d'autres microorganismes. En 1991, **Fuller** redéfinit les probiotiques comme des « compléments alimentaires microbiennes vivants affectant de manière bénéfique l'animal hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal » (**Gogineni et al., 2013**).

La définition actuelle des probiotiques a été formulée en **2002** par la **FAO** (Food and Agriculture Organisation) et l'**OMS** (Organisation Mondiale de Santé) comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, confèrent un avantage pour la santé de l'hôte ».

I.2. Critères de sélections des probiotiques :

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Les critères conventionnels qui peuvent être utilisés pour la sélection de ces souches comme étant probiotique incluent des critères fonctionnels ; sécuritaires et technologiques (**Kosin et al., 2006**). Les différents critères de sélection sont groupés dans le **tableau 1**.

Tableau 1. Les critères de sélection des probiotiques (Markowiak *et al.*., 2017)

Critères	Propriétés requises
Sécuritaires	<ul style="list-style-type: none"> • D'origine humaine ou animale. • Isolé du tractus gastro-intestinal d'individus en bonne santé. • Historique d'utilisation en toute sécurité. • Identification diagnostique précise (traits de phénotype et de génotype). • Absence de la capacité de couper les sels des acides biliaires. • Aucun effet indésirable. • Absence de gènes responsables de la résistance aux antibiotiques localisés dans des éléments non stables.
Fonctionnelles	<ul style="list-style-type: none"> • Compétitivité vis-à-vis du microbiote habitant l'écosystème intestinal. • Capacité à survivre et à maintenir l'activité métabolique et à se développer sur le site cible. • Résistance aux sels biliaires et aux enzymes. • Résistance au faible pH dans l'estomac. • Compétitivité vis-à-vis des espèces microbiennes habitant l'écosystème intestinal (y compris les espèces étroitement apparentées). • Activité antagoniste vis-à-vis des agents pathogènes (par exemple, <i>H. pylori</i>, <i>Salmonella</i> sp., <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Clostridium difficile</i>). • Résistance aux bactériocines et aux acides produits par le microbiote intestinal endogène. • Adhésion et capacité à coloniser certains sites particuliers au sein de l'organisme hôte, avec un taux de survie dans le système gastro-intestinal.
Technologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Production facile de quantités élevées de biomasse et productivité élevée des cultures. • Viabilité et stabilité des propriétés souhaitées des bactéries probiotiques pendant le processus de préparation (congélation, lyophilisation), et de distribution de produits probiotiques. • Taux de survie élevé lors du stockage dans les produits finis (en conditions aérobies et micro-aérophiles). • Garantie des propriétés sensorielles souhaitées des produits finis (dans le cas de l'industrie alimentaire). • Stabilité génétique. • Résistance aux bactériophages.

I.2.1. Viabilité des probiotiques dans le tube digestif :

Afin de satisfaire à la définition des probiotiques, les microorganismes doivent posséder divers propriétés de survie dans le tractus gastro-intestinal (TGI), et ne doivent pas être tués par les mécanismes de défense de l'hôte. Les microorganismes doivent être résistants aux enzymes de la cavité buccale (amylase, lysozyme), aux enzymes (pepsine, lipase) et au pH bas (concentration élevé de HCl) dans l'estomac et la concentration de la bile et le suc pancréatique et le mucus dans l'intestin grêle (**Havenaar et al., 1992**). Les probiotiques doivent également avoir une activité à persister dans le tractus digestif qui leurs permettent d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte (**Mureşan et al., 2017**).

I.2.1.1. Résistance aux conditions gastriques :

Le pH de l'estomac est généralement compris entre 1 et 2.5 et le temps de vidange gastrique est d'environ 2 heures. Au niveau de cet étage intestinal, les microorganismes ne peuvent survivre 2heures en raison de perturbation des activités métaboliques et cytoplasmiques. Donc, tous les microorganismes probiotiques doivent avoir une tolérance élevée à l'acidité du suc gastrique. Des études ont démontré que cette résistance était augmentée par l'ingestion des aliments en même temps que celle du probiotique (**Kim et al., 2016**). Il a été constaté que certaines souches sont rapidement tuées dans l'estomac tandis que d'autres tels que les souches de bifidobactéries et les lactobacilles peuvent passer à travers l'intestin entier à très forte concentration (**Shewale et al., 2014 ; Markowiak et al., 2017**). A titre d'exemple, les niveaux de résistance des différentes souches de *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) au suc gastrique stimulé par une solution contenant 0.3% de pepsine et 0.5% de NaCl à pH 2 et pH 3 ont été évalués et les résultats ont montré une viabilité de 58 à 79% après trois heures d'exposition à un pH 3 (**Karasur et al., 2010**).

Les bactéries s'adaptent à des pH inhabituellement bas par un mécanisme inductible appelés Acid Tolerance Reponse (ATR). L'ATR met en jeu la transcription de certains gènes, avec synthèse d'enzymes et de protéines protectrices pour les microorganismes (**tableau 2**) (**Sanchez et al., 2007**). Cela permettra par exemple d'éliminer les protons de son cytoplasme grâce à des pompes à ATP spécifiques ou de produire des ions ammoniac qui tamponnent le milieu cellulaire et y maintiennent un pH alcalin (**Cotter et Hill, 2003**).

Tableau 2.Gènes et protéines impliqués dans la réponse au stress acide (Sanchez *et al.*, 2007)

Fonction putative (nom)	Activité
H ⁺ -ATP _{ase} , sous unité alpha (AtpA,atpA)	+ Régulation du pH intracellulaire
H ⁺ -ATP _{ase} , sous unité beta (AtpD,atpD)	+ Régulation du pH intracellulaire
Methioninesynthase (MetE)	+* ND
BSH(Bile Salt Hydrolase)	-* Diminution de l'activité BSH
Glutamine synthase 1(GlnA1)	+ Augmentation de la synthèse d'ammoniac
Protéine chaperone(DanJ)	- ND
+ : induction ; - : répression ; * : implication dans l'adaptation au stress ; ND : non déterminé	

I.2.1.2. Résistance aux conditions intestinales :

La bile est une solution aqueuse jaune verte dont les composants principaux les acides biliaires, le cholestérol, les phospholipides et les pigments biliverdines. Elle est synthétisée dans les hépatocytes péricentraux de foie, stockée et concentrée dans la vésicule biliaire de manière inter-digestive, et libérée dans le duodénum après la prise alimentaire (Begley *et al.*, 2006).

La bile agit comme un détergent biologique émulsifiant et solubilisant les lipides, jouant un rôle essentiel dans la digestion des graisses .Cette propriété détergente de la bile confère également une activité antimicrobienne puissante, principalement par la modification de la conformation des protéines de la membrane bactérienne, ainsi une perturbation de la perméabilité, ce qui génère une dissolution des membranes cellulaires (Begley *et al.*, 2006 ; Li, 2012).Plusieurs bactéries probiotiques d'origine intestinale comme les bifidobactéries ont développé des mécanismes pour résister à l'action détergente des sels biliaires :

Une activité enzymatique qui est la déconjugaison des sels biliaires grâce à la « Bile Salt Hydrolase » (BSH EC 3.5.1.24) qui est aussi appelée Cholyglycine hydrolase. Cette enzyme catalyse l'hydrolase des sels biliaires conjugués avec la glycine ou la taurine en résidus d'acides aminés en sels biliaires libres (**figure1**). La plupart des bactéries probiotiques proposées comme produits de santé naturels peuvent posséder cette activité puisqu'elle maximisait les chances de survie, dans le tractus gastro-intestinal (Begley *et al.*, 2006).

Un autre mécanisme, c'est l'extrusion active des acides biliaires et les sels qui s'accumulent dans le cytoplasme par l'intermédiaire de pompes d'efflux, un mode d'action commun bactérien contre la toxicité de la bile. Ce mécanisme est réalisé grâce aux systèmes multidrug résistance (MDR) (Lubelski *et al.*, 2007 ; Ruiz *et al.*, 2013).

En outre, des études ont montrés que la production des couches externes d'exopolysaccharides (EPS) est l'une des mécanismes de protection contre la bile chez les Bifidobactries .Néanmoins, l'effet de la bile sur la production d'EPS en lactobacilles n'est pas aussi claire (**Ruiz et al., 2013**).

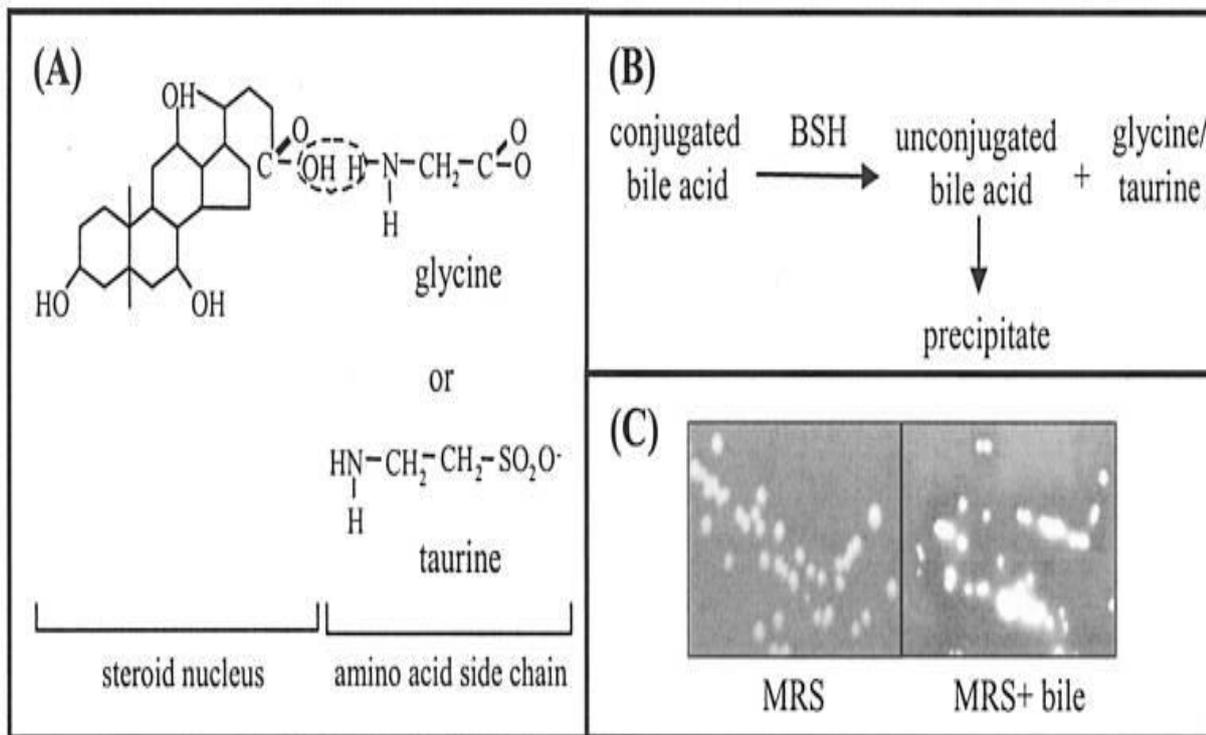


Figure 1. Mécanismes de réponse biliaire identifiés et caractérisés chez les lactobacilles (**Begley et al., 2006**).

(A) Structure chimique des acides biliariques. Les acides biliariques primaires sont synthétisés dans le foie à partir de cholestérol et sont conjugués à la glycine ou à la taurine avant la sécrétion. Le groupe carboxyle de l'acide biliaire et le groupe amino de l'acide aminé sont liés par une liaison amide. (B) Réaction catalysée par les enzymes BSH. Les BSH coupent la liaison peptidique des acides biliariques, ce qui entraîne l'élimination du groupe des acides aminés du noyau stéroïde. Les acides biliariques non conjugués résultants précipitent à pH bas. (C) Détection de l'activité de BSH.

L. plantarum, qui a été cultivé toute la nuit dans du bouillon MRS, a été ensemencé sur de la gélose MRS (Difco) (A) ou MRS additionnée de 0,2% (poids / volume) d'acide glycodésoxycholique (dérivé de la bile) et incubé en anaérobie pendant 48 heures. h. Le blanc précipité autour des colonies et la clarification du milieu indiquent l'activité de la BSH

I.2.1.3. Adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin :

La capacité des souches à adhérer à la muqueuse gastro-intestinale est un des principaux critères de sélection des bactéries probiotiques. Cette propriété contribue à l'augmentation de la persistance et donc de la colonisation des probiotiques de l'intestin de l'hôte au moins de façon transitoire ; ce qui permet d'exercer des effets bénéfiques (**Nantavisai et al., 2018 ; Gharbi et al., 2019**).

En raison de la difficulté d'étudier l'adhésion des probiotiques aux cellules épithéliales de l'hôte *in vivo* (Bengoa *et al.*, 2018), puisque cela nécessite des biopsies de l'intestin ou des modèles de marquage des souches probiotiques (Nantavisai *et al.*, 2018), plusieurs modèles *in vitro* ont été développés pour évaluer cette propriété en se basant sur des lignes cellulaires isolés d'adénocarcinomes du colon humain principalement les HT-29 et les Caco-2 (Bengoa *et al.*, 2018), ces dernières se différencient spontanément dans des conditions de culture standards en exprimant les mêmes caractéristiques des entérocytes matures, y compris la polarisation, les bordures en brosse fonctionnelles et les hydrolases intestinales apicales (Nantavisai *et al.*, 2018).

Les mécanismes d'adhésion des souches probiotiques impliquent plusieurs protéines de leurs structures de surfaces pouvant agir en tant qu'adhésines telles que les polysaccharides, les lipoteichoïques et les glycoprotéines de la couche S (S layer). Plusieurs études ont montré que la perte de protéines de la couche S de surface bactérienne causé par un traitement chimique diminue l'adhésion à différentes cellules cibles (Wang *et al.*, 2017). Une autre étude a montré qu'une adhésine spécifique de mannose (Msa), susceptible de favoriser la liaison aux récepteurs contenant du mannose situés sur les cellules épithéliales de l'hôte, a été identifiée chez *L. plantarum* WCFS1. En outre, une protéine de liaison à la fibronectine, nommée alfa-énolase1 (EnoA1) a été identifiée et caractérisée fonctionnellement chez *L. plantarum* LM3 (Bove *et al.*, 2013).

D'autres protéines de surface ont été décrites impliquant l'adhésion des *Lactobacillus* au mucus intestinal qui sont des glycoprotéines appelées « la mucine » (Bengoa *et al.*, 2018). L'exemple le plus étudié des adhésines bactériennes ciblant le mucus est une protéine produite par *L. reuteri* (mucus-binding protein) (Bove *et al.*, 2013).

Par ailleurs l'auto-agrégation et l'hydrophobicité jouent un rôle majeur dans le mécanisme d'adhésion des souches probiotiques. Il a été montré que les souches de *L. plantarum* présentaient des niveaux d'auto-agrégation moyens à élevés de 31% à 95% (Ouwehand *et al.*, 1999).

I.3. Probiotiques commercialisés :

En Europe, les conditions de mise sur le marché des probiotiques sont définies en fonction de leur application : médicamenteuse, alimentaire (Ninane *et al.*, 2009). Les probiotiques sont des aliments fonctionnels ou sont utilisés comme des compléments alimentaires sous forme lyophilisé. Ces « aliments de santé » se situent à la frontière entre les médicaments et les aliments traditionnels; ils sont adaptés par la législation alimentaire (figure 2) (Alegre, 2009).

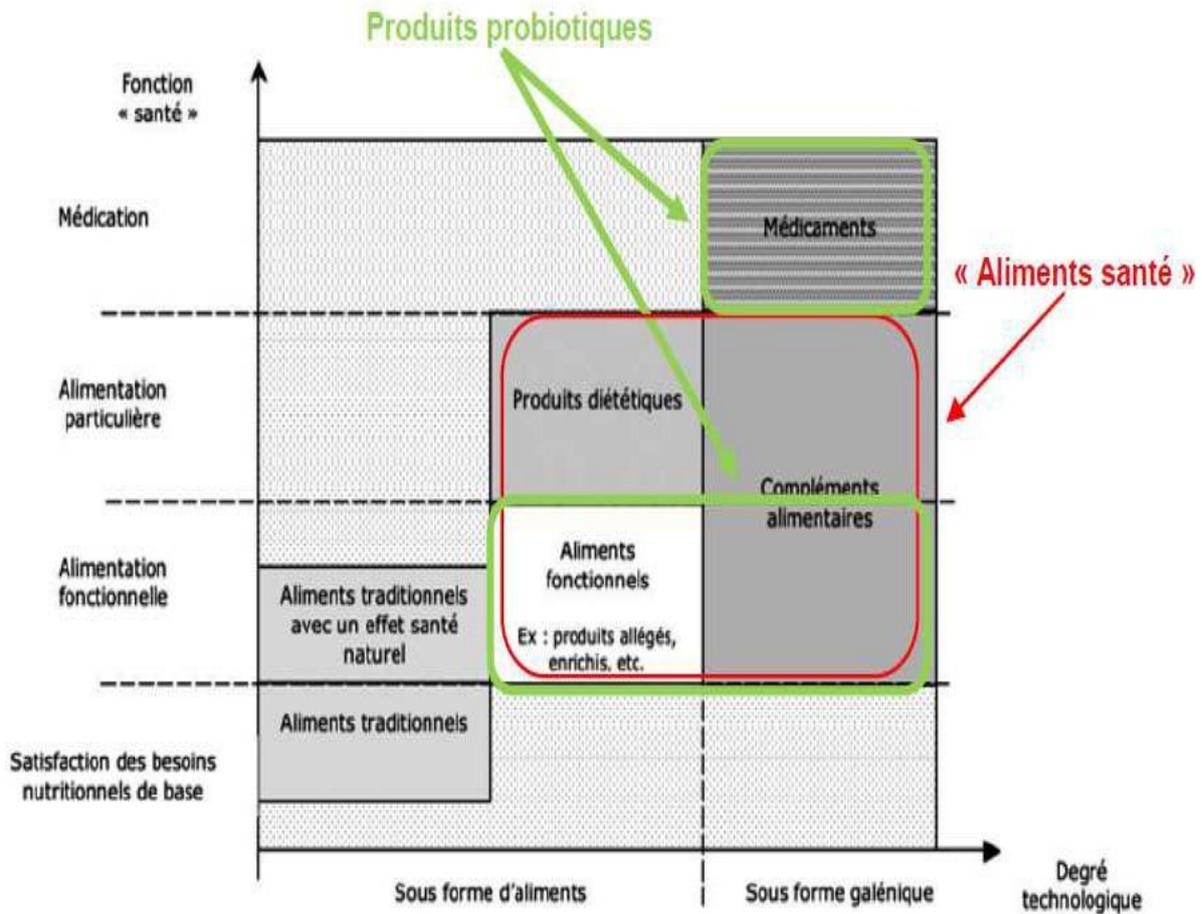


Figure 2. Classification des « aliments santé » et place des probiotiques (Boudouhi *et al.*, 2005).

La compréhension du rôle des aliments a été changée, passant du rôle source d'énergie et de composants de renforcement du corps au rôle d'aliments actifs sur la santé humaine (Soccol *et al.*, 2010). Une nouvelle catégorie d'aliments connue sous le nom d'aliments fonctionnels destinés à être consommés dans le cadre d'une alimentation équilibrée et variée a une particularité qui réside dans le fait qu'elle contient des composés biologiquement actifs exerçant un effet bénéfique au-delà des effets nutritionnels de base de manière à améliorer la santé et/ou à réduire le risque de maladies chroniques (AL-Nabulsi *et al.*, 2014).

Le tableau 3 montre certains produits commerciaux contenant des souches probiotiques vendues en France et les indications pour lesquelles ils sont conseillés.

Tableau 3. Les produits probiotiques commerciaux en France (Alegre, 2009).

Produit	Souche	Effet revendiqué
Activia® (Danone)	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN-173 010	Aide à réguler le transit
Actimel® (Danone)	<i>L.casei</i> DN-144 001	Renforce les défenses naturelles de l'organisme
Yakult	<i>L.casei</i> Schirota	Régule le transit et renforce les défenses naturelles
BION®3 (Merck)	<i>L.gasseri</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B.longum</i> + Vitamines + minéraux	Renforce les défenses naturelles de l'organisme
BION® Transit (Merck)	<i>L.plantarum</i> 299V	Evite l'inconfort intestinal et les ballonnements
BION® Voyage (Merck)	Probio-Tec® Quatro : <i>L.acidophilus</i> LA-5 <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12 <i>Streptococcus thermophilus</i> STY-31 <i>L.delbrueckii</i> LBY-27	Réduit la diarrhée du voyageur
BION® Flore intime (Merck)	<i>L.rhamnosus</i> GR-1 <i>L.reuteri</i> RC14	Restaure et protège l'équilibre de votre flore vaginale
VSL#3®	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L.casei</i>	Traite le syndrome de l'intestin irritable, la colite ulcéreuse et de la pouchite
Lacteol® (Axcan Pharma)	<i>L.acidophilus</i>	Evite la diarrhée
Ultra-Levure® (Biocodex)	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Evite la diarrhée
Gefilus® (Valio)	<i>L.rhamnosus</i> GG	Renforce les défenses naturelles de l'organisme, multiples effets sur la santé

I.4. Généralités sur *Lactobacillus plantarum* :

L'espèce *L. plantarum* est une bactérie lactique non pathogène, bâtonnet, aéro-anaérobie facultative, non sporulée, mésophile, capable de cultiver à des températures comprises entre 15°C et 45°C (Al-Tawaha et Meng, 2018).

L. plantarum est une espèce polyvalente, capable de coloniser une large gamme de niches écologiques notamment la cavité buccale, le tractus gastro-intestinal et les cavités vaginales. Cette bactérie est largement utilisée dans la fermentation des produits laitiers, viandes et des produits végétaux, ainsi que dans les formulations probiotiques (De Montijo-Prieto *et al.*, 2019).

L. plantarum se caractérise par un métabolisme hétéro-fermentaire facultatif, donc elle appartient au groupe B « *Streptobacterium* » des lactobacilles (Al-Tawaha et Meng, 2018), elle fermente les hexoses en acide lactique, mais également capable de fermenter les pentoses et/ou le gluconate (Isa et Razavi, 2017).

L. plantarum produit des protéines extracellulaires, des exopolysaccharides, des bactériocines et des acides lipotechoïques qui influencent la santé et la physiologie de l'hôte en interagissant avec les cellules épithéliales et renforcer le système immunitaire (Arasu *et al.*, 2016).

Cette espèce diffère de beaucoup d'autres espèces du même genre par :

- ✓ *L. plantarum* possède un génome relativement grand par rapport à beaucoup d'autres *Lactobacillus.spp*. Son génome est constitué d'un chromosome circulaire de 3.3 Mo (Seddik *et al.*, 2017), avec un pourcentage G+C d'environ 44.5% (De Montijo-Prieto *et al.*, 2019) ;
- ✓ Elle peut fermenter de nombreux glucides selon la source de carbone, ces bactéries peuvent établir le métabolisme par une hétérofermentation ou homofermentation (Al-Tawaha et Meng, 2018) ;
- ✓ A un besoin élevé pour le manganèse et peut l'accumuler à forte concentration. Ce dernier protège *L. plantarum* contre la toxicité de l'oxygène en réduisant les radicaux libres de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Al-Tawaha et Meng, 2018);
- ✓ Certaines souches peuvent posséder une activité tannase et donc, capable de métaboliser les acides phénoliques (Al-Tawaha et Meng, 2018) ;
- ✓ Présente une tolérance élevée aux bas pH. C'est le fait qu'elle prédomine spontanément dans les produits fermentés et également survivre au passage gastro-intestinal (Al-Tawaha et Meng, 2018).

I.4.1. Potentiel probiotiques de *Lactobacillus plantarum*:

L. plantarum a de bonnes propriétés probiotiques ; elle peut tolérer l'environnement simulé du tube digestif, par la synthèse des métabolites antimicrobiens qui ont des effets inhibiteurs sur la croissance des bactéries pathogènes à Gram positive et à Gram négative (Cao *et al.*, 2019). Parmi ces métabolites antimicrobiens, nous citons ce qui suit (Dinev *et al.*, 2018 ; De Montijo-Prieto *et al.*, 2019) :

- ✓ Les bactériocines appelées «plantracines » appartenant à des bactériocines de classe II (bactériocines à deux peptides), qui ont une activité bactéricide ;
- ✓ Les acides organiques, tels que l'acide lactique ; l'acide acétique et l'acide propionique. Ces derniers abaissent le pH local et inhibent donc la croissance des bactéries sensibles aux conditions acides ;
- ✓ Le peroxyde d'hydrogène qui est produit en présence d'oxygène, sous l'effet de la flavoprotéine oxydase ou de la NADH peroxydase ; son activité antimicrobienne pourrait résulter de l'oxydation de groupes sulfhydryles, entraînant la dénaturation d'un certains nombres d'enzymes et de la peroxydation des lipides membranaires, permettant ainsi l'augmentation de la perméabilité membranaire;
- ✓ Le dioxyde de carbone produit par *L. plantarum* peut jouer un rôle dans la création d'un environnement anaérobie qui inhibe les décarboxylations enzymatiques. L'accumulation de CO₂ dans la bicouche lipidique de la membrane est une cause possible de la dysfonction de la perméabilité.

L. plantarum a une tolérance élevée à un bas pH démontrant sa résistance élevée aux conditions acides ; elle survit également dans les conditions acides de l'estomac humain (Khemariya *et al.*, 2016). L'un des plus importants composés bioactifs produits par *L. plantarum* est les EPS, qui lui fournissent une résistance dans des conditions extrêmes d'acidité et de bile (Al-Tawaha et Meng, 2018).

L. plantarum a également une bonne adhésion à la muqueuse intestinale ; des études ont montré que les EPS permettent d'interagir de manière dynamique sur des périodes prolongées avec la muqueuse intestinale ; ce qui lui permettra d'entrer en compétition avec les bactéries pathogènes à Gram positive et à Gram négative pour l'occupation des sites, et ainsi pour les nutriments (Al-Tawaha et Meng, 2018).

II .1. Le stress oxydatif et l'activité antioxydante :

À l'exception des organismes anaérobies, l'oxygène est une molécule essentielle pour le métabolisme aérobie afin de produire des molécules à haut potentiel énergétique. En effet, entre 1 à 2% du taux d'O₂ utilisé sur la chaîne respiratoire mitochondriale est transformé en espèces réactives de l'oxygène (ERO) particulièrement réactionnelles (**Prutz et al., 2001 ; Wang et al., 2017**). Cependant, lorsque ces derniers sont générés en excès les biomolécules en particuliers les protéines, les lipides et les acides nucléiques peuvent être endommagés par le processus de stress oxydatif (**Li et al., 2012**), qui peut se définir comme une condition dans laquelle la balance prooxydante-antioxydante dans la cellule est perturbée (**Wang et al., 2017**).

La plupart des organismes vivants possèdent des systèmes de défenses et de réparation antioxydantes enzymatiques tels que le superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPx), glutathion réductase (GR), Catalase (CAT), et des défenses antioxydantes non enzymatique tels que, les oligoéléments (cuivre, zinc, manganèse, fer ; etc.), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), mélatonine, le glutathion, les caroténoïdes et les flavonoïdes présents dans les cellules (**Spyropoulos et al., 2011; Mishra et al., 2015**).

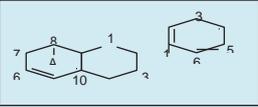
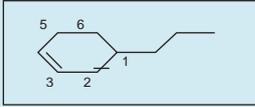
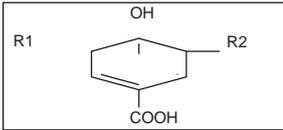
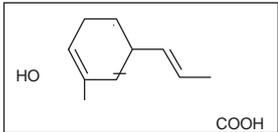
Les antioxydants sont des molécules qui interagissent avec les radicaux libres générés et terminent la réaction en chaîne avant que des dommages ne soient causés aux molécules vitales (**Mishra et al., 2015**). Ils se trouvent dans un grand nombre d'aliments mais, les végétaux sont les produits les plus riches par ces molécules, on peut citer, l'ail, la tomate, le persil, la carotte, le chou frisé, le chou-fleur, la betterave rouge, la mure, le myrtille, la pomme, la fraise, les raisins rouges et les agrumes sont mentionnés comme les sources les plus riches en antioxydants (**Grajek et al., 2005**).

II.2. Les polyphénols de la fraise et du persil comme antioxydants:

La majorité des antioxydants de fruits et légumes sont représentés par les polyphénols, qui sont définis comme un groupe complexe et très varié de substances naturelles d'origine végétale, qui résultent des métabolites secondaires des plantes, ces composés englobent une gamme considérable de substances possédant un cycle aromatique un ou plusieurs substituant hydroxyles (**Marin et al., 2015 ; Adriouche et al., 2017**).

Les polyphénols peuvent être divisés en de nombreuses classes en fonction du nombre et la présence d'anneaux phénoliques (**Pathak et al., 2018**). La plupart des principales classes de polyphénols végétaux sont illustrés dans le **tableau 4**.

Tableau4. Polyphénols les plus couramment utilisés dans les aliments (Pathak *et al.*, 2018)

Polyphénols			
Flavonoïdes	Acides phénoliques	Lignanes	Stilbènes
			
Flavonols	Acide	Secoisolariciresinol	Resvératrol
Kaempferol Quercétine	hydroxybenzoïque	Matairesinol	
Myricétine		Lariciresinol	
Flavones		Pinoresinol	
Apigénine			
Lutéoline	Acide gallique		
Flavanones	Acide		
Naringenin	hydroxycinnamique		
Hespérétine			
Isoflavones			
Diadzein	Acide coumarique		
Génistéine	Acide caféique		
Anthocyanidins	Acide férulique		
Cyanidine			
Pélagonidine			
Delphinidine			
Flavanols			
(+) - Catéchine			
(-) – Epicatechin			

La fraise (*Fragaria × ananassa* Duch) est une source pertinente de composés bioactifs en raison de sa teneur élevée en vitamine C, vitamine A et E, folate, caroténoïdes ainsi que, des composés phénoliques (Basu *et al.*, 2014). En général, les fraises sont riches en flavonoïdes, notamment, par les anthocyanines, responsables de la couleur rouge, et en flavonols tels que la fisétine, la quercétine et les glucosides et glucuronides de kaempférol (Henning *et al.*, 2010). Les fraises contiennent également divers acides phénoliques principalement, l'acide gallique qui se trouve soit sous forme libre soit sous forme d'ellagitannins (Giampieri *et al.*, 2012).

Autre que la fraise, le persil (*Petroselinum crispum*) est considéré comme un autre antioxydant puissant grâce à sa teneur élevée en flavonoïdes comme la quercétine, l'apigénine et la lutéoline (Al-Seeni *et al.*, 2018) ainsi que sa richesse en vitamines tels que la vitamine C, vitamine E, vitamine A et vitamine K (Farah *et al.*, 2015). Les résultats de nombreuses recherches ont mis en évidence que les composés bioactifs contenus dans les extraits de persil présentaient une activité de piégeage des radicaux libres (Dadan *et al.*, 2018) et augmentaient significativement les activités des enzymes antioxydants (Al-Seeni *et al.*, 2018).

II .3. Propriété antioxyante des polyphénols et effet santé :

Les polyphénols jouent un rôle important comme système de défense contre les radicaux libres (RL). Plusieurs études ont montré leur fonction antioxydant dans la prévention des dommages cellulaires et extracellulaires liés au stress oxydatif (Kawabata *et al.*, 2019). Leurs activités antioxydants se produit par plusieurs mécanismes :

- ✓ Piégeage des RL et chélation des métaux grâce à leur structure chimique afin de former des chélates avec les ions métalliques anioniques comme le fer ou le cuivre en remplaçant un ou deux protons du polyphénol par l'ion métallique (Kaur *et al.*, 2008) ;
- ✓ Absorption des rayons ultra-violets (UV) : la naringénine et la rutine ont un effet protecteur contre les UV, en empêchant ainsi la surproduction des RL (Tripoli *et al.*, 2007) ;
- ✓ Activation de gènes antioxydants tels que Nrf 2, qui génèrent une expression accrue d'enzymes antioxydantes telles que la GPx, SOD et la CAT (Erlank *et al.*, 2011) ;
- ✓ Inhibition de la lipopéoxydation : nombreuses études ont montré l'existence d'une relation importante entre les flavonoïdes et la diminution de l'oxydation de taux des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins ou LDL) dans le sang et donc, pourraient jouer un rôle dans la prévention de l'athérosclérose ainsi que les maladies cardiovasculaires (Kaur *et al.*, 2008).

En plus de la capacité antioxydante, ces métabolites possèdent des propriétés sur l'organisme humain, notamment comme anti-inflammatoires, antimicrobiens, antihypertenseurs et anticancéreux (Marin *et al.*, 2015) .

II.4. Interaction entre les bactéries et les polyphénols :

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

II.4.1. Métabolisme des polyphénols par la microflore intestinale :

Les polyphénols alimentaires subissent un métabolisme complexe après l'ingestion et interagissent avec les enzymes humaines et microbiennes impliquant soit une déconjugaison, déhydroxylation, dépolymérisation, déglycosylation, déméthylation, ce qui conduit à la production d'un grand nombre de métabolites de polyphénols et de produits cataboliques circulants et excrétés (**Hervert-Hernandez et Goñi, 2011**). Les étapes principales de dégradation des polyphénols dans le TGI sont illustrées dans la **figure 3**.

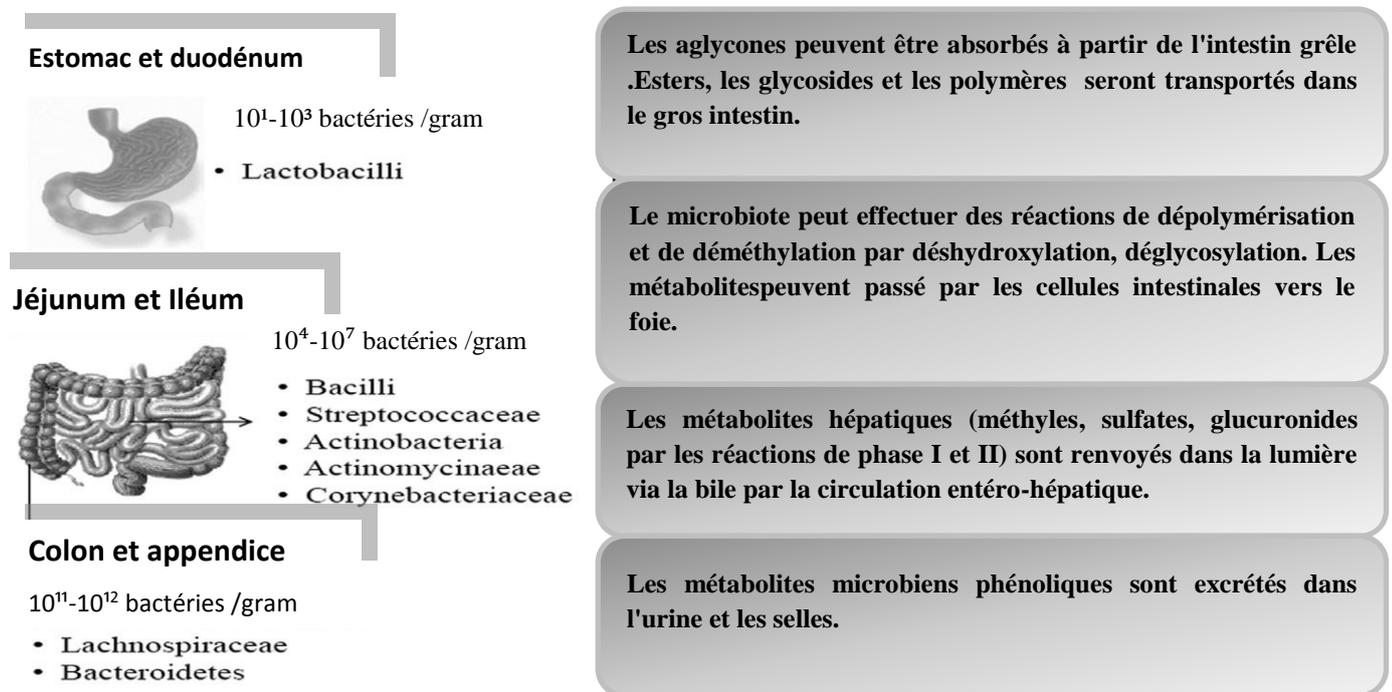


Figure 3. Métabolisme microbien des composés phénoliques dans le système gastro-intestinal.

(**Pathak et al., 2018**).

II.4.2. Modulation de microbiote intestinale

Les polyphénols et leurs métabolites peuvent influencer et induire une modulation de la composition du microbiote intestinal. A cet égard, les polyphénols peuvent exercer un effet doublement positif d'une part en inhibant les bactéries pathogènes, d'autre part, certains auteurs suggèrent que les polyphénols peuvent agir en tant que prébiotiques et donc, stimulant les bactéries bénéfiques plus particulièrement les lactobacilles (**Hervert-Hernandez et Goñi, 2011**). Des études ont démontré que la catéchine inhibe significativement la croissance de *Clostridium histolyticum*, alors qu'elle stimule de manière significative la croissance de *Clostridium coccoides*, *Eubacterium rectale*, tandis que la croissance de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus.spp* est relativement non affectée (**Pathak et al., 2018**).

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

II .5. Activité antioxydante des probiotiques :

Au cours des dix dernières années, l'activité antioxydante des souches probiotiques et des produits apparentés a été fréquemment signalée (Zhao *et al.*, 2017). Des différentes souches de bactéries probiotiques pouvaient exercer leur capacité antioxydante de différentes manières (figure 4) (Tang *et al.*, 2016).

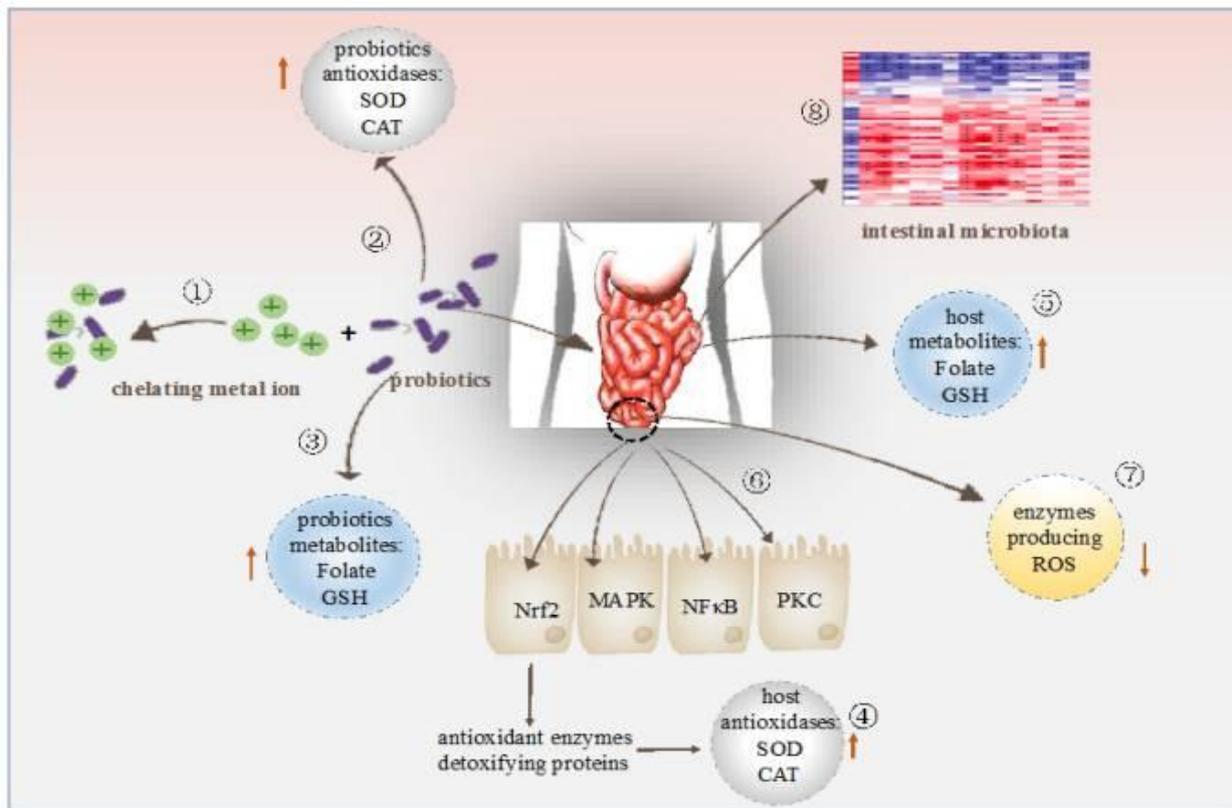


Figure 4. Modulation de l'activité antioxydante par les probiotiques (Wang *et al.*, 2017)

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

Selon Wang *et al.* (2017), les principaux mécanismes de résistance des probiotiques aux ERO sont:

- **La capacité de chélation des ions métalliques :** Des chélateurs, tels que l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), l'acide batho-phénanthroline disulfonique (BPS), la pénicillamine et la desferrioxamine, ont été rapportés pour capturer les ions métalliques principalement les ions ferriques et cuivriques et donc, d'empêcher de catalyser l'oxydation. La capacité antioxydante de *L.casei* KCTC 3260 réside dans le fait qu'elle chélate fortement les ions Fe^{+2} ou Cu^{+2} , bien qu'aucune activité SOD détectable n'ait été observée.
- **Système d'enzymes antioxydants :** les probiotiques ont également leurs propres systèmes enzymatiques antioxydants notamment les inhibiteurs enzymatiques et non enzymatiques ;qui sont responsables de la lutte contre le stress des ERO .Les niveaux d'antioxydants enzymatiques en particuliers le superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la décomposition du superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en eau et constitue donc un régulateur central des niveaux des ERO.

La Catalase (CAT) qui peut décomposer le peroxyde d'hydrogène, empêchant ainsi la génération de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton, ainsi que le glutathion peroxydase (GSH-PX).Ces derniers jouant un rôle essentiel dans la gestion du stress oxydant.

- **Métabolites antioxydants :** les probiotiques peuvent produire divers métabolites ayant une activité antioxydante, tels que le glutathion (GSH), le folate et le butyrate. Une étude a démontré que la souche MIYAIRI 588 de *Clostridium butyricum* induit des antioxydases chez les rats atteints de stéatose hépatique non alcoolique, afin de supprimer le stress oxydatif hépatique (Endo *et al.*, 2013).
- **Régulation du microbiote intestinal :** les probiotiques sont des habitants réguliers du tractus gastro-intestinal des humains et des animaux ; ils peuvent réguler la composition du microbiote intestinal et inhiber la prolifération excessive de bactéries nocives, ce qui peut contribuer à diminuer le stress oxydatif. *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, les espèces probiotiques les plus courantes, produisant de l'acide lactique, de l'acide acétique et de l'acide propionique, peuvent abaisser le pH intestinal et inhiber la croissance de diverses bactéries pathogènes afin de maintenir l'équilibre de la flore intestinale.

II.6. Les aliments transmetteurs et protecteurs des probiotiques :

Les matrices alimentaires, dont les aliments à base de viande (saucisses fermentés), les produits à base de céréales, les jus de légumes et de fruits, produits à base de soja, poisson fermenté, crème glacé, fromage, yaourt sont les principales matrices qui véhiculent les probiotiques au corps humain. Ainsi, ils fournissent une protection pour le microbe livré aux cours de leur passage dans le TGI (**Bove et al., 2013 ; Perricone et al., 2015**). Ces aliments sont souvent enrichis en prébiotiques, qui sont définis comme des « constituants non digestibles par l’hôte, et qui favorisent de manière sélective la croissance microbienne » (**Anadón et al., 2016**). Il existe des preuves que les matrices alimentaires contenant des polysaccharides peuvent protéger efficacement les bactéries probiotiques aux conditions GI (**Bove et al., 2013**). La classification des aliments probiotiques est illustré dans la **figure 5**.

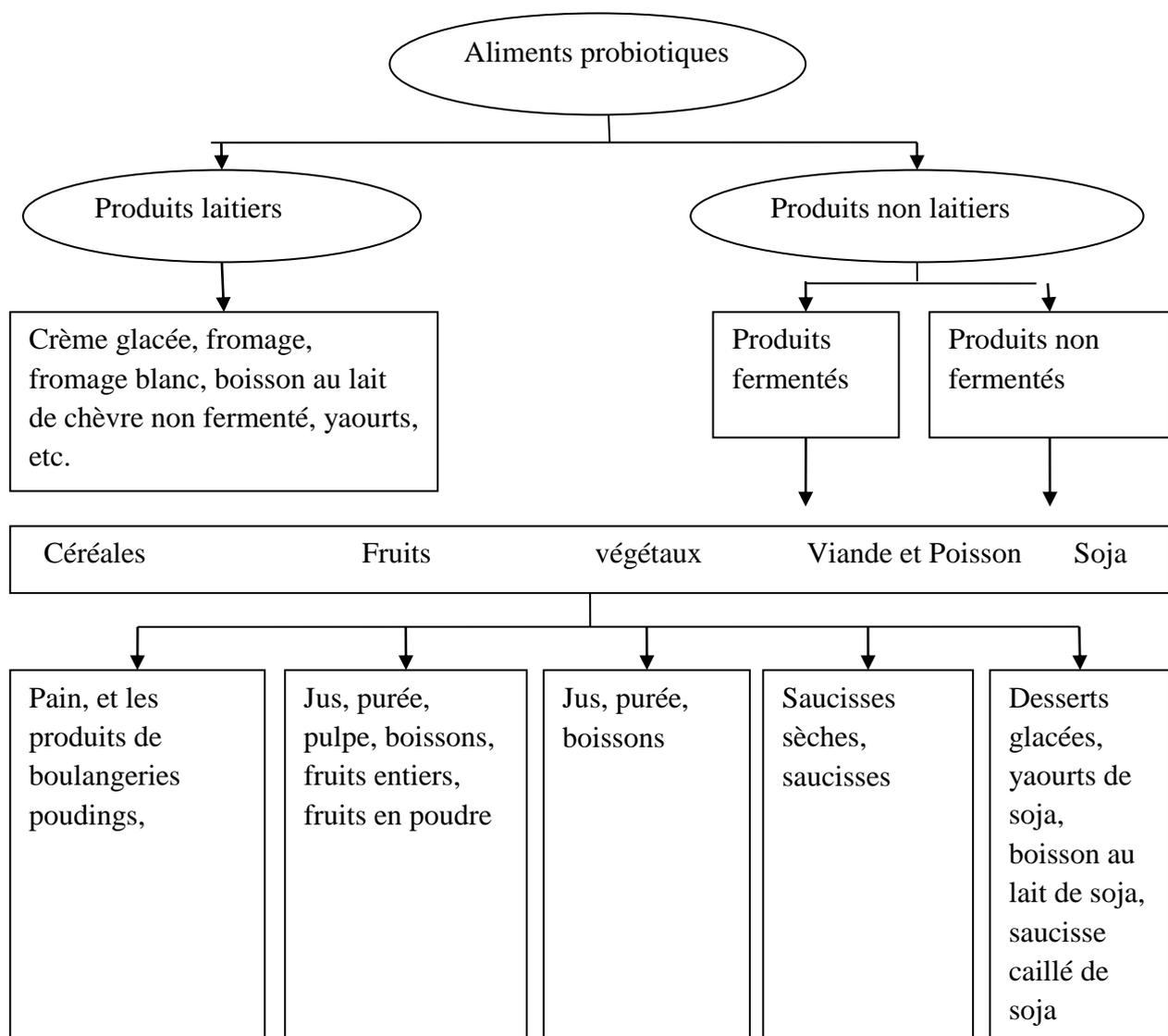
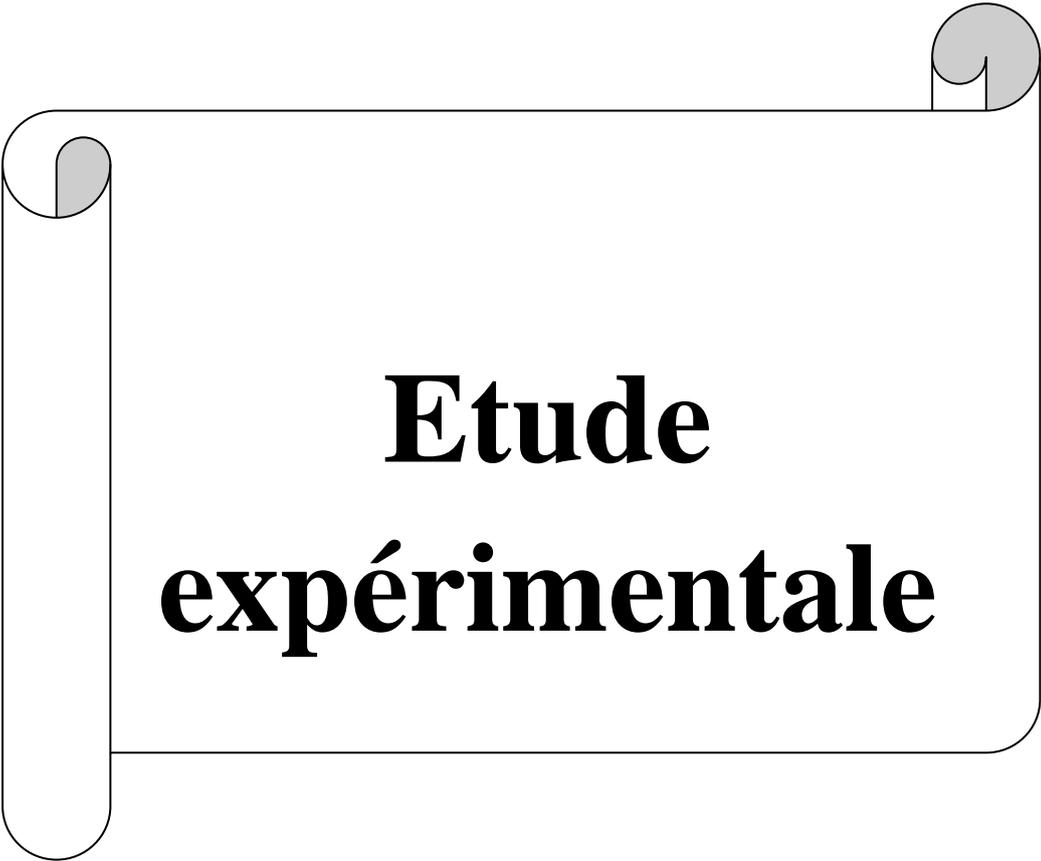


Figure 5. Classification et types d'aliments probiotiques (**Kumar et al., 2015**).

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

Les produits laitiers tels que le lait fermenté et le yaourt sont souvent reconnus comme des meilleurs vecteurs alimentaires pour les probiotiques. Cependant, les problèmes de santé croissants liés à l'intolérance au lactose, à l'allergie aux protéines du lait, à une teneur élevée en cholestérol sont des inconvénients liés à leur consommation (**Karassu et al., 2010 ; Kumar et al., 2015**). Donc, pour s'affranchir à ces limites, les aliments non laitiers tels que les légumes et les fruits sont des substrats idéaux pour les probiotiques en raison de la présence de minéraux, de vitamines, de sucres, d'antioxydants ainsi que des fibres alimentaires, ce qui favorise la croissance et l'activité des probiotiques (**Soccol et al., 2010**). En outre, le jus de légumes et/ou de fruits restent très peu de temps dans l'estomac et donc, les probiotiques passent moins de temps dans l'environnement acide, ce qui maximise les chances de viabilité de ces derniers (**Kumar et al., 2015**).

Les produits probiotiques à base de fruits sont fabriqués à partir d'ananas, de canneberge, fraise, citron vert, mangue, raisins pomme de cajou, olive et orange, etc (**Panghal et al., 2018**). Ainsi, les souches de *L. plantarum* peuvent être utilisées comme probiotique dans les aliments à base de fruits et de légumes tels que jus de pomme, carotte mélangée avec jus d'orange, jus de tomate et jus de chou (**Ranadheera et al., 2017**).



**Etude
expérimentale**

L'ensemble de notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, durant la période d'Avril- juin 2019.

II.1. Matériel biologique : Le matériel biologique utilisé pour effectuer ce travail est le suivant :

- ✓ **Souches bactériennes :** Une bactérie lactique, *L. plantarum* codée S10 fourni par Mr. Khennouf a été utilisée, cette dernière a été isolée du rumen de chèvre de race locale; De mêmes, trois souches à Gram⁺ et à Gram⁻ à savoir *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa* ont été utilisées au cours de cette étude pour effectuer le test de la co-agrégation avec la souche lactique *in vitro*.
- ✓ **Matrices végétales :** Un légume, le persil et un fruit, la fraise ont été achetés du marché. Ils ont servi pour la préparation des jus et des extraits.
- ✓ **Les cellules épithéliales intestinales :** Les cellules épithéliales de poulet (*Gallus gallus*) ont été préparées au niveau du laboratoire et elles ont servi pour étudier la capacité d'adhésion *in vitro* de notre souche lactique.
- ✓ **Les enzymes et autre:** Les enzymes suivantes ont été utilisées au cours de cette étude, il s'agit de la pepsine (2000U/ml) et d' α -amylase (75U/ml). La pancréatine (100U/ml) a été également utilisée.

II.2. Revivification de la souche et standardisation de l'inoculum:

L. plantarum S10 a été cultivée dans le bouillon Man-Rogosa et Sharp (MRS), puis incubée à 37°C pendant 24h. Son développement se traduit par un trouble et une pastille blanche au fond des tubes. À partir de ces derniers, un ensemencement par strie a été réalisé sur la gélose MRS préalablement coulée dans des boîtes de Pétri et la pureté de la souche a été vérifiée après incubation à 37°C pendant 24h par observation macroscopique (aspect des colonies) et microscopique (coloration de Gram).

Pour la fiabilité de chaque test, la connaissance de la charge de l'inoculum reste primordiale, ainsi, nous avons appliqué la même technique, avec les mêmes conditions et le même milieu de culture pour la standardisation de l'inoculum de notre souche.

Un ml (1ml) de la culture bactérienne a été inoculé dans 10 ml de bouillon MRS, puis incubé à 37°C pendant 24 h; au terme d'incubation, la DO de la culture a été ajustée à 0.7 (620 nm) puis des dilutions décimales ont été réalisées dans l'eau physiologique stérile jusqu'à 10⁻⁸. La gélose MRS a étéensemencée à partir des dilutions 10⁻⁷, 10⁻⁸ et le dénombrement a été effectué après une incubation à 37°C pendant 24/48h. Le nombre de cellules vivantes par ml de culture est exprimé en UFC/ml selon la formule suivante (Adour et Dabouz, 2016):

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

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

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

n₁ : Nombre de boîtes correspondant à la plus faible dilution ;

n₂ : Nombre de boîtes correspondant à la plus forte dilution ;

d : Correspond à la plus faible dilution.

II.3. Evaluation de quelques aptitudes probiotique de *L. plantarum in vitro*:

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

II.3.1. Résistance aux pH gastrique:

La capacité de la souche à survivre dans le milieu acide a été étudiée en se référant à la méthode décrite par Kaewnopparat *et al.* (2013). Brièvement, 0.5ml de la culture jeune (18h) a été introduit dans 5 ml de bouillon MRS déjà ajusté à pH 2, pH 3 et pH 4. La résistance de la bactérie à ce facteur hostile a été estimée par la lecture de la densité optique à 620 après incubation de 2 h à 37°C.

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

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

Avec : pH acide*: pH2, pH3 et pH4

II.3.2. Résistance aux sels biliaires :

Afin d'évaluer la résistance aux sels biliaires, nous avons opté pour le protocole décrit par **Handa et Sharma (2016)**. 0.5 ml de la culture bactérienne jeune de 18h a été inoculé dans 5ml du bouillon MRS à 0.3% de sels biliaires, suivi d'une incubation à 37°C pendant 4h. Un témoin a été préparé dans les mêmes conditions.

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

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

II.3.3. Test d'hydrophobicité :

L'évaluation de l'hydrophobicité de la souche a été faite selon la méthode décrite par **Bouridane et al. (2016)**. Le culot bactérien d'une culture de 18h a été récupéré par centrifugation à 12000 rpm /15min suivi par deux lavage successifs par le tampon PBS ; puis resuspendue dans 1.2 ml de tampon phosphate magnésium (pH 7.0). La densité optique initiale de la suspension a été ajustée approximativement 0.7 à 450 nm ($\text{DO}_{\text{initiale}}$).

Ensuite 0.6 ml du xylène, chloroforme, toluène et éthyle d'acétate a été ajouté doucement à 3 ml de la suspension bactérienne suivie par une incubation à 37°C pendant 10 min. Le mélange a été agité en utilisant un vortex pendant 2 min après 15 min d'incubation à la température ambiante, la phase aqueuse a été récupérée à l'aide d'une pipette pasteur ; ensuite la densité optique finale a été mesurée à 450 nm ($\text{DO}_{\text{finale}}$).

Le pourcentage d'hydrophobicité des surfaces cellulaires (H%) a été déterminé par la différence entre les deux valeurs de la densité optique initiale et finale en appliquant l'équation suivante :

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

II.3.4. Test d'auto-agrégation et de co-agrégation :

Pour les essais d'auto-agrégation et de co-agrégation de *L. plantarum* S10, la méthode décrite par **Dias et al. (2013)** a été suivie. Le culot bactérien de la souche incubé à 37°C pendant 18h a été récupéré par centrifugation (6000 rpm/10 min) et lavé deux fois avec du PBS (7.2); puis mis en suspension dans 4 ml du même tampon; une agitation de 10 secondes a été procédée et l'absorbance de la suspension initiale a été ajustée à 0.6. Après une incubation à 37°C pendant 3 h, l'absorbance a été déterminée à une longueur d'onde de 620nm.

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

$$\text{Autoagrégation \%} = [1 - (A_t - A_o)] \times 100$$

Avec:

A_t : DO à t heure d'incubation ;

A_o : DO à t_o .

Pour le test de co-agrégation, la suspension cellulaire de notre souche a été préparée de la même manière que le test d'auto-agrégation. Cependant, des cultures d'*Escherichia coli* de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* ont été préparées dans le bouillon nutritif. Pour se faire, pour chaque espèce bactérienne, un tube du bouillon nutritif a étéensemencé par une colonie de chaque espèce et le tout a été incubé à 37°C pendant 24h. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 5000rpm/15min, lavées deux fois avec PBS et leurs absorbance à 620 nm a été ajusté à 0.7.

Une fois les suspensions préparées, un volume égal de souche test et de *L. plantarum* S10 (2 ml) a été mélangé suivi par un vortex de 10 secondes et d'une incubation à 37°C sous agitation pendant 3h. L'absorbance du mélange (A_{mix}) a été mesurée à 620 nm après 3h d'incubation.

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

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

II.3.5. Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales :

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

- ✓ **Préparation de cellules épithéliales** : Un segment de l'ilium du poulet a été bien lavé par le PBS (pH7.2), placé dans un bain du même tampon et soumis à une réfrigération à 4°C pendant 30 min afin de faciliter la récupération des cellules. Les cellules sont par la suite récupérées en grattant la surface tapissant l'intestin par une lame stérile, des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10^{-4} , cette suspension cellulaire a été examinée sous microscope pour s'assurer qu'elle n'est pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales est approximativement de 5×10^4 cellules/ml.

- ✓ **Préparation des cellules bactériennes** : Le culot bactérien de la culture d'une nuit (18h) a été récupéré par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 min ; suivi par deux lavages avec le PBS, le culot a été repris dans 2ml de même tampon suivis d'une observation microscopique (Gx100) pour confirmer que le nombre est approximativement de 10^8 cellules/ml.
- ✓ **Réalisation de test** : 1 ml de la culture bactérienne a été mélangé avec 1 ml de la dilution 10^{-4} de la suspension des cellules épithéliales déjà préparées. Après l'incubation à 37°C pendant 45 min ; un frottis coloré avec le cristal violet 0.1% pendant 5 min a été réalisé. L'adhésion est évaluée par examen au microscope optique à caméra (Gx100).

Le test est considéré positif si le nombre de cellules adhérentes est supérieur à 15 (**Lin et al ., 2007**).

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

II.4.1. Résistance à la toxicité du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ Scavenging Activity) : La technique décrite par **Li et al. (2012)** a été appliquée avec des modifications mineures: à 1% (V/V) d'une culture d'une nuit, le bouillon MRS (Témoin) et le même bouillon contenant 0.4, 0.7 et 1.0 mM de peroxyde d'hydrogène ont été ensemencés suivi d'une incubation à 37°C pendant 6 h. La croissance cellulaire a été mesurée en prenant l'absorbance à 620 nm.

II.4.2. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) :

II.4.2.1. Préparation de la suspension bactérienne et son surnageant :

La souche *L. plantarum* S10 a été cultivée sur bouillon MRS (1% :V/V) pendant 18 h à 37°C. Les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 min, suivi d'un lavage et repris en suspension dans le Tampon Phosphate Salin (PBS). Le nombre de bactéries dans le culot cellulaire a été ajusté à une absorbance de 0.8 (environ 10^8 UFC/ml). Alors que le surnageant a été obtenu par centrifugation de la culture à 5000 rpm pendant 10 min (**Das et Goyal, 2015**).

II.4.2.2. Réalisation de test :

L'activité d'élimination des radicaux libres a été mesurée en utilisant la méthode décrite en (**2015**) par **Kachauri et ses collaborateurs**. 500µl de la préparation bactérienne (ou surnageant) et 3 ml d'une solution fraîchement préparée de 2,2-diphényl-2-picryle hydrate de hydrazyl (DPPH) (0.05mM) dans du méthanol ont été mélangés et incubés en obscurité pendant 30 min.

Une suspension contenant du méthanol et des cellules ont 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, la valeur d'absorbance moyenne a été calculée et 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_{control} : Absorbance du contrôle.

II.4.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles :

La suspension bactérienne et son surnageant ont été préparés selon la méthode déjà décrite en II.4.2.1.

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 d'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 : Absorbance d'échantillon ;

A_0 : Absorbance du témoin ;

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

II.5. Préparation des extraits et dosages des principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes) :

Pour extraire les composés phénoliques et flavonoïdes à partir de persil et de fraise, nous avons opté pour deux méthodes différentes : l'extraction par macération dans le méthanol aqueux, extraction par macération supplémentée d'une centrifugation.

II.5.1. Extraction par macération dans le méthanol aqueux (extraction solide/liquide) à partir des feuilles et tiges de persil :

L'extraction utilisée dans cette étude est de type solide-liquide (contact direct entre le solide et le solvant), qui consiste à laisser le matériel végétal en contact prolongé avec un solvant (méthanol) à température ambiante afin d'extraire le maximum des composés bioactifs.

Le protocole d'extraction des composés phénoliques à partir de persil est basé sur la méthode décrite par **Hamia et al.(2014)**. 10 g de feuilles broyées et de tiges finement découpées de persil sont macérées dans 100ml de méthanol aqueux (Méthanol-eau) (80:20 V/V). L'ensemble a subi une agitation pendant 24h à température ambiante à l'abri de la lumière. L'extrait est donc récupéré par une filtration à l'aide d'un papier filtre Wattman N°1. Le filtrat a été récupéré dans un flacon stérile et le résidu a subi la même opération 3 fois avec renouvellement du solvant chaque 24h. Enfin, les macéras-hydro-alcooliques des 3 jours ont été évaporés à sec sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif ou rotavapeur (**BUCHI**) à température de 45°C pendant 30 minutes. Un séchage a été effectué dans l'étuve à 45°C pendant 24h afin d'évaporer l'eau. Les résidus secs obtenus ont été repris dans 40 ml de méthanol.

II.5.2. Extraction des composés phénoliques à partir des pulpes de fraises :

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par **Zlotek et al. (2016)**. Les composés phénoliques sont extraits par macération de 5g de la pulpe dans 15 ml de méthanol sous agitation à l'obscurité pendant 1h ; ce qui empêche l'oxydation des polyphénols. Après une centrifugation (5000g, 20min), le surnageant contenant les polyphénols est récupéré. Nous procédons à une deuxième extraction identique sur le culot pour extraire 30% de polyphénols supplémentaires et donc obtenir un dosage plus exhaustif. Les surnageants sont mélangés avec 5ml de méthanol et stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

II.5.3. Dosage des principes actifs (composés phénoliques) :

II.5.3.1. Dosage des polyphénols totaux :

La teneur des polyphénols totaux a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode colorimétrique en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu en suivant le protocole appliqué en (2006) par **Wong et Kitts**. Brièvement, dans des tubes à hémolyse en verre contenant un volume de 200 µl de chaque extrait, 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois a été ajouté. Après 5 min de repos, chaque tube reçoit 800 µl d'une solution de carbonate de sodium à 7.5%. Les tubes sont agités et incubés à température ambiante à l'obscurité pendant 1h et l'absorbance est lue à 765 nm.

Un blanc a été préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant d'extraction (méthanol) et la teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage d'acide gallique (**Annexe 7**).

II.5.3.2. Dosage des flavonoïdes :

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

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée selon la méthode décrite par **Djeridane et al. (2006)**. Un volume d'un ml de chaque extrait a été additionné d'un ml de chlorure d'aluminium à 2% (préparé dans le méthanol). Le mélange a été incubé pendant 10 minutes à l'obscurité et à température ambiante puis l'absorbance a été mesurée à 430nm. Les résultats ont été exprimés en µg équivalent de quercétine. Ces concentrations sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec de la quercétine préparée dans le méthanol (**Annexe 8**).

II.6. Détermination de l'activité antioxydante des extraits :

II.6.1. Piégeage du radical libre DPPH :

Un volume de 500µl de chaque extrait a été ajouté à 5 ml de la solution méthanolique du DPPH (0.004%). Après une période d'incubation à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante, la lecture de l'absorbance a été effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc contenant que le DPPH et le méthanol (**Prabha et Vasantha, 2011**). Un témoin a été réalisé en remplaçant l'extrait par le Trolox comme un antioxydant de référence.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre de DPPH est calculé par la formule suivante :

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

II. 6.2. Réduction de fer (FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power) :

Les extraits qui ont un potentiel réducteur réagissent avec le ferricyanure de potassium (Fe^{3+}) pour former le ferrocyanure de potassium (Fe^{2+}), qui réagit ensuite avec le chlorure ferrique ($FeCl_3$) pour donner un complexe ferrique ferreux mesurable à 700 nm. La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (**Jayanthi et al., 2011**).

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

La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 700 nm contre un blanc contenant les mêmes quantités de réactifs en remplaçant l'extrait par le méthanol. Une augmentation de cette absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires (**Annexe 9**).

II.7. Préparation des jus de fraise et de persil lactofermentés :

Des poids de 500g de fraise et de persil ont été bien lavés et coupés en petits morceaux ensuite broyés et mixés (Mixeur Kenwood). Chaque produit obtenu est additionné d'un volume de 500 ml d'eau stérile, suivi d'une centrifugation (3000 rpm /15 min) afin de clarifier le jus. Chaque jus a été récupéré dans des flacons stériles et l'ensemble a subi une stérilisation dans un bain Marie à 95°C pendant 20 min.

Pour la fermentation des jus, la méthode utilisée dans notre préparation est celle décrite par **Breidt et Caldwell. (2011)**. Pour chaque flacon de jus déjà préparé, un ensemencement par la souche *L. plantarum* à raison de 5% a été effectué et la fermentation a été lancée dans l'agitateur incubateur (**Memmert**) à 37°C pendant 24h (**figure 6**).

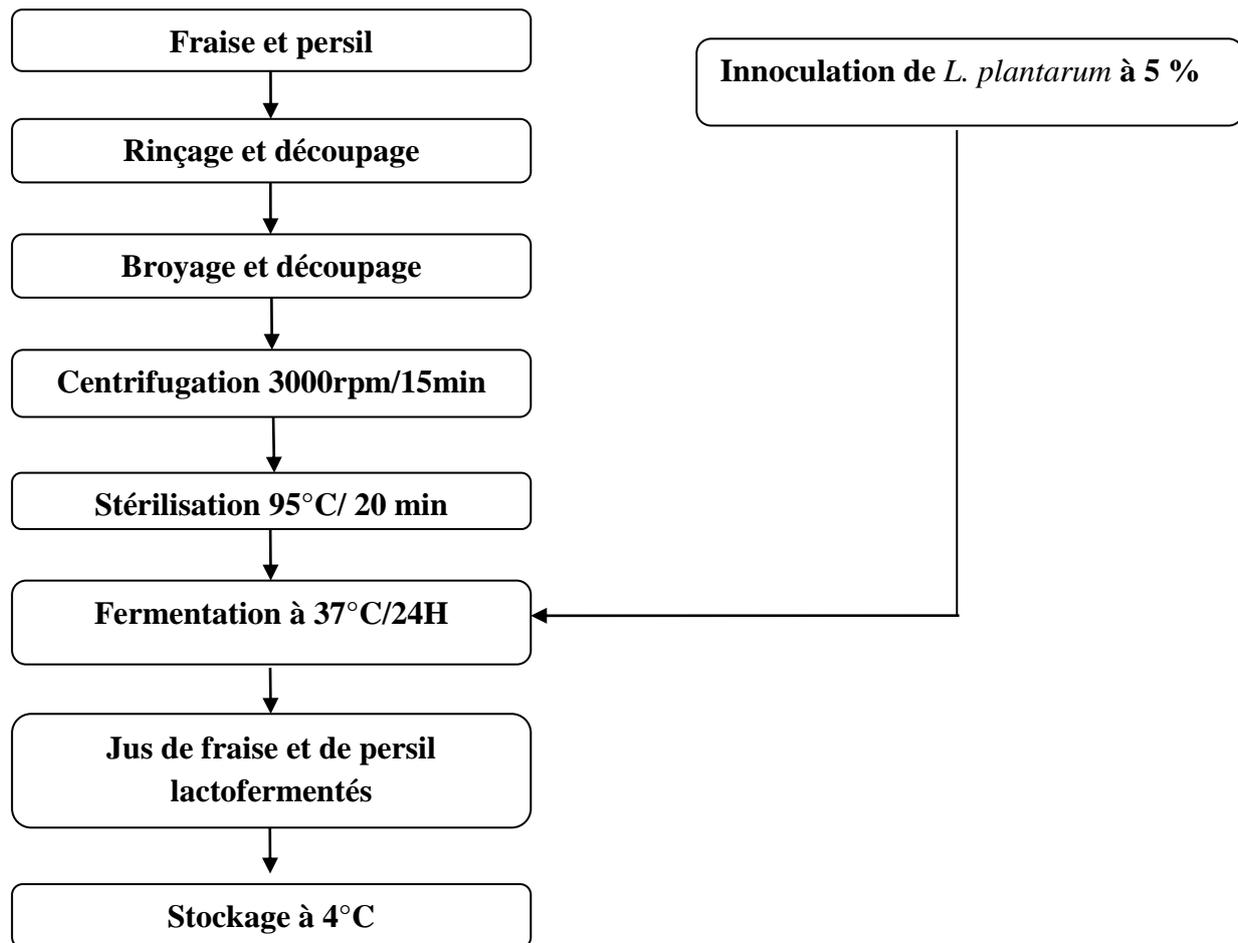


Figure 6. Diagramme de la préparation des jus de fraise et de persil lactofermentés (Breidt et Caldwell , 2011).

II.7.1. Evaluation de quelques paramètres de fermentation :

Dans le but d'avoir une idée sur l'évolution de la fermentation de nos jus, nous avons suivis trois paramètres à savoir le pH, l'acidité et le nombre de cellules viables, cela lors de l'ensemencement à t_0 et après 24h de fermentation à 37°C.

- ✓ Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH mètre (HANNA) préalablement étalonné par l'eau distillée (pH 7). La méthode consiste à prolonger l'électrode du pH mètre dans 20 ml de jus et la valeur affichée sur l'écran a été notée (Reddy *et al.*, 2015).
- ✓ L'acidité titrable totale a été déterminée par titration d'un volume de jus de 10 ml avec du NaOH 0.1N en présence de phénolphtaléine jusqu'à avoir un pH final de 8.2. Les résultats de l'acidité ont été exprimés en pourcentage d'acide citrique en utilisant l'équation suivante (Kim, 2017) :

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

- ✓ Le comptage des cellules viables lors de la fermentation des jus a été réalisé par la méthode de numération sur milieu solide (gélose MRS). Des dilutions en cascades ont été effectuées à partir d'un ml de jus a été introduit dans des tubes contenant chacun 9 ml d'eau physiologique jusqu'à aboutir à la dilution décimale 10^{-8} . Une fois les dilutions prêtes, l'ensemencement des boîtes gélosées a été réalisé par étalement à partir des dilutions 10^{-7} et 10^{-8} . Par la suite, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24/48h. Le nombre d'UFC a été calculé comme suit :

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

II.8. Mesure de l'activité antioxydante de la bactérie après 24 heures de fermentation :

Après 24 h de fermentation, l'activité antioxydante des cellules de *L. plantarum*S10 a été évaluée par les mêmes tests déjà cités en haut.

II.9. Effet de la digestion bucco-gastro-intestinale sur *L. plantarum in vitro* :

II.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 du liquide intestinal). La composition des liquides est mentionnée dans le **tableau 5**. Les solutions préparées ont été autoclavées à 120°C pendant 15 min.

Tableau 5. Composition des solutions simulées de la digestion (Minikus *et al.*, 2014)

	Solution mère ajoutée pour préparer	Solution mère ajoutée pour préparer	Solution mère ajoutée pour préparer
	250ml (LS)	250ml (LG)	250ml (LI)
KCl (0.5M)	7.55ml	3.45ml	3.4ml
KH₂PO₄(0.5M)	1.85ml	0.45ml	0.4ml
NaHCO₃(1M)	3.4ml	6.25ml	21.25ml
NaCl (2M)	/	5.9ml	4.8ml
MgCl₂(H₂O)₆(0.15M)	0.25ml	0.2ml	0.55ml
NH₄(CO₃)₂ (0.5M)	0.03ml	0.25ml	/
HCl(6M)	0.045ml	0.65ml	0.7ml

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

II.9.2. Protocole expérimental de la digestion bucco-gastro-intestinale *in vitro* :

Le protocole expérimental de la digestion bucco-gastro-intestinales mentionné ci-dessous (**figure 7**) à pour le but de tester ce qui suit:

- ✓ La survie et la viabilité de la souche *L. plantarum* S10 seule ;
- ✓ L'effet de jus de fraise et de persil comme véhicule probiotique sur la survie et la viabilité de la même souche ;
- ✓ L'effet de combinaison des extraits de fraise et de persil avec la bactérie sur ses aptitudes de survie ;
- ✓ Bioaccesibilité des composés phénoliques des extraits et des jus bruts dans les mêmes conditions de digestion.

Le protocole de la digestion bucco-gastro-intestinale *in vitro* a été réalisé en se référant à celui décrit par **Minikus et al. (2014)**: 10 ml de la suspension bactérienne a été mélangée avec 50 ml de liquide salivaire (α -amylase (75U/ml) / pH 7) et incubée 2 min à 37°C dans l'agitateur incubateur (**Memmert**). Après cette période, un aliquot de 25 ml a été récupéré afin de réaliser les tests (survie, aptitude probiotique, activité antioxydante). Ensuite, 35 ml de la phase orale a été mélangé avec 35 de liquide gastrique (pepsine (2000U/ml) dont le pH a été ajusté à 3 avec HCl (6M)). Le mélange a été incubé sous agitation à 37°C pendant 2 heures. À la fin de la digestion gastrique, un aliquot de 25 ml a été prélevé pour la réalisation des différents tests et le reste de la phase gastrique (45ml) a été dilué avec 45 ml de liquide intestinal où le pH a été ajusté à 7 avec NaOH (1M) et additionné de sels biliaires et de la pancréatine. Le mélange résultant a été incubé pendant 2 heures supplémentaires.

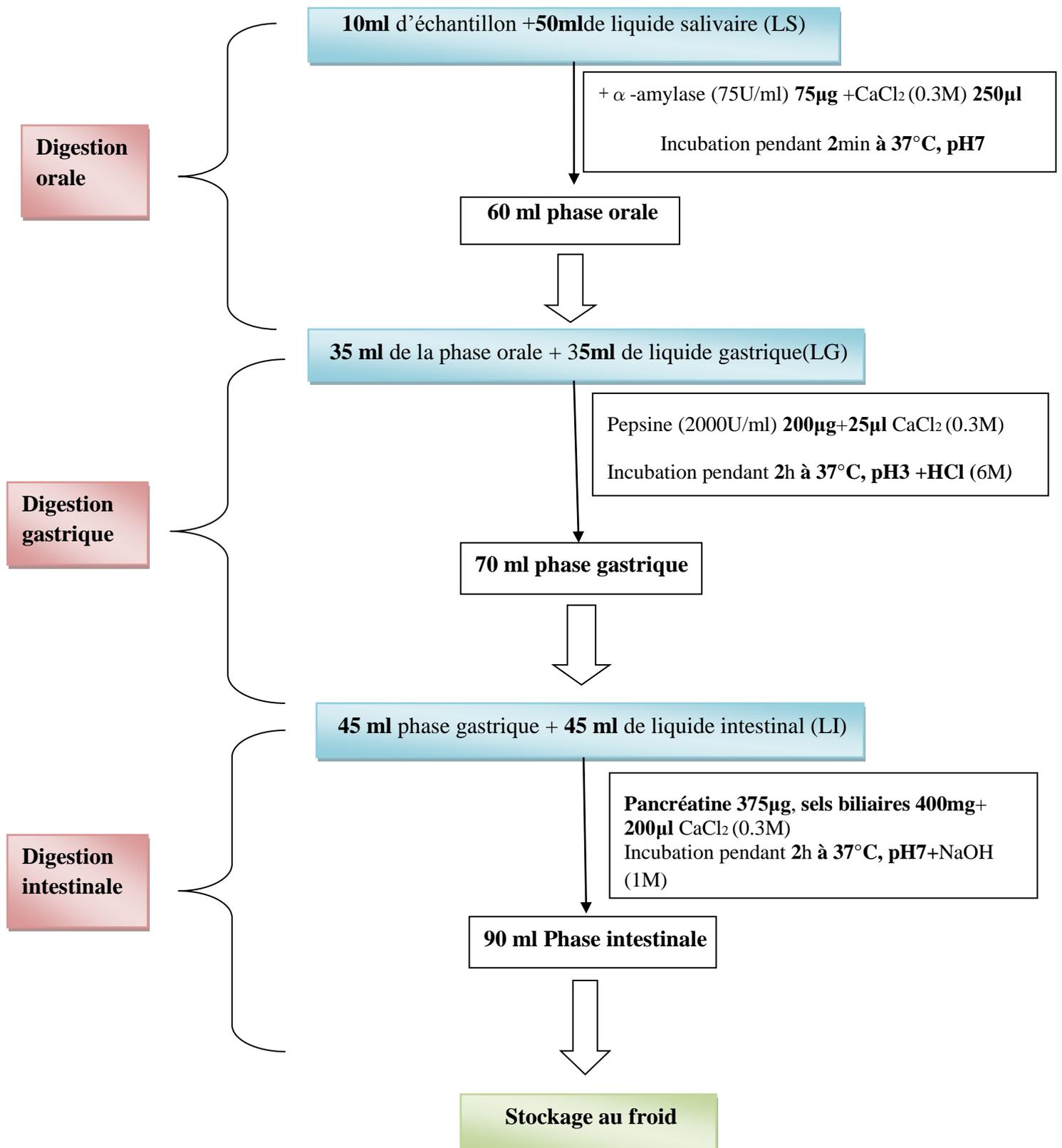


Figure 7. Schéma de la digestion bucco-gastro-intestinale *in vitro* (Minikus *et al.*, 2014).

II.9.2.1. Effet de la digestion sur la survie, l'activité antioxydante et aptitudes probiotiques de *L. planarum* S10 *in vitro*:

a. Evaluation de la survie et la viabilité des cellules : La survie a été déterminée par la comparaison du nombre de bactéries viables après chaque phase de digestion, avec le nombre initial. La mise en évidence des résultats du nombre de cellules viables a été effectuée par deux tests :

- ✓ La mesure de la DO à 620 nm : chaque échantillon de chaque étage digestif a été soumis à une lecture spectrométrique à 620 nm.
- ✓ Le comptage des cellules par dénombrement sur boîtes : l'échantillon prélevé de chaque étage (buccale, stomacale ou intestinal) a été bien homogénéisé et des dilutions en cascades ont été préparées (1ml d'échantillon dans 9 ml de l'eau physiologique stérile) jusqu'à 10^{-8} . 100 μ l de la dilution 10^{-8} de chaque étage digestif a été ensemencé par étalement sur des boîtes de Pétri contenant la gélose MRS. Le dénombrement des cellules a été effectué après incubation à 37°C pendant 24/48h.

b. Evaluation de l'activité antioxydante: L'évaluation de cette activité après la phase orale, gastrique et intestinale a été faite par l'application des mêmes tests mentionnés (**Partie II.4**).

c. Evaluation des aptitudes probiotiques de *L. plantarum* : Après chaque phase de digestion (buccale, gastrique, intestinale), les tests probiotiques déjà décrits précédemment ont été appliqués (**Partie II.3**).

II.9.2.2.Effet de la digestion sur la biodisponibilité des polyphénols et des flavonoïdes *in vitro*:

Ce test a été réalisé sur les extraits et les jus bruts par le dosage des polyphénols et des flavonoïdes après chaque phase de digestion. Les mêmes méthodes décrites en **II.5.3** ont été appliquées.

II.9.2.3.Effet de la digestion sur la survie, l'activité antioxydante et aptitudes probiotiques de *L. planarum* S10 en présence des extraits et des jus (persil, fraise) *in vitro* :

Ce test a été réalisé afin d'évaluer l'effet d'une matrice alimentaire sur la survie, la viabilité, les aptitudes probiotiques ainsi que l'activité antioxydante de la bactérie après chaque phase de digestion. Les méthodes utilisées sont les mêmes déjà décrite en haut (**Partie II.3 et II.4**).

Dans le même objectif, un dosage des polyphénols et des flavonoïdes après chaque phase de digestion a été effectué avec usage des mêmes protocoles utilisés précédemment dans la partie **II.5.3**.

II.10. Montage expérimental de la digestion *in vitro* :

Un montage similaire à celui de tractus gastro-intestinale a été réalisé comprenant les trois compartiments (la bouche, l'estomac, intestin) (**figure8**). Chaque étage digestif reçoit le liquide préparé équivalent à celui trouvé naturellement dans ses poches digestives (**tableau 5**). Le protocole expérimental de la digestion *in vitro* déjà cité précédemment a été appliqué. Après le temps de digestion, la phase intestinale a été récupérée afin de tester la survie et la viabilité des cellules ainsi que d'évaluer l'activité antioxydane (piégeage des radicaux hydroxyles, piégeage des radicaux libre de DPPH).

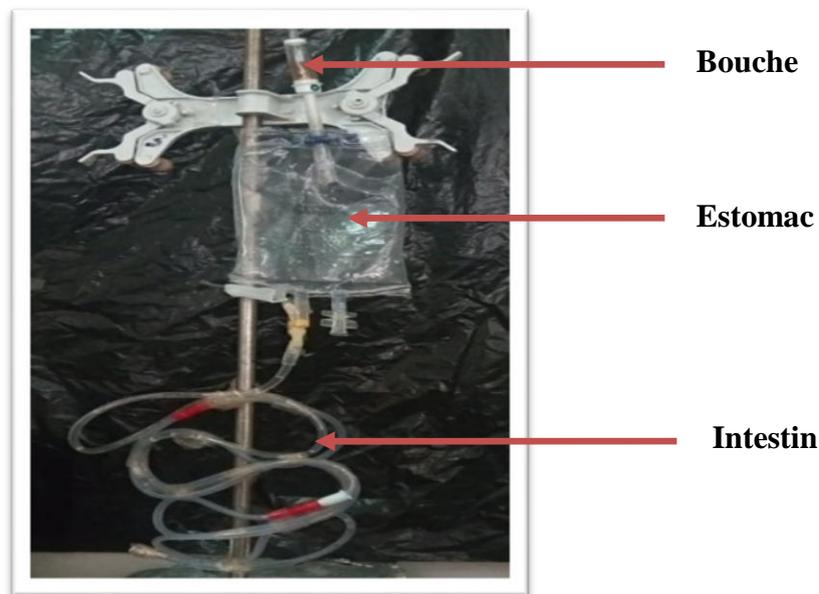


Photo1. Montage expérimental de la digestion bucco-gastro-intestinale *in vitro*.

II. 11. Analyse statistique :

L'analyse statistique des résultats est faite pour des expériences réalisées au moins trois fois et de manière indépendante. Les résultats sont présentés comme une moyenne \pm écart type, le calcul de la moyenne et de l'écart type sont réalisés avec Microsoft Excel 2010. L'effet significatif a été évalué par le test de « Student » qui permet la comparaison des moyennes ; celui-ci a été effectué avec le logiciel « R.2.15.2 ». Les résultats sont jugés statistiquement différents avec un seuil de signification supérieur à 95% lorsque « $P < 0.05$ ».

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

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

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

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



Résultats et discussion

III.1. Vérification de la pureté de la souche :

La souche utilisée dans cette étude (*L. plantarum*) a donnée, sur gélose MRS, de petites colonies blanchâtres et crémeuses ayant le même aspect, la même couleur et la même forme. L'observation microscopique a révélé des cellules de forme bâtonnet disposé en paires.

Les résultats de la standardisation de l'inoculum ont montré qu'un ml de la culture de *L. plantarum* obtenu après 24h d'incubation à 37°C, donne une moyenne de 3.2×10^9 UFC/ml.

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

Le but d'étudier la survie de *L. plantarum* par des tests *in vitro* simulant les conditions du tractus gastro-intestinal, pourrait donner une prédiction sur la survie effective de la souche *in vivo* lorsqu'elle est consommée de façon non protégée.

III.2.1. Résistance au pH gastrique :

L'acidité de l'estomac humain varie de pH 1 à 4.5 et la digestion des aliments peut prendre jusqu'à 3h (Lin *et al.*, 2006). Les résultats de la résistance de *L. plantarum* à l'acidité simulée à celle de l'estomac sur des milieux à pH allant de pH 2 à pH 4 après 2 heures d'incubation sont présentés sur la figure 8.

L'analyse statistique des résultats a révélé la présence de différences hautement significatives ($p < 0.001$). D'après les résultats de cette figure, nous remarquons que le taux de survie diminue en fonction de l'abaissement de pH jusqu'à atteindre un minimum de $41.47 \pm 0.06\%$ de viabilité à pH 2.

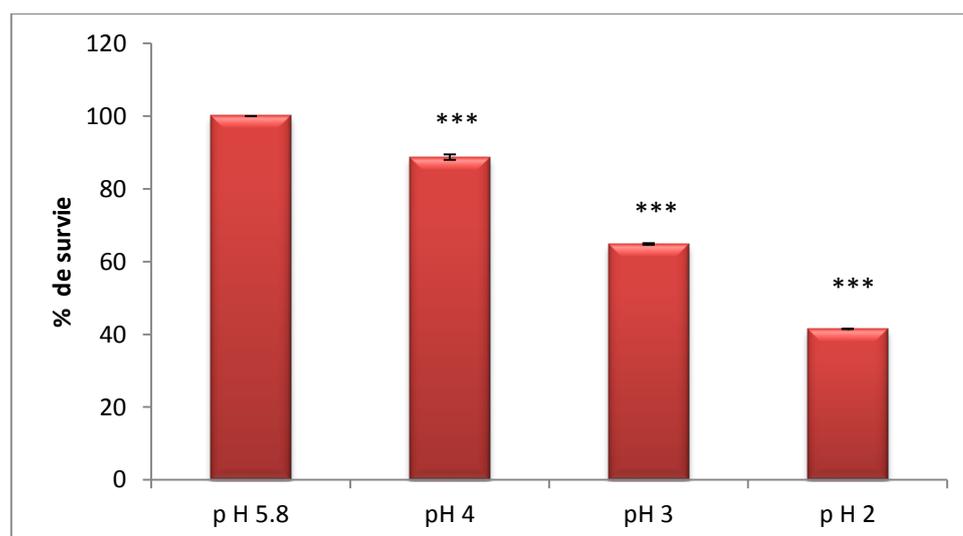


Figure 8. Taux de survie de *L. plantarum* S10 sur des milieux aux différents pH.

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

Par ailleurs, à pH 3 et 4, *L. plantarum* présente le meilleur taux de survie avec 64.80 ± 0.22 % et 88.70 ± 0.77 % respectivement. Les résultats obtenus sont en accord avec celui de **Lee et al. (2006)**, qui ont obtenu un taux de survie de 53.12% après l'exposition de *L. plantarum* NK18 au jus gastrique artificiel (pH 2) pendant 2 heures. Dans une autre étude menée par **Anandharaj et al. (2015)**, différentes souches de genre *Lactobacillus* ont montré des taux de survie de 34.41 à 45.22% à pH 2. Cependant, **Bouridane et al. (2016)**, ont montré que les *Lactobacillus* d'origine vaginale présentaient une bonne survie à pH 2.

III.2.2. Résistance aux sels biliaires :

La concentration physiologique de la bile humaine est comprise entre 0.3% et 0.5%. Une concentration de 0.3% est souvent considérée comme critique pour la sélection des souches probiotiques résistantes (**Guo et al., 2010**).

La souche de *L. plantarum* S10 mise au test a montré un taux de survie d'environ 61.47 ± 0.28 % ($p < 0.001$) après 4 heures d'incubation dans un milieu simulant les conditions du duodénum à une concentration de 0.3% de sels biliaires. L'effet de la bile sur la viabilité des lactobacilles a été étudié par plusieurs auteurs et la plupart de ces études ont montré que la majorité des souches ont survécu dans ces conditions. **Park et Lim (2015)**, ont obtenu de bons résultats de survie en présence de 0.3% de sels biliaires avec *L. plantarum* dont le pourcentage est variable de 96 à 97.4%. En outre, les résultats d'étude d'**Anandharaj et al. (2015)**, sur la tolérance des *Lactobacillus* aux sels biliaires a été exprimé par des pourcentages de 37.26 à 89.34%.

La résistance aux sels biliaires est l'une des caractéristiques les plus importantes qui permet aux lactobacilles de maintenir leur viabilité et d'exercer leurs activités dans l'intestin grêle (**Hyronimus et al., 2000**).

III.2.3. Hydrophobicité des surfaces cellulaires:

Dans ce test, nous avons évalué l'hydrophobicité de la surface cellulaire de *L. plantarum* S10 vis-à-vis de quatre solvants, le xylène (solvant apolaire), le toluène (solvant monopolaire), le chloroforme (solvant acide monopolaire, accepteur d'électrons) et l'éthyle acétate (solvant basique monopolaire, donneur d'électrons) et les résultats obtenus sont mentionnés dans la **figure 9**. D'après les résultats, nous remarquons que *L. plantarum* montre une meilleure hydrophobicité avec l'éthyle acétate, xylène, toluène, dont le pourcentage était de 74.89 ± 0.07 %, 73.22 ± 0.10 % et 71.63 ± 0.08 % respectivement alors qu'une hydrophobicité modérée a été obtenue avec le chloroforme (68.84 ± 0.10 %).

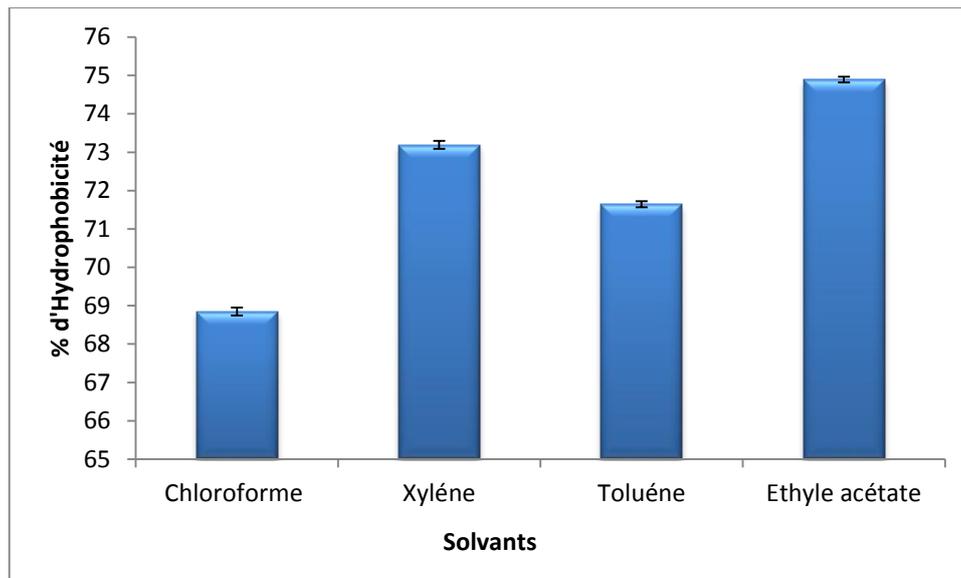


Figure 9. Pourcentage d'hydrophobicité de *L. plantarum* S10

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures.

Les résultats de l'étude menée par **Savedbown et al. (2014)** sont proches des nôtres, ces auteurs ont trouvé également que *L. plantarum* avait une bonne hydrophobicité avec le toluène, elle était comprise entre 47.14 et 99.79%. Dans le même contexte, l'étude menée par **Handa et Sharma (2016)**, a montré que *L. plantarum* avait un pourcentage de 50.8% d'hydrophobicité au xylène, 36.10% au toluène, 9% au chloroforme et 20.4% à l'éthyle acétate.

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

L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules hôtes. Ce test permet d'évaluer le pourcentage d'hydrophobicité que possède la surface cellulaire d'une bactérie lactique vis-à-vis des hydrocarbures, ce qui peut refléter le potentiel de colonisation « bactérie-cellules intestinale » par interactions hydrophobes (**Oelschlaeger, 2010**). Ce paramètre varie suivant les espèces bactériennes et selon les souches d'une même espèce. Elle est influencée par les facteurs de milieu et l'âge de la bactérie ainsi que par sa structure (**Baillif et al., 2010**).

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

La capacité d'auto-agrégation est considérée comme un caractère nécessaire à l'adhésion, car elle facilite la colonisation temporaire et protège l'hôte par la formation de biofilm. Le résultat de l'autoagrégation a révélé que la souche *L. plantarum* S10 avait une forte capacité d'autoagrégation avec un pourcentage de $97.02 \pm 0.05\%$ après 3 heures d'incubation. Dans une étude similaire, trois souches de *L. plantarum* (S1, A et B) ont montré un fort pourcentage d'autoagrégation ($\geq 80\%$) (Janković *et al.*, 2012).

L'analyse microscopique a également confirmé le regroupement des cellules et la présence d'agrégats (photo 2).



Photo 2 : Photomicrographie de l'auto-agrégation de *L. plantarum* S10 (G×40)

Une forte auto-agrégation est due à la surface hydrophobe, tandis que la surface hydrophile est responsable d'une faible auto-agrégation (Kaewsrichean *et al.*, 2006).

La détermination de la co-agrégation est une méthode fiable pour évaluer l'interaction étroite entre les lactobacilles et les bactéries pathogènes dans laquelle les lactobacilles pourraient libérer des substances antimicrobiennes et de former une barrière empêchant la colonisation par les bactéries pathogènes (Kachouri *et al.*, 2015).

Nos résultats ont montré que *L. plantarum* S10 avait une meilleure capacité de co-agrégation avec *S. aureus* et *P. aeruginosa* avec un pourcentage respectif de $56.25 \pm 0.00\%$ et $54.37 \pm 0.61\%$. En revanche, un pourcentage moins faible de $35.78 \pm 0.00\%$ est observé avec *E. coli* (figure 10). Nos résultats sont similaires à ceux d'Anandhrayej *et al.* (2015) ; ayant obtenu un pourcentage de co-agrégation modéré de l'ordre de 19 à 68% avec les bactéries lactiques et *E. coli*. Par ailleurs, les résultats de Collado *et al.* (2008) sont moins importants que les nôtres; ils ont trouvé que *L. plantarum* donne un pourcentage de co-agrégation de 22.9 à 24.1% avec *S. aureus* après 4 heures d'incubation, et il a pu atteindre 74% après 24 heures d'incubation.

Une autre étude menée par **Dias et al.(2013)** a montré une co-agrégation modérée de *L. plantarum* avec *E. coli* de 17.69 % après 2 heures d'incubation mais elle a pu atteindre 27.71% après 4 heures.

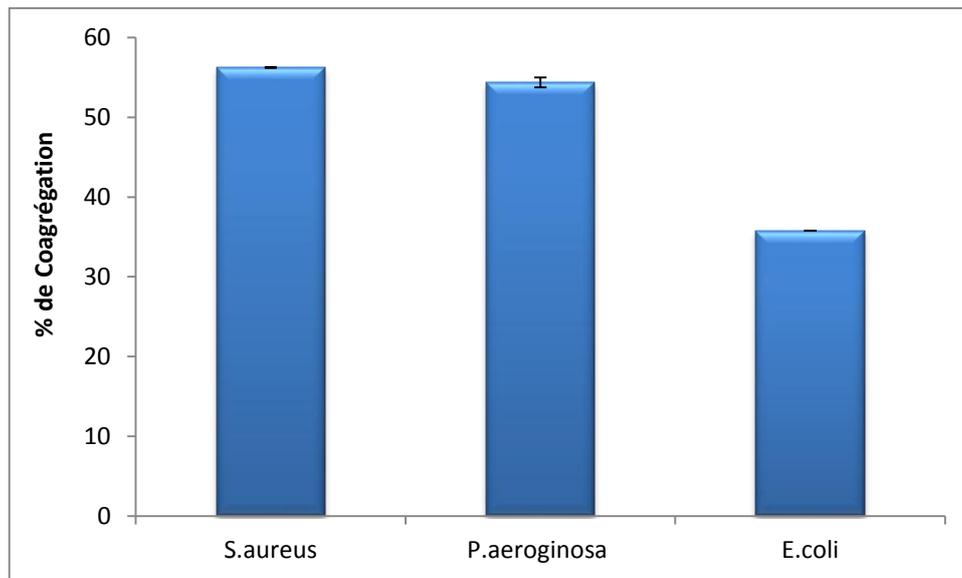


Figure10. Pourcentage de coagrégation de *L. plantarum* avec les trois souches pathogènes.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures.

Le résultat microscopique de la co-agrégation des lactobacilles avec les trois souches pathogènes est illustré par la **photo 3**.

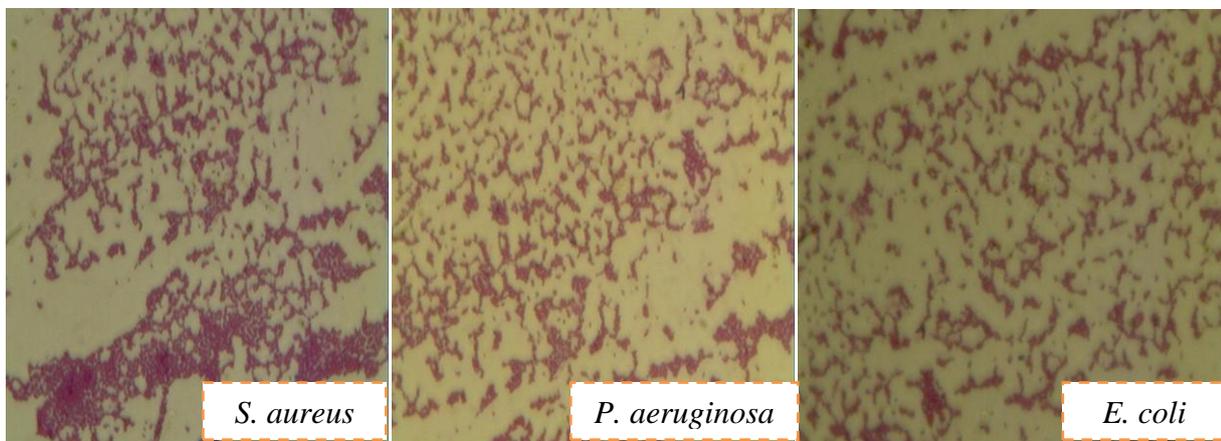


Photo 3 : Photomicrographie de la co-agrégation de *L. plantarum* S10 (Gx40).

III.2.5. Adhésion aux cellules épithéliales :

La capacité d'adhérer aux cellules épithéliales et aux surfaces des muqueuses est l'une des propriétés importante pour sélectionner un microorganisme probiotique. L'adhésion a été réalisée en utilisant des cellules épithéliales d'origine animale (tissus de poulet) et avant de mettre les cellules bactériennes en contact avec les cellules épithéliales, un test de confirmation de l'absence de contaminants microbiens a été réalisé.

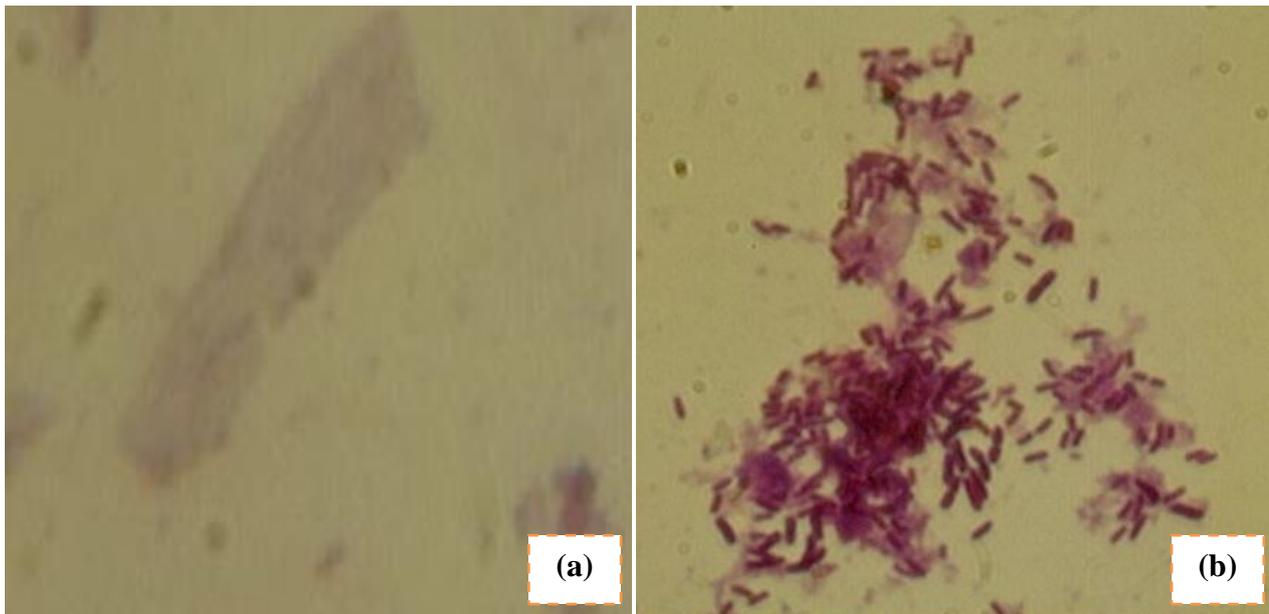


Photo 4 : Photomicrographie de l'adhésion de *L. plantarum* aux cellules épithéliales (Gx100).

(a): Cellule épithéliale saine (b) : cellules bactériennes adhérents

La photo 4, représente l'observation microscopique où le test est considéré comme positif car le nombre de cellules de *L. plantarum* adhérentes est supérieur à 15 (Lin *et al.*, 2007).

Deux types de mécanismes sont impliqués dans le processus d'adhésion des lactobacilles, une adhérence spécifique par une fixation directe via des adhésines qui peut être de nature protéique, polysaccharidique, ou lipoteichoïque et éventuellement une adhérence non spécifique caractérisé par les différentes interactions physicochimiques qui peuvent exister entre les lactobacilles et la muqueuse notamment des forces de Van Der Waals, forces électrostatiques et liaisons hydrogènes (Collado *et al.*, 2007). Par ailleurs, Kachouri *et al.* (2015) ont rapporté que l'adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales intestinales est une condition préalable à leur colonisation, ce qui renforce l'échange de signaux entre les bactéries et les cellules intestinales, et inhibe ainsi la colonisation du tractus intestinal par les bactéries pathogènes.

III.3. Détermination *in vitro* de l'activité antioxydante de *L. plantarum* S10 :

III.3.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène :

L'effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité du *L. plantarum* S10 est représenté par la **figure 11**, où l'analyse statistique a révélé des différences hautement significatives ($p < 0.001$) entre la viabilité et la concentration en peroxyde d'hydrogène.

En se référant au résultat obtenu sur le milieu témoin, nous remarquons que la souche a montré une résistance vis-à-vis du stress induit par les différentes concentrations d' H_2O_2 . Les résultats ont révélé que la souche préserve 65% de sa viabilité après une exposition à 1mM d' H_2O_2 . L'étude menée par Li *et al.* (2012), a montré que 11 souches de *L. plantarum* ont une tolérance au peroxyde d'hydrogène après 8 heures d'incubation, malgré les variations du degré de viabilité d'une souche à l'autre. De nombreuses souches de *Lactobacillus* se sont avérées résistantes au peroxyde d'hydrogène aux divers degrés. *L. fermentum* pourrait survivre avec plus de 90% de cellules viables après 4 h d'incubation en présence de 1.0 Mm de peroxyde d'hydrogène (Wong *et al.*, 2009).

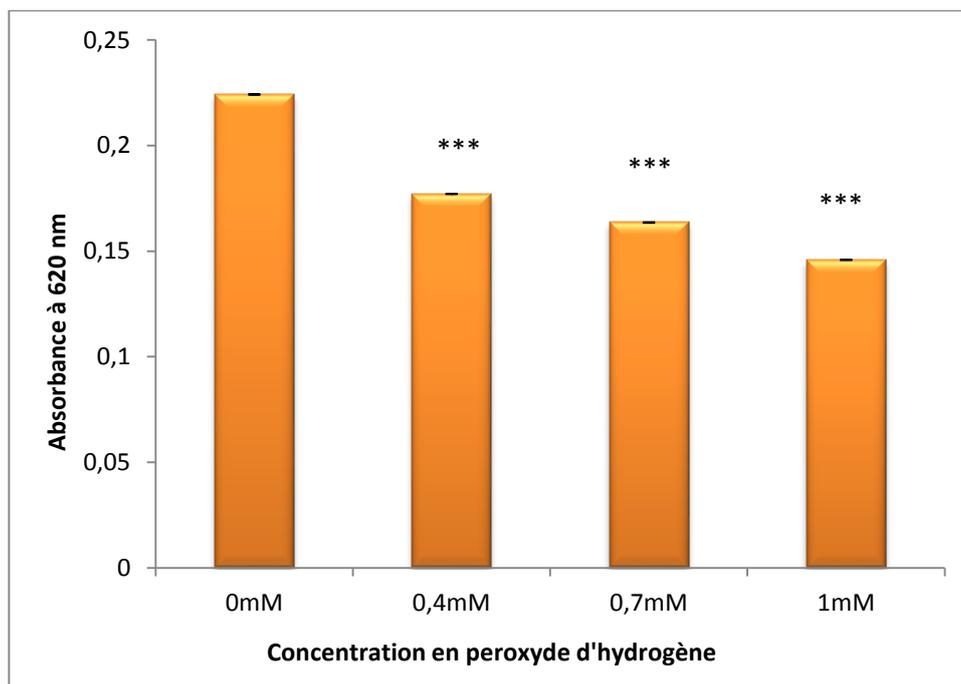


Figure 11. Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité de *L. plantarum* S10.

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

Le mécanisme pour lequel les lactobacilles résistent au peroxyde d'hydrogène diffère selon les espèces et selon les souches de la même espèce. Chez la souche Shirota de *Lactobacillus casei* l'expression constituée du système thiorédoxine-thiorédoxine réductase joue un rôle important dans la tolérance à l'oxygène et au peroxyde d'hydrogène.

Par ailleurs, un gène dénommé hpr A1 est largement distribué dans les lactobacilles et directement impliqué dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène. En outre, il est bien établi que le NADH peroxydase décompose l' H_2O_2 et que certaines souches de *L. plantarum* produisent de la pseudo catalase qui agit également pour décomposer le peroxyde d'hydrogène (Serata *et al.*, 2016).

III.3.2. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) :

Les résultats obtenus sont illustrés par la **figure12**, où le surnageant de la culture cellulaire de *L. plantarum* S10 a révélé une capacité de piégeage des radicaux libre de DPPH plus élevée avec un taux d'inhibition de $75.65 \pm 0.34\%$; alors que la suspension a montré une capacité d'inhibition estimée à $65.24 \pm 0.06\%$.

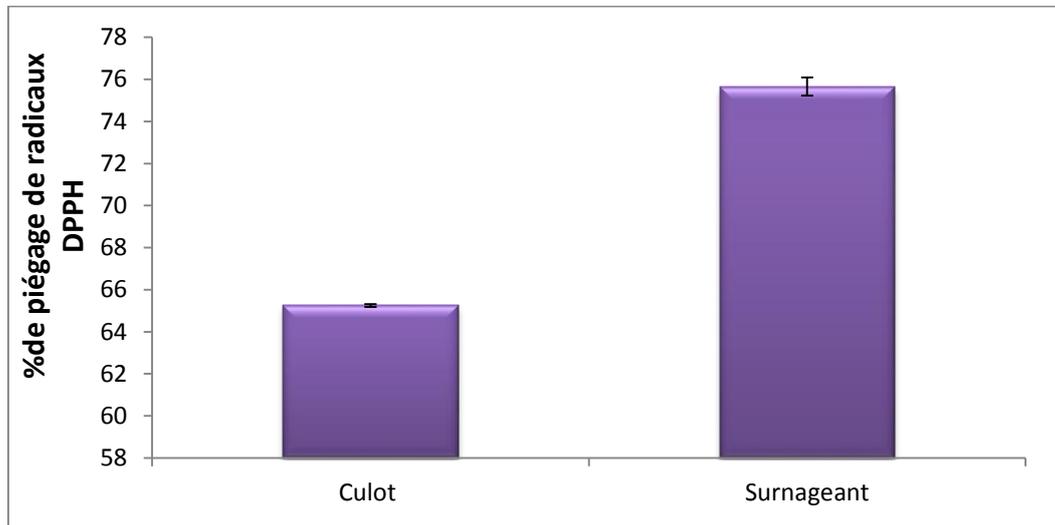


Figure12. Capacité de *L. plantarum* S10 de son surnageant à piéger les radicaux libres de DPPH.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures.

Nos résultats sont meilleurs à ceux trouvés par **Zhang et al. (2014)**, qui ont testé la capacité de certaines souches de lactobacilles à piéger les radicaux libres et ils ont montré que le taux d'inhibition du surnageant était plus important (63,2%) que celui de la suspension bactérienne avec un taux supérieur à 50.0%.

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

III.3.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles :

Les résultats de l'activité de piégeage des radicaux hydroxyles par la culture cellulaire et l'extrait cellulaire de *L. plantarum* S10 sont groupés sur la **figure 13**. Le résultat a révélé que la souche avait une capacité modérée de piégeage des radicaux hydroxyles, avec un taux d'inhibition de $58.09 \pm 0.38\%$, tandis que, le surnageant de la culture a montré une capacité moins faible avec un taux d'inhibition de $32.86 \pm 0.34\%$.

D'après les résultats de **Das et al. (2015)**, *L. plantarum* DM5 a présenté un taux de piégeage des radicaux hydroxyles de 48.7%, alors que, **Li et al. (2012)**, ont obtenu une capacité de piégeage des radicaux hydroxyles de 44,31% chez *L. plantarum* C88.

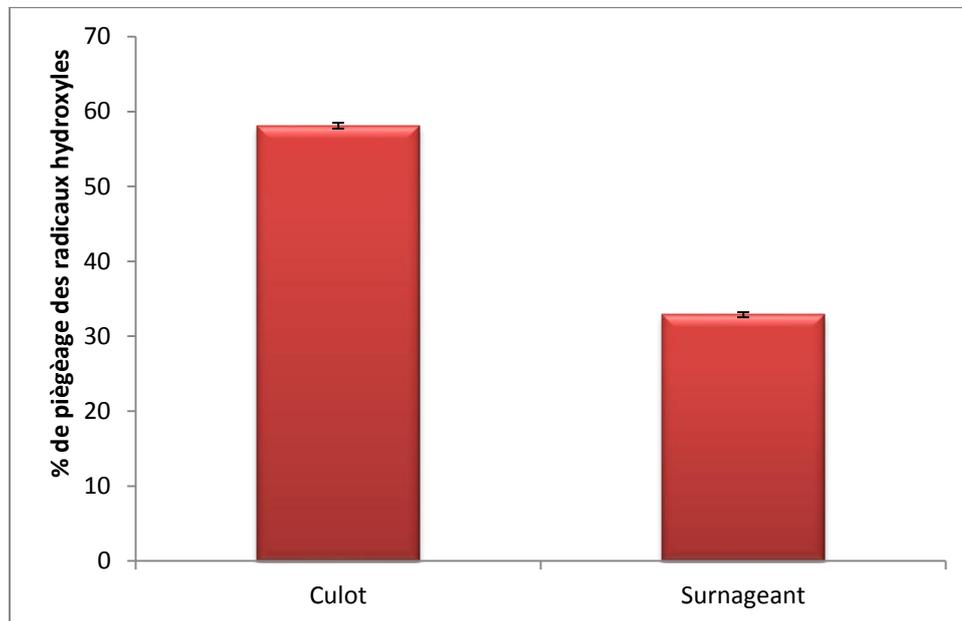


Figure13. Pourcentage de piégeage des radicaux hydroxyles par *L.plantarum* S10 et son surnageant.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures

Les radicaux hydroxyles sont principalement responsables de la lésion oxydative des biomolécules. Il est principalement issu de la réaction de Fenton en présence de métaux de transition tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}). La chélation de ces ions par certains antioxydants peut inhiber la production de radicaux hydroxyles. Cette propriété a été observée chez certaines souches de bactéries lactiques, telles que *Streptococcus thermophilus* 821, *Bifidobacterium longum* 15708 et *L. casei* KCTC 3260 (**Li et al., 2012**).

L'étude menée par **Serata et al. (2016)**, a montré que la protéine HprA1 contribue à la résistance aux effets du peroxyde d'hydrogène chez les bactéries du groupe *L. casei/ L. paracasei* en se liant au fer dans la cellule, empêchant ainsi la formation d'un radical hydroxyle. Donc, pour les lactobacilles qui se développent bien dans des conditions aérobies, l'expression de hprA1 peut constituer un mécanisme raisonnable et efficace pour éviter des niveaux élevés de toxicité du radical hydroxyle.

III.4. Dosages des composés phénoliques des extraits et des jus (fraise et persil) :

III.4.1. Dosage des polyphénols totaux :

Les teneurs en polyphénols sont déterminées en utilisant l'équation de la régression linéaire à partir de la courbe d'étalonnage établie par l'acide gallique ($y=7,59 X + 0,0084$ et $R=0.98$) et exprimées en mg EAG /100ml.

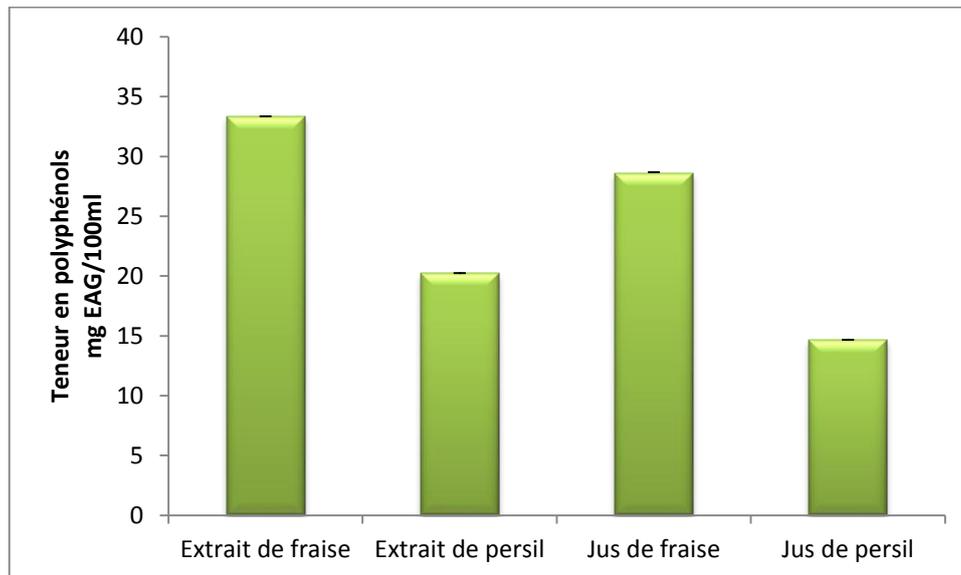


Figure 14. Teneur en polyphénols des jus de fraise et de persil et leurs extraits.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures.

D'après les résultats illustrés par la **figure 14**, nous avons constaté que l'extrait et le jus de fraise renferment une quantité plus forte en polyphénols totaux soit de 33.34 ± 0.007 et 28.60 ± 0.06 mg EAG/100ml respectivement. Alors que, des teneurs de 20.24 ± 0.002 et 14.66 ± 0.001 mg EAG/100ml sont obtenues avec l'extrait et le jus de persil. Nos résultats sont proches de ceux trouvés par **Henning et al. (2010)**, qui ont obtenu une teneur en polyphénols dans l'extrait de fraise de 53 mg EAG/100g. Dans le même contexte, une étude menée par **Wong et al. (2006)**, a indiqué que la concentration des polyphénols dans le persil est de 86 mg EAG/100g.

Toutefois, les résultats d'autre études ne corroborent pas et les nôtres dont les teneurs en polyphénols totaux des extraits de fraise et de persil étaient variables; ces différences peuvent être en relation avec la période et le lieu de récolte, le climat, les conditions géographiques, le patrimoine génétique de la plante. La méthode et le temps d'extraction peuvent également influencer les teneurs en composés phénoliques ainsi que la solubilité et le type du solvant utilisé et le degré de polymérisation des composés phénoliques (**Bentabet et al., 2014 ; Ghedadba et al., 2015**).

III.4.2. Dosage des flavonoïdes :

D'après l'histogramme illustré dans la **figure 15**, nous avons obtenu de meilleures teneurs en flavonoïdes qui sont de 743.16 ± 0.15 et 563.83 ± 0.05 $\mu\text{g EQ}/100\text{ml}$, correspondants aux extraits de persil et de fraise respectivement. Alors que, dans le jus une concentration de 298.14 ± 0.10 $\mu\text{g EQ}/100\text{ml}$ est obtenue dans le jus de fraise et 103.4 ± 0.11 $\mu\text{g EQ}/100$ ml dans le jus de persil.

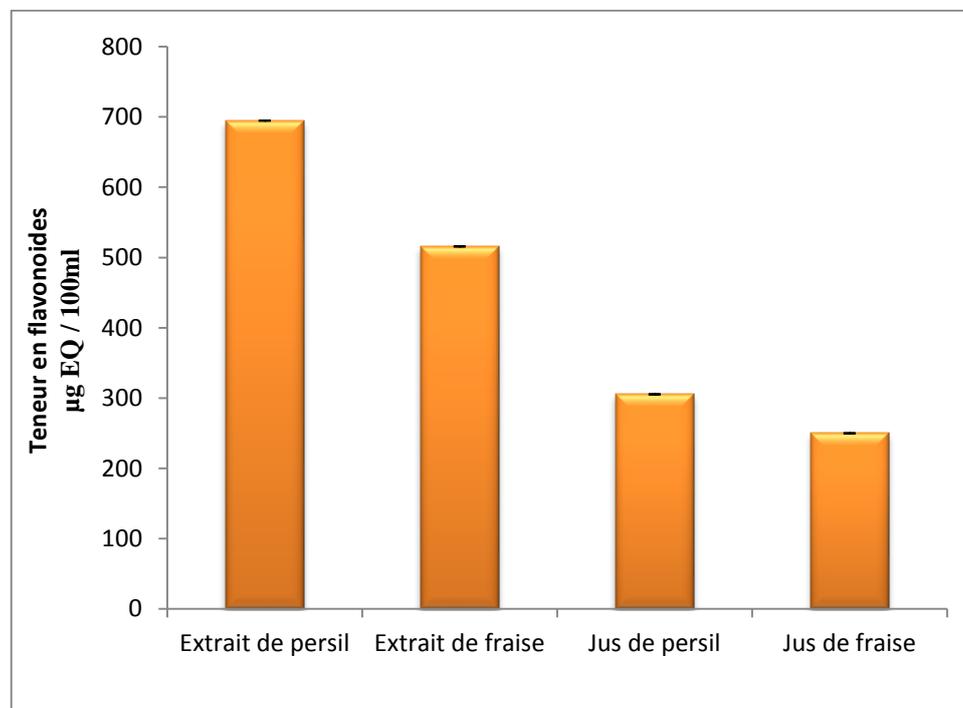


Figure 15. Teneur en flavonoïdes de jus de fraise et de persil et leurs extraits.

Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures

Les résultats obtenus sont similaire à celui de **Rita et al. (2018)**, qui ont trouvé une teneur en flavonoïdes dans les extraits de fraise d'environ 526 $\mu\text{g EQ}/100\text{ml}$. Par ailleurs, **Ciz et al. (2010)**, ont trouvé une teneur total en composés flavonoidiques de 599.7 $\mu\text{g EQ}/100\text{ml}$. Par contre, plusieurs auteurs ont trouvé des résultats inférieurs aux notre. Cette différence de résultats est due à la solubilité de ces métabolites qui dépend essentiellement de leur glycosylation ainsi que la polarité du solvant d'extraction (**Bruneton, 2008**).

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

III.5.1. Piégeage de radical libre DPPH :

D'après les résultats obtenus (**figure16**), les différences entre les échantillons testés sont hautement significatives ($p < 0.001$). Nous avons trouvé que l'extrait de fraise à une capacité anti-radicalaire plus élevée comparativement à celle de l'antioxydant utilisé comme standard le trolox et à celle d'extrait de persil avec des taux d'inhibition respectifs de $83.42 \pm 0.01\%$; $81.85 \pm 0.01\%$ et $67.27 \pm 0.006\%$. Cependant l'activité de piégeage des radicaux libres dans le jus de fraise estimée à $74.85 \pm 0.00\%$ est plus importante que celle de jus de persil estimée à $24.25 \pm 0.01\%$.

D'après **Milardovic et al. (2006)**, le pouvoir antioxydant se détermine par la capacité d'un antioxydant donné à piéger un radical libre ou à donner un atome d'hydrogène ; le DPPH est largement utilisé pour estimer la capacité des substances d'agir en tant que piégeurs des radicaux libres ou donateurs d'hydrogène, et évaluer leur activité antioxydante. En se référant à cette donnée bibliographique, il est claire d'après les résultats obtenus que ce test nous a permis de classer le pouvoir antioxydant des extraits et de leurs jus.

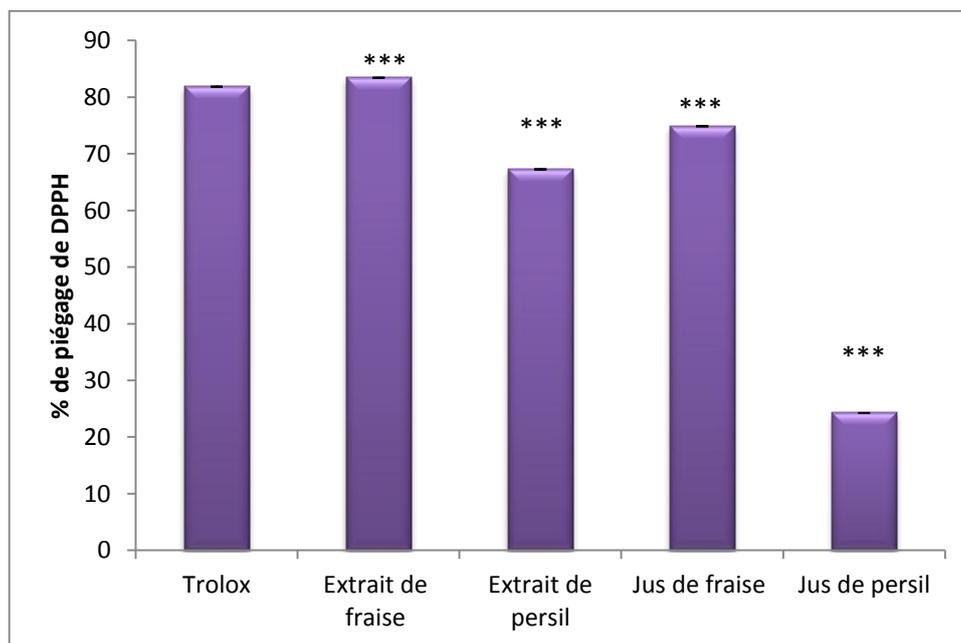


Figure 16. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits et les jus.

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

Ces résultats corroborent et ceux de l'étude de **Henning *et al.* (2010)**, qui ont trouvé que l'extrait de fraise a une capacité anti-radicalaire plus élevée à celle de trolox. Une autre étude faite par **Wong *et al.* (2006)**, a montré que la plus forte activité de piégeage des radicaux de DPPH a été observée à partir des extraits de persil variant entre 18 et 55% de DPPH piégée. Cette activité se justifie par les résultats des teneurs en composés phénoliques et des flavonoïdes ainsi que d'autres métabolites secondaires que nous n'avons pas dosés présentant un potentiel bioactif.

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

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits exprimés en μg équivalent d'acide ascorbique/ ml d'échantillon sont représentés dans la **figure 17**.

L'analyse statistique a montré des différences hautement significatives ($p < 0.001$). L'extrait et le jus de fraise exercent la meilleure capacité à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) avec $247.22 \pm 0.26 \mu\text{g EAA/ml}$ et $141.33 \pm \mu\text{g EAA/ml}$ respectivement, suivi par l'extrait de persil qui a montré une capacité de réduction de $106.91 \pm 0.12 \mu\text{g EAA/ml}$ alors que le jus du même légume a donné un faible pouvoir réducteur de l'ordre de $25.28 \pm 0.009 \mu\text{g EAA/ml}$. En outre, le trolox utilisé comme contrôle a donné un pouvoir de réduction du fer de $36.84 \pm 0.02 \mu\text{g EAA/ml}$.

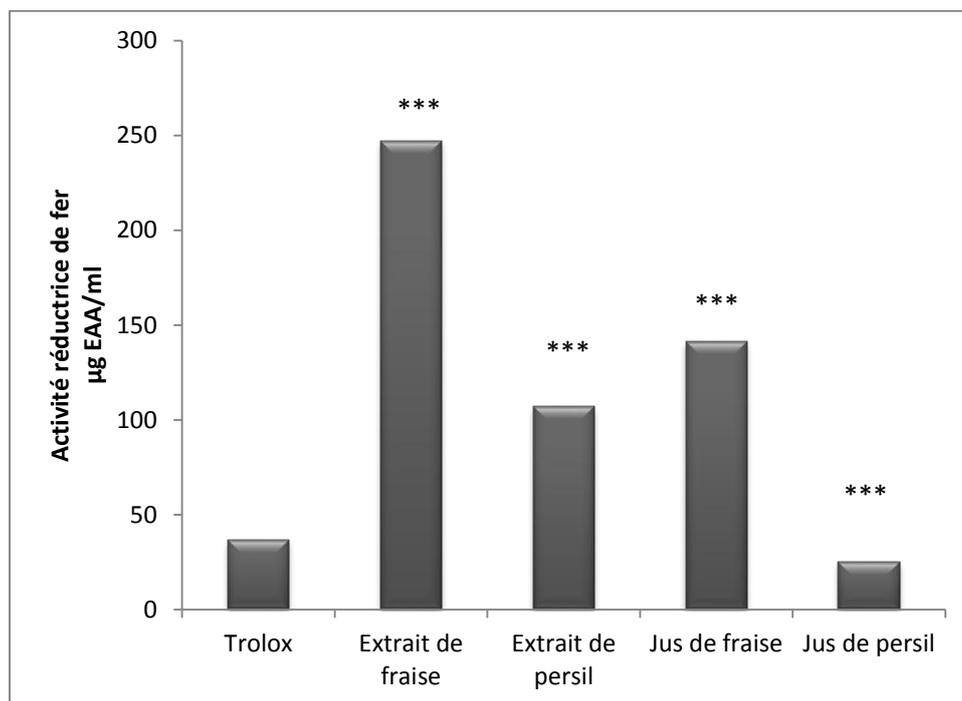


Figure17. Pouvoir réducteur de jus de fraise et de persil et leurs extraits.

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

Le pouvoir réducteur est un indicateur significatif du potentiel antioxydant d'une substance, et présente souvent un profil comparable à celui des teneurs en substances anti-oxydantes dont la nature et la concentration modulent le pouvoir réducteur (**Bentabet et al., 2014**). Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols présents dans nos échantillons (jus et extrait) à réduire le complexe ferrique(Fe^{3+}) de couleur jaune en fer ferreux (Fe^{2+}) de couleur bleu verdâtre, dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur.

III.6. Evaluation de quelques paramètres de fermentation :

III.6.1. Evaluation du pH et d'acidité :

Avant de précéder à la fermentation, le jus de fraise avait un pH de 4 ± 0.09 , qui est proche de celui trouvé par **Garzón et Wrolstad (2006)** (pH égale à 3,98 pour un jus du même fruit), alors que le jus de persil avait un pH de 6.

Cependant après ensemencement du jus de fraise et de persil brut par la souche, nous remarquons une diminution progressive des valeurs du pH au cours de fermentation. Le **tableau 6** résume l'évolution du pH et d'acidité des jus de fraise et de persil lactofermentés.

Tableau 6. Evaluation de pH et d'acidité dans le jus de fraise et de persil.

Echantillons		pH		Acidité (acide citrique %)		
Jus de fraise	Jus brut	Jus fermenté		Jus brut	Jus fermenté	
		T ₀	T _{24h}		T ₀	T _{24h}
	4.00 ± 0.09	3.88 ± 0.01	3.21 ± 0.01	0.20 ± 0.009	0.25 ± 0.01	0.55 ± 0.01
Jus de persil	Jus brut	Jus fermenté		Jus brut	Jus fermenté	
		T ₀	T _{24h}		T ₀	T _{24h}
	6.18 ± 0.01	5.17 ± 0.02	4.2 ± 0.01	0.10 ± 0.002	0.17 ± 0.003	0.32 ± 0.009

Après inoculation des jus bruts de persil et de fraise par la souche *L. plantarum*, le pH a diminué progressivement pour atteindre des valeurs respectives de pH 5.17 et pH 3.88. Cependant et après 24h de fermentation le pH des deux jus a chuté jusqu'à pH 4.2 et pH 3.21 respectivement.

Cette chute de pH est le fait du métabolisme des composants de jus de fraise et de persil par notre souche qui a pu convertir ces derniers en acides organiques qui agissent directement sur le potentiel hydrogène du produit. De même, il est bien établi que les bactéries lactiques ont un métabolisme du carbone relativement simple qui est principalement consacré à la synthèse de l'acide lactique lors de la fermentation.

Les études menées par **Sharma et al. (2013)**, **Nosrati et al. (2014)** et **Reddy et al. (2015)** ont montré qu'au cours de la fermentation des jus de légumes et des fruits le pH diminue et l'acidité augmente.

En ce qui concerne l'acidité du jus, d'après les résultats de **tableau 5**, nous constatons que l'acidité (% acide citrique) de jus de persil et de fraise brut est de $0.10 \pm 0.002\%$ et $0.20 \pm 0.009\%$ respectivement. Après 24 heures de fermentation, nous trouvons que l'acidité des jus augmente pour atteindre une valeur de $0.32 \pm 0.009\%$ pour le jus de persil et $0.55 \pm 0.01\%$ pour le jus de fraise.

III.6.2. Evaluation du nombre de cellules viables :

Après la fermentation des jus de fraise et de persil par *L. plantarum*, le nombre de cellules viables a été suivi en utilisant un dénombrement direct sur boîte de Pétri à T_0 et après 24 heures de fermentation.

Les résultats sont illustrés dans la **figure 18** dont il apparaît que le nombre de cellules viables de *L. plantarum* augmente après la fermentation dans le jus de persil et de fraise pour atteindre 52×10^9 UFC/ml et 114.5×10^9 UFC/ml respectivement. Donc, il est clair que malgré le bas pH de jus de fraise, le taux de croissance de *L. plantarum* dans ce jus est plus élevé à celui du jus de persil.

Dans la présente étude, la souche *L. plantarum* S10 s'est avérée capable de survivre dans les jus fermentés avec une acidité élevée et un bas pH. Cette particularité est due principalement au métabolisme hétérofermentaire de la souche lors de la fermentation malolactique où l'acide malique est décarboxylé dans le cytoplasme par les enzymes malolactiques pour produire de l'acide lactique et du CO_2 . Cette décarboxylation permet l'alcalinisation du cytoplasme et la production d'ATP (**Filannino et al., 2014**).

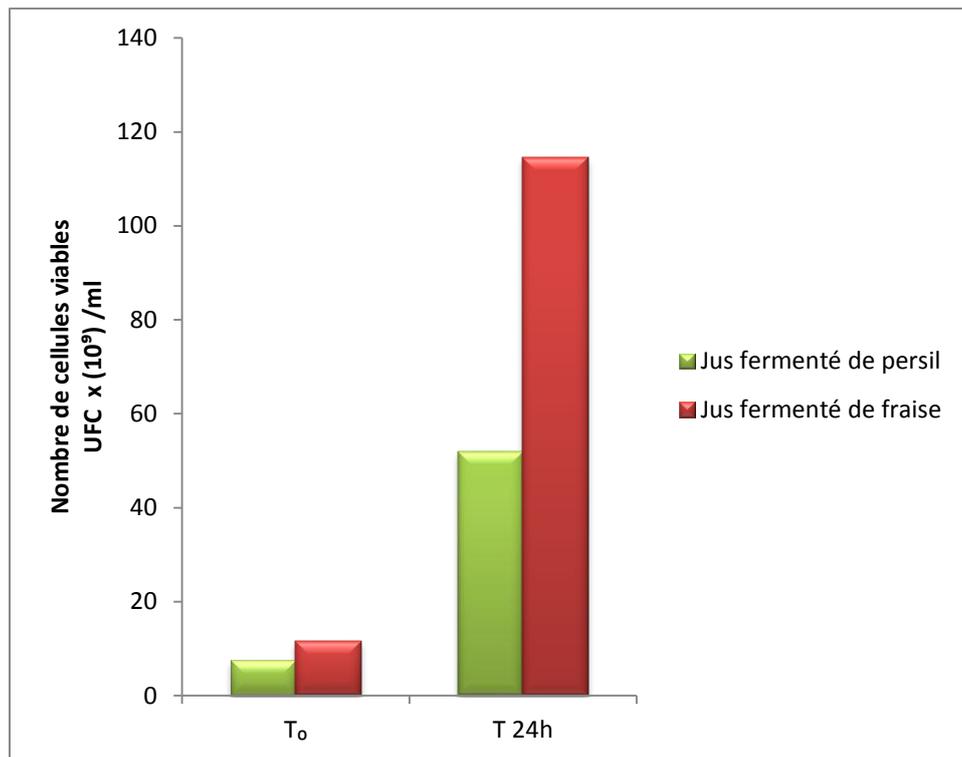


Figure18. Nombre des cellules viables dans le jus de fraise et de persil après 24h de fermentation.

III.7. Activités antioxydantes de la bactérie après 24heures de fermentation :

Ce test a pour objectifs, la vérification de la perte ou non des activités antioxydantes de la souche véhiculé par deux matrices alimentaires fermentés, le jus de persil et le jus de fraise.

III.7.1. 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 persil est représenté sur la **figure 19**. Après analyse statistique, nous constatons des différences hautement significatives ($p < 0.001$).

D'après les résultats illustrés par la figure, nous observons qu'il y a une amélioration de la résistance de la souche *L. plantarum* S10 après 24 heures de fermentation vis-à-vis de différentes concentrations d' H_2O_2 comparativement au témoin. Ainsi, la meilleure résistance est observée dans le jus de fraise comparativement à celle de persil.

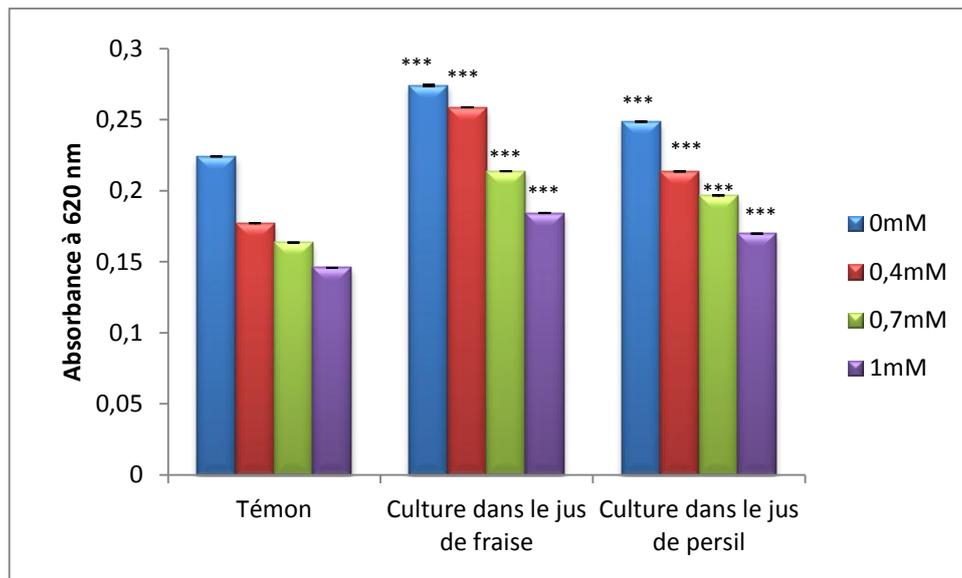


Figure 19. Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité de *L. plantarum*S10 après 24h de fermentation.

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

III.7.2. Piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) :

L'analyse statistique 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 dans la **figure 20** et les résultats sont hautement significatifs ($p < 0.001$). Il apparaît que la culture sur jus de fraise donne une meilleure activité d'inhibition avec un pourcentage de piégeage des radicaux libres de $87.64 \pm 0.06\%$ alors que la même souche sur jus de persil a donné une capacité de piégeage des radicaux de $71.13 \pm 0.85\%$.

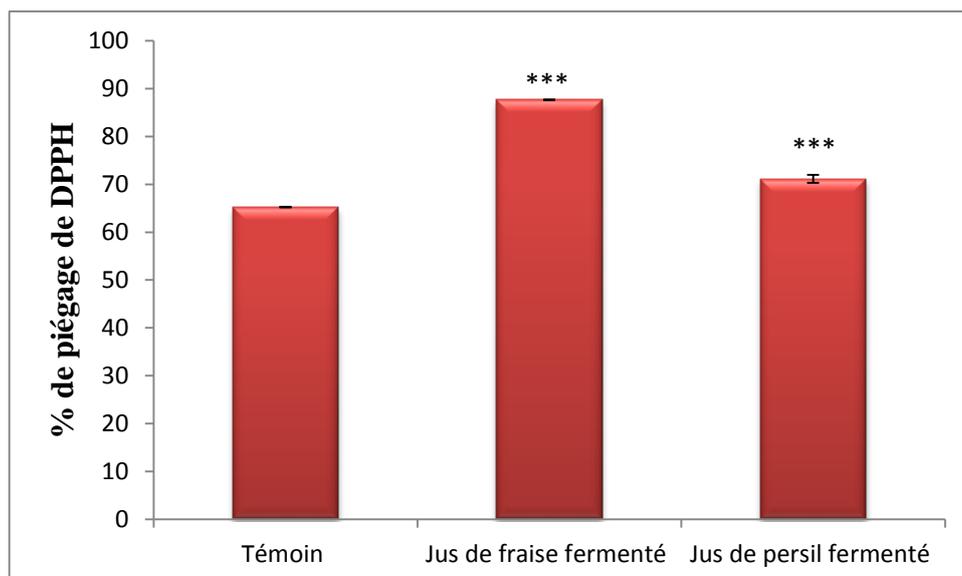


Figure 20. Pourcentage de piégeage de radicaux libre de DPPH après 24h de fermentation

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

III.7.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles :

Les résultats des pourcentages de piégeage des radicaux hydroxyles après 24 heures de fermentation des jus par *L. plantarum* S10 sont groupés sur la **figure 21**. Les résultats ont révélé que la capacité de piégeage de ces radicaux augmente en présence de la matrice alimentaire fermentée par rapport à celle du témoin, montrant ainsi un taux d'inhibition de $64.88 \pm 0.01\%$ pour la culture dans le jus de persil et $83.95 \pm 0.14\%$ dans le jus de fraise.

L'analyse statistique a montré une différence très significative pour la culture avec jus de persil ($p < 0.01$) et une différence hautement significative pour la culture avec jus de fraise ($p < 0.001$).

L'augmentation des activités antioxydantes de la bactérie peut être due à l'augmentation du nombre des cellules au cours des 24 heures de fermentation. Les études menées par **Li et al. (2012)** et **Das et Goyal. (2015)** ont prouvé que les valeurs des différents tests antioxydants y compris la résistance au peroxyde d'hydrogène, l'inhibition de radical hydroxyle et piégeage de radicaux DPPH ont augmenté parallèlement avec l'augmentation de la concentration en cellules de *Lactobacillus* au cours de la fermentation.

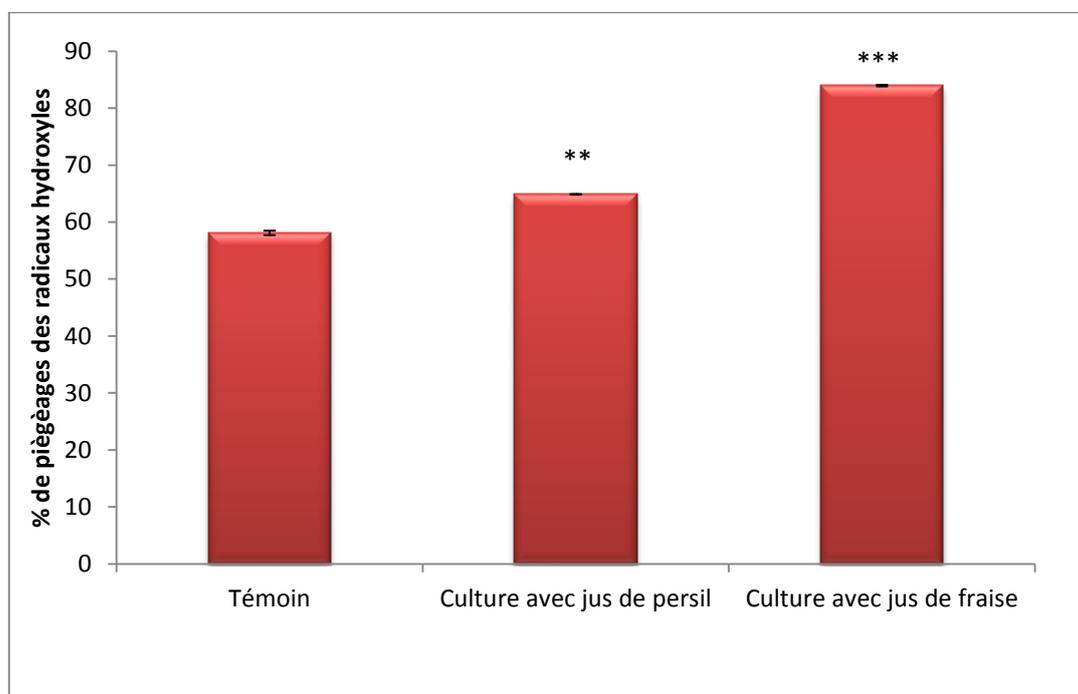


Figure 21. Pourcentage de piégeage de radical hydroxyle après 24h de fermentation. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois lectures. ** : Différences très significatives ($p < 0.01$), *** : Différences hautement significatives ($p < 0.001$).

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

III.8. Effet de la digestion sur la viabilité de *L. plantarum* S10 *in vitro*:

III.8.1. Nombre de cellules viables :

L'effet de la digestion bucco-gastro-intestinale sur la viabilité de la souche est montré dans la **figure 21**. D'après la représentation graphique, nous remarquons que *L. plantarum* S10 est résistante aux conditions similaires de la digestion orale (présence de α -amylase et pH de 7) après 2 minutes d'incubation avec un pourcentage de survie de 58.12% (186×10^9 UFC/ml). Après la digestion stomacale, une diminution accrue en nombre de cellules viables a été constatée, pour atteindre à la fin de la digestion intestinale un nombre de 16×10^9 UFC/ml. Ceci indique que le nombre de cellules est abaissé mais la survie reste toujours. L'addition de la pepsine aux conditions acides de l'estomac a provoqué une perte plus ou moins importante de la viabilité bactérienne.

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

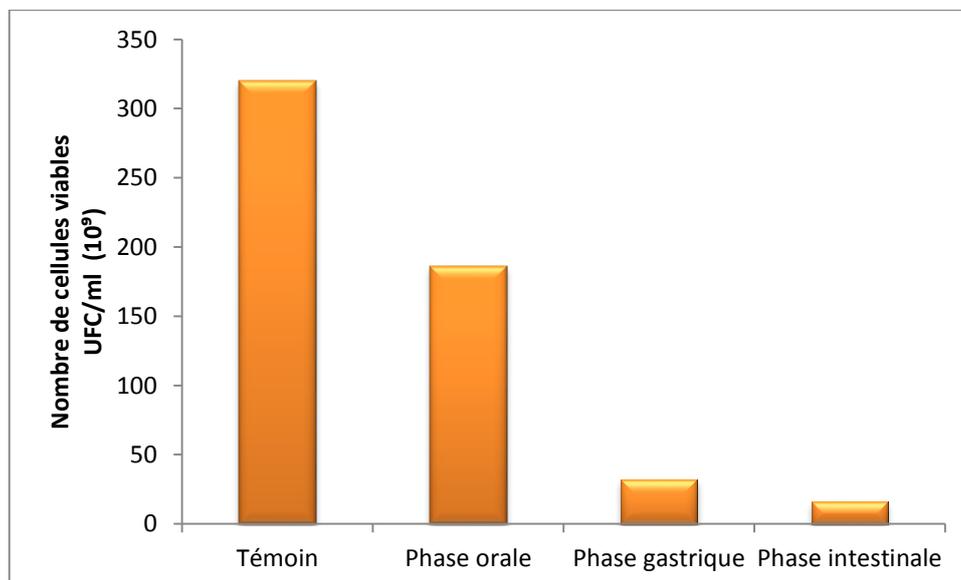


Figure 22. Effet de la digestion sur la viabilité et la survie des cellules de *L. plantarum* S10 (UFC/ml)

III.8.2. Aptitudes probiotiques de *L. plantarum* après la digestion bucco-gastro-intestinale :

III.8.2.1. Résistance au pH gastrique :

La résistance à l'environnement gastrique et celui intestinal après une administration orale est considérée comme l'un des critères les plus importants pour la sélection des probiotiques (Vemuri *et al.*,2018).D'après les résultats illustrés dans la figure au-dessous (**figure23**) présentant l'effet de la digestion dans le tractus gastro-intestinal sur la viabilité de la souche *L. plantarum* S10; en se référant aux résultats que nous avons eu précédemment considérés comme un témoin (**figure 8**), nous remarquons que le taux de survie de la souche diminue en fonction de l'abaissement de pH de 4 à 2 et diminue progressivement d'un compartiment à l'autre jusqu'à atteindre le niveau intestinal avec des taux de survie à pH 4 ,pH 3 et pH 2 de $46.07\pm 0.12\%$; $32.68\pm 0.12\%$ et $25.43\pm 0.07\%$ respectivement.

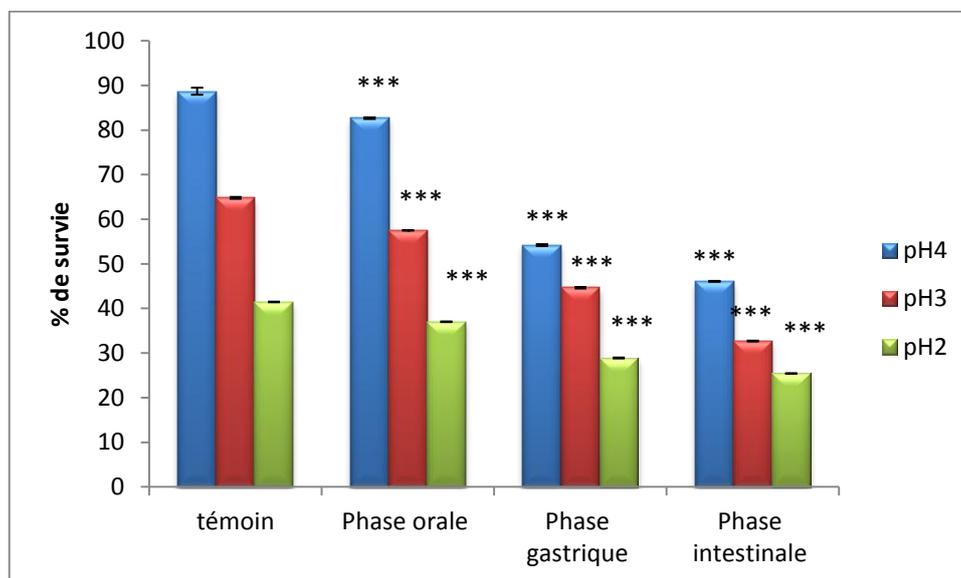


Figure23. Taux de survie de *L.plantarum* aux différents pH après la digestion bucco-gastro-intestinale.

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

Ces résultats vont et ceux de **Linh et al.(2017)** qui ont testé la tolérance de certaines souches probiotiques aux sucs gastriques intestinaux artificiels; ils ont constaté qu'au cours des 60 premières minutes la viabilité des trois souches de lactobacilles GYP 31 ; L15 ; K-C2 a diminué avec pH2 comparativement au pH 4; puis les sucs gastriques et intestinaux simulés ne semblaient pas affecter la viabilité des trois souches à partir de 180 minutes d'incubation.

Une autre étude similaire a été conduite par **Ghezielet et al. (2018)**, ils ont testé la tolérance de six souches de *L. plantarum* aux stress buccaux gastriques et intestinaux, les résultats publiés ont montré que la viabilité des souches n'était pas affectée par le stress orale, cependant la survie était significativement réduite sous les conditions gastriques (pH 2.0) ; en revanche, sous stress intestinal, une tendance à conserver la viabilité a été observée pour tous les souches de *L. plantarum*.

Par ailleurs, **Sanders et al. (1999)**, ont examiné le mécanisme de résistance aux acides de *L. lactis* et ont découvert que le principal mécanisme de contrôle du pH intracellulaire était la FoF1 ATP ase qui transfère les protons dans l'environnement au détriment de l'ATP; un second mécanisme pour l'homéostasie du pH était la voie de l'arginine déiminase (ADI); un autre mécanisme de résistance aux acides exprimé par *L. lactis* dépendant du glutamate en présence de chlorure.

III.8.2.2. Résistance aux sels biliaries :

L'effet des sels biliaries sur la souche lors du passage dans le tractus gastro-intestinal est représenté dans la **figure 24**. D'après les résultats, nous constatons une diminution remarquable du taux de survie de *L. plantarum* S10 après 2min de digestion estimé à $57.65 \pm 0.04\%$ au niveau buccal. Statistiquement, la différence est très significative ($p < 0.01$).

Cependant, le taux de survie atteint $42.89 \pm 0.06\%$ au niveau gastrique après 2h; bien que la baisse de viabilité ait été assez importante après 4h de la digestion intestinale avec un taux de survie de $38.64 \pm 0.20\%$. Au niveau de ces deux derniers étages digestifs, la différence était hautement significative ($p < 0.001$).

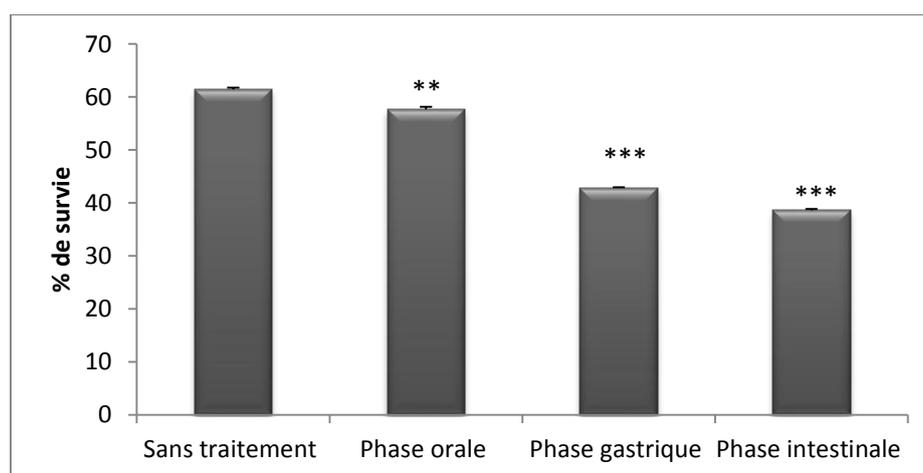


Figure 24. Taux de survie de *L. plantarum* aux sels biliaries après la digestion bucco-gastro-intestinale.

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

Nos résultats rejoignent ceux de **Dianawati et al. (2016)**, ils ont testé la tolérance des certaines souches probiotiques (*Bifidobacterium* et *L. acidophilus*) aux sels biliaires après avoir été exposés au suc gastrique, par conséquent; la stabilité des souches dans le bouillon MRS contenant 0.3% d'acide taurocholique a été observée consécutivement après l'exposition au suc gastriques contenant de la pepsine ayant un pH de 2.0 pendant 2h ; l'acide taurocholique est un acide biliaire primaire. Cependant le taux de survie pour les deux souches a diminué après 8h d'exposition antérieure à cet environnement.

III.8.2.3.Auto-agrégation et Hydrophobicité :

La propriété d'autoagrégation est une caractéristique importante de la surface des cellules pour facilite l'adhésion et la colonisation des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal humain (**Mallappa et al., 2019**).D'après les résultats illustrés dans la **figure 25**; nous remarquons que les taux d'autoagrégation de la souche sont assez proches dans tous les compartiments de tractus gastro-intestinal par rapport à celui du témoin et le taux d'autoagrégation est toujours supérieure à 90%.

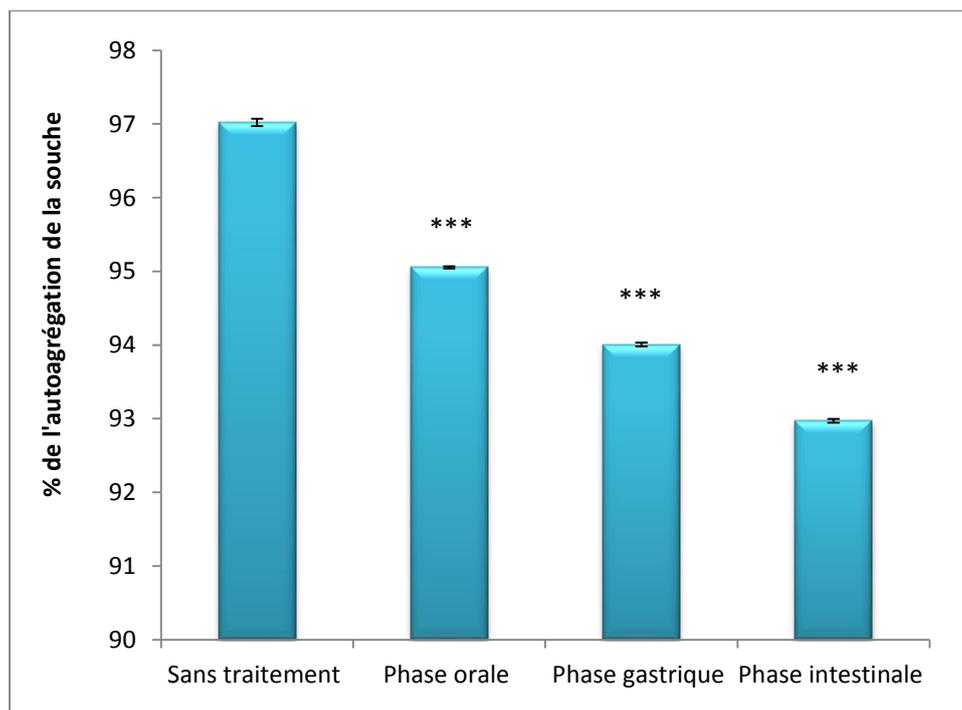


Figure 25. Pourcentage d'autoagrégation de *L. plantarum* après la digestion bucco-gastro-intestinale

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

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés de **Nishayana et al. (2018)**, qui ont testé l'autoagrégation de souches de *Lactobacillus* sur des mucines intestinales ; ces dernières sont isolées, purifiées et immobilisées dans des puits des microtitration, ils ont trouvé que le taux d'autoagrégation est supérieure à 95 %, taux confirmé par des observations microscopiques. Les résultats obtenus par **Chandran et al. (2013)** sur les propriétés de la surface cellulaire peuvent permettre de déterminer la sélection de souches probiotiques présentant un meilleur potentiel d'adhésion à l'épithélium intestinal, cette dernière impliquant plusieurs récepteurs extracellulaires et de surface cellulaires avec des interactions complexes dans des conditions *in vivo* dans l'intestin humain.

En ce qui concerne l'hydrophobicité, selon **Xu et al. (2009)**, cette aptitude est l'une des propriétés importantes qui influence l'adhésion et l'interaction des probiotiques avec les cellules hôtes de TGI. D'après les résultats illustrés dans la **figure 26**, une différence hautement significative a été trouvée ($P < 0.001$).

Nous remarquons que les pourcentages d'hydrophobicité sont relativement variables d'un solvant à l'autre; ainsi que pour chaque solvant dans les trois phases, orale, gastrique et intestinale. L'hydrophobicité est comprise entre 68.62 ± 0.31 et $93.04 \pm 0.08\%$. Nos résultats rejoignent ceux de **Mallappa et al. (2019)** qui ont évalué certains isolats de *Lactobacillus* pour leur capacité à se lier physico-chimiquement à différents solvants organiques dont les résultats publiés ont montré un pourcentage supérieure à 80% avec tous les solvants.

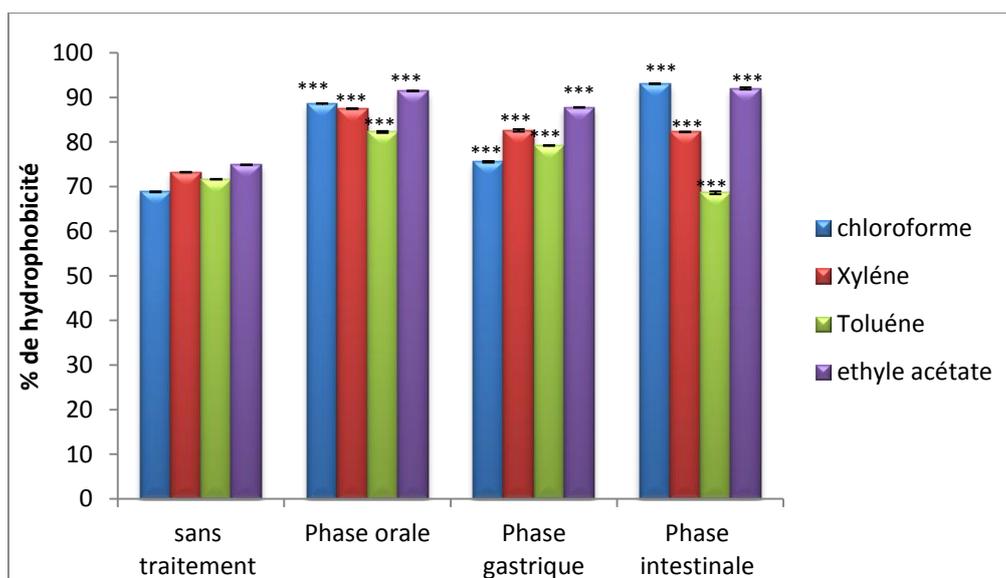


Figure26. Pourcentage d'hydrophobicité de *L.plantarum* après la digestion bucco-gastro-intestinale.

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

Les variations d'hydrophobicité à la surface des cellules est due à la variation de composition des polymères de surface associés à l'interaction hydrophobe qui sont principalement responsable des propriétés d'adhérence de surface des isolat probiotique (Marsall *et al.*,1994).

III.8.3. Activité antioxydante de *L. plantarum* après digestion bucco-gastro-intestinale:

III.8.3.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène :

L'effet de la digestion sur la résistance au peroxyde d'hydrogène est mentionné dans la **figure 27**.

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

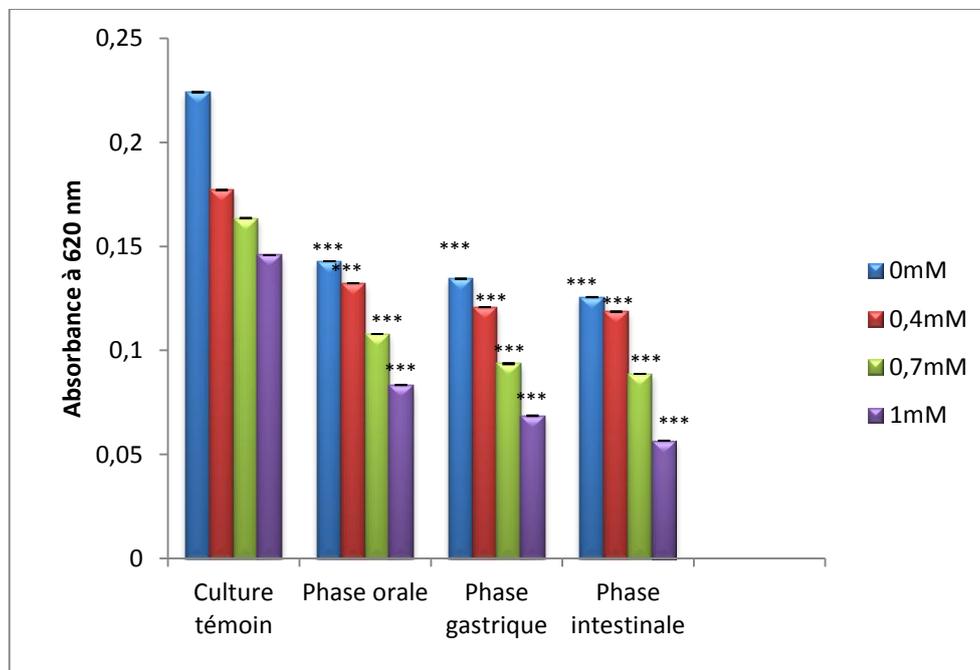


Figure27. Résistance de *L.plantarum* au peroxyde d'hydrogène après la digestion bucco-gastro-intestinale.

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

III.8.3.2.Activité de piégeage des radicaux libres de DPPH :

Les résultats du taux d'inhibition des radicaux libres (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) sont illustrés dans la **figure 28**. Les différences sont statistiquement hautement significatives ($p < 0.001$). D'après les résultats précédemment mentionnés dans la figure 12, indiquant que le taux d'inhibition des radicaux libre du DPPH du surnageant était de $75.65 \pm 0.06\%$, activité plus forte que celle des cellules ($65.24 \pm 0.43\%$), ce qui signifie qu'il y a plus de composés antioxydants dans le surnageant plus supérieures à celles dans le culot de culture bactérienne.

Dans cette étude, en se référant au taux d'inhibition de culot témoin; nous constatons que l'activité de piégeage des radicaux libre DPPH est plus appréciable et importante dans la phase orale et au cours du passage vers la phase intestinale passant par la phase gastrique, le taux d'inhibition diminue pour atteindre $28.46 \pm 0.14\%$.

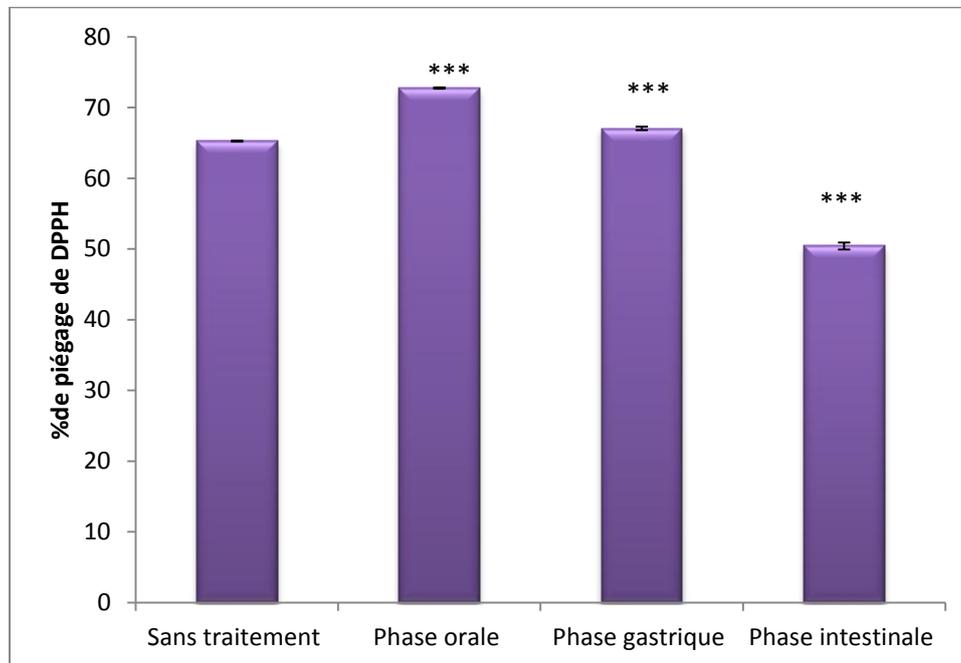


Figure 28. Pourcentage de piégeage des radicaux DPPH par *L.plantarum* après digestion bucco-gastro-intestinale.

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

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

Une étude menée par **Li et al.(2012)** confirmait que les protéines ou les polysaccharides de la surface cellulaire de *L. plantarum* étaient impliqués dans l'activité antioxydante, car l'élimination de ces composés à la surface des cellules entraîne une diminution de la capacité à atténuer les radicaux libres; en d'autre terme le passage de la souche dans le tractus gastro-intestinal peut être affecter par les différentes conditions hostiles, provoquant la perte cellulaires, ce qui conduit a une diminution de l'activité antioxydante .

III.8.3.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles :

L'effet de la digestion in vitro sur l'activité de piégeage des radicaux hydroxyles de la souche au cours de passage est illustré dans la **figure 29**.

Les différences sont statistiquement hautement significatives ($P < 0.001$). Nous remarquons que la capacité de piégeage des radicaux hydroxyles a diminué au cours du passage dans le tractus gastro-intestinal. Le taux d'inhibition est abaissé vers $52.00 \pm 0.23\%$ au niveau buccal, à $45.43 \pm 0.36\%$ au niveau gastrique et le taux atteint $28.46 \pm 0.14\%$ au niveau intestinal après 4h de digestion.

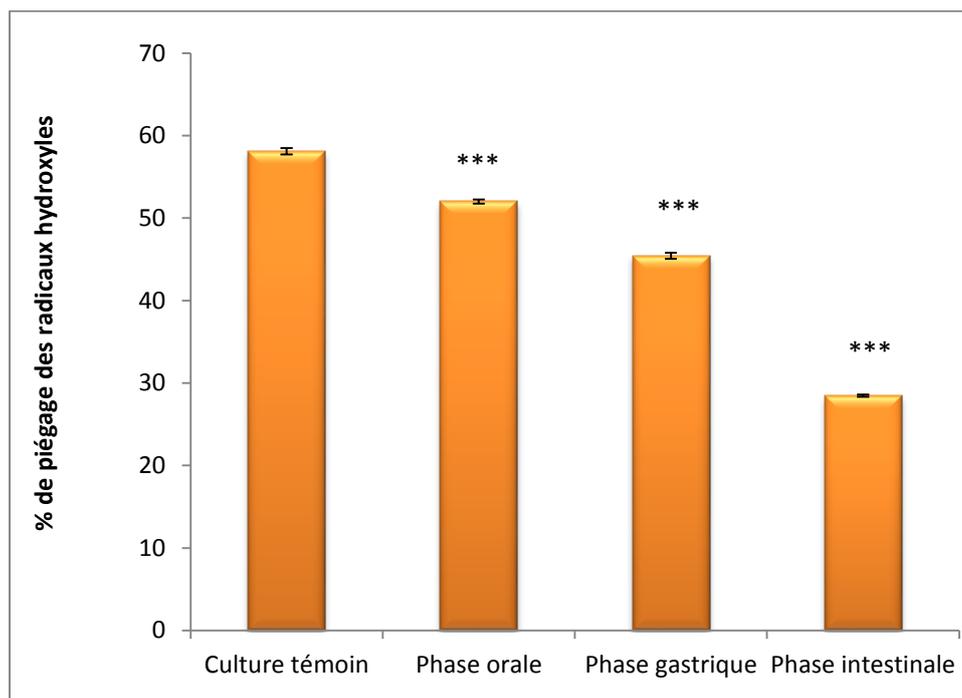


Figure29. Pourcentage de piégeage des radicaux hydroxyles par *L.plantarum* après digestion bucco-gastro-intestinale.

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

III.9. Digestion buco-gastro-intestinale de jus et des extraits :

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

III.9.1. Dosage des polyphénols et flavonoïdes :

L'effet de la digestion bucco-gastro-intestinal sur la bioaccessibilité des composés actifs (polyphénols, flavonoïdes) est présenté sur la **figure 30**.

Selon l'histogramme mentionné dans la **figure 30,31**, la teneur en polyphénols et en flavonoïdes est en diminution continu après le passage dans chaque étage digestif. La proportion des polyphénols pouvant arriver à l'intestin pendant la digestion bucco-gastro-intestinale (c'est-à-dire la fraction potentiellement biodisponible) est de 21.93% (4.44 ± 0.002 mg EAG/100ml) et 20.78% (6.93 ± 0.00 mg EAG/100ml) pour l'extrait de persil et de fraise respectivement. Tandis que, dans le cas de jus, 19.58% (5.60 ± 0.06 mg EAG/100ml) et 23.12% (3.39 ± 0.001 mg EAG/100ml) est la fraction disponible dans le jus de fraise et de persil respectivement.

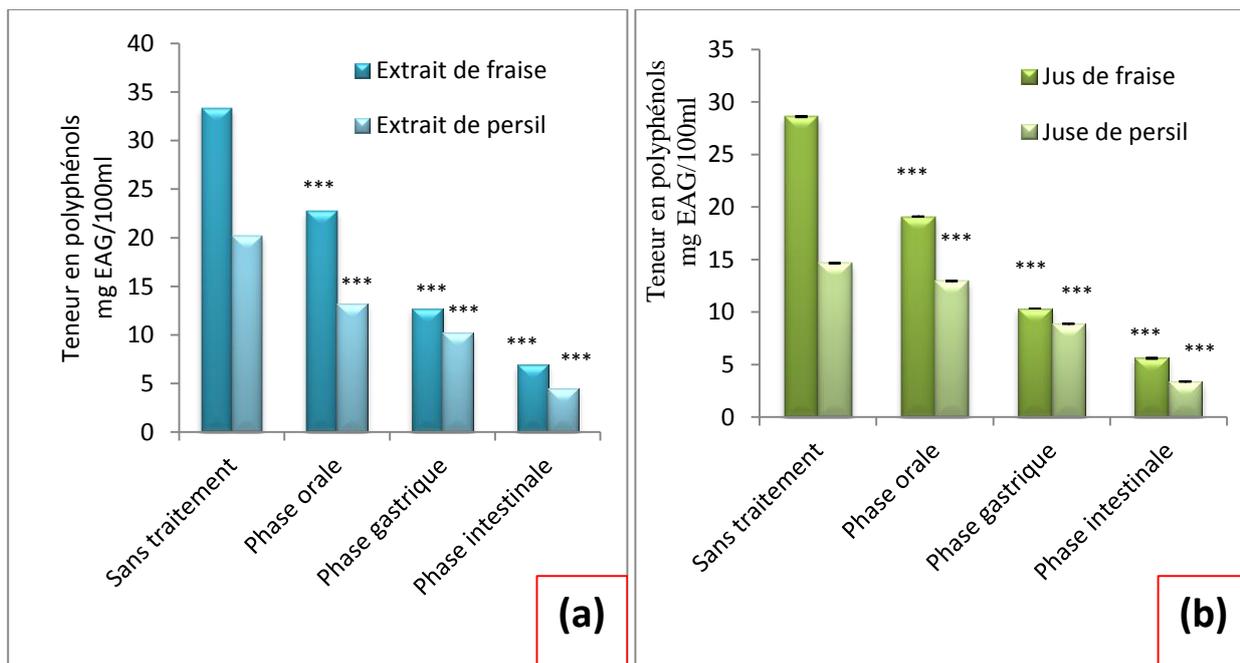


Figure 30. Teneur en polyphénols après la digestion bucco-gastro-intestinale.

(a) : Extraits (b) : Jus

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

Dans le cas des flavonoïdes, La fraction biodisponible dans l'intestin est de 23.84% (177.193 ± 0 μ g EQ/100ml) et 22.74% (128.23 ± 0.02 μ g EQ/100ml) qui correspondent respectivement à l'extrait de persil et de fraise. Alors que dans le jus, nous constatons que la fraction bioaccessible est plus importante que celle de l'extrait atteignant environ 29.65% (40.13 ± 0.02 μ g EQ/100ml) pour le jus de fraise et 40% (7.26 ± 0.01 μ g EQ/100ml) pour le jus de persil.

Les facteurs ayant une incidence sur la bioaccessibilité des polyphénols pourraient être principalement le traitement des fruits et légumes, mais également la désintégration de la matrice alimentaire par la mastication, les interactions avec les constituants des sucs gastro-intestinaux et les conditions physiologiques de la digestion (Dufour *et al.*, 2018).

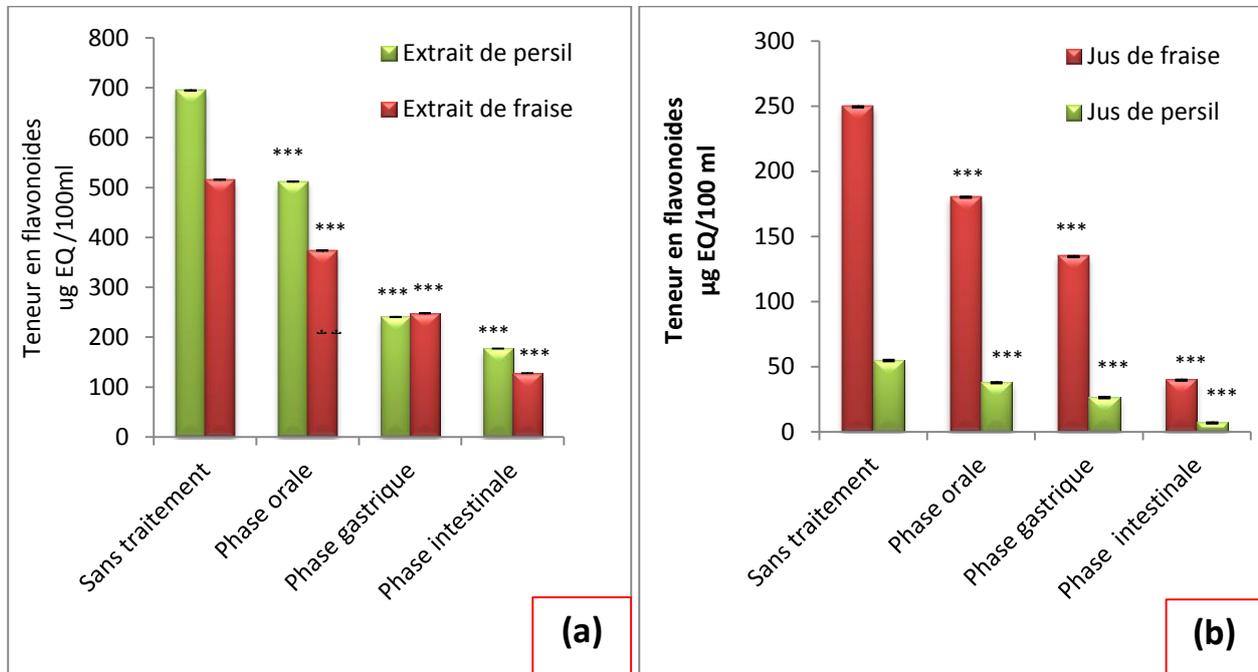


Figure 31. Teneur en flavonoïdes après la digestion bucco-gastro-intestinale.

(a) : aux extraits (b) : aux jus

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

D'après les résultats obtenus on peut conclure que, la présence des composés phénoliques dans une matrice alimentaire n'implique pas nécessairement, une facilité d'absorption ou de biodisponibilité (Ariza *et al.*, 2018).

III.9.2. Effet de la digestion sur l'activité antioxydante des jus bruts et leurs extraits *in vitro*:

L'activité antioxydante de nos échantillons (extraits et jus) est déterminée après chaque phase de digestion, comme présenté dans la figure 32. L'activité de piégeage des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) de jus et d'extrait a diminué après chaque phase de digestion pour atteindre dans la phase intestinale un pourcentage de piégeage de $24.02 \pm 0.06\%$ et $15.99 \pm 0.01\%$ pour l'extrait de fraise et de persil respectivement.

Dans le cas des jus, l'activité de piégeage des radicaux DPPH au niveau intestinal a abouti à un taux de $15.99 \pm 0.09\%$ pour le jus de fraise et $10.19 \pm 0.18\%$ pour le jus de persil.

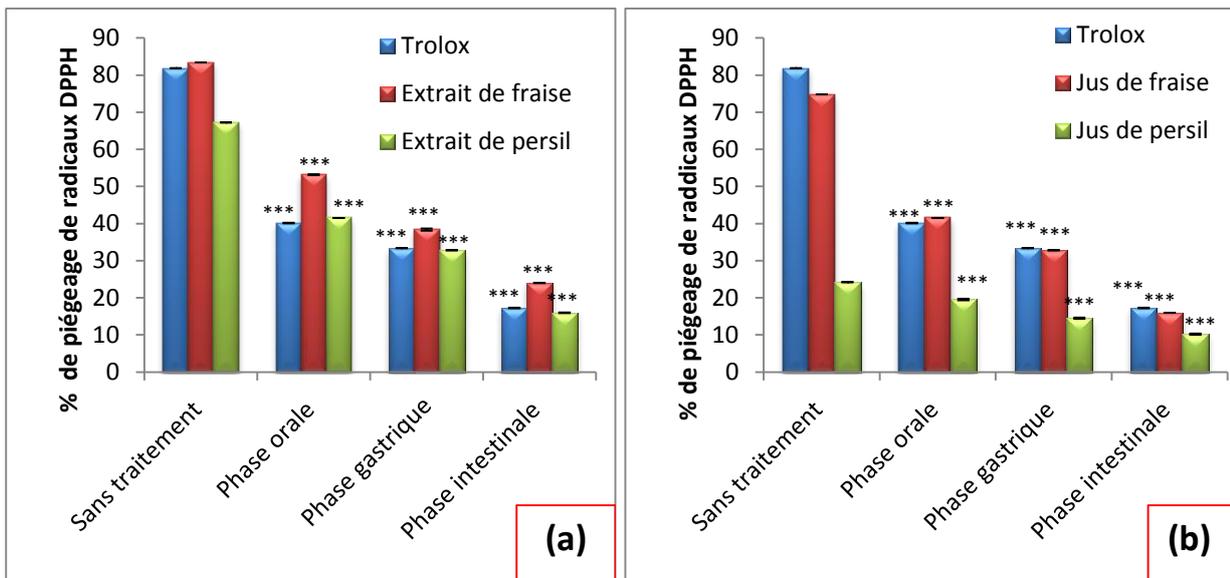


Figure 32. Pouvoir de piégeage des radicaux DPPH après la digestion bucco-gastro-intestinale. (a) : aux extraits (b) : aux jus

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

Par ailleurs le trolox utilisé comme standard à un taux de piégeage de radicaux DPPH après la phase intestinale de $17.27 \pm 0.07\%$ c'est-à-dire inférieur au pourcentage observé avec l'extrait de fraise mais supérieur à celui d'extrait de persil, ainsi que pour les de deux jus de fruit et légume.

En outre, les résultats du pouvoir réducteur des extraits et de jus après la digestion bucco-gastro intestinale sont illustrés dans la **figure 33** avec des différences hautement significatives (p<0.001).

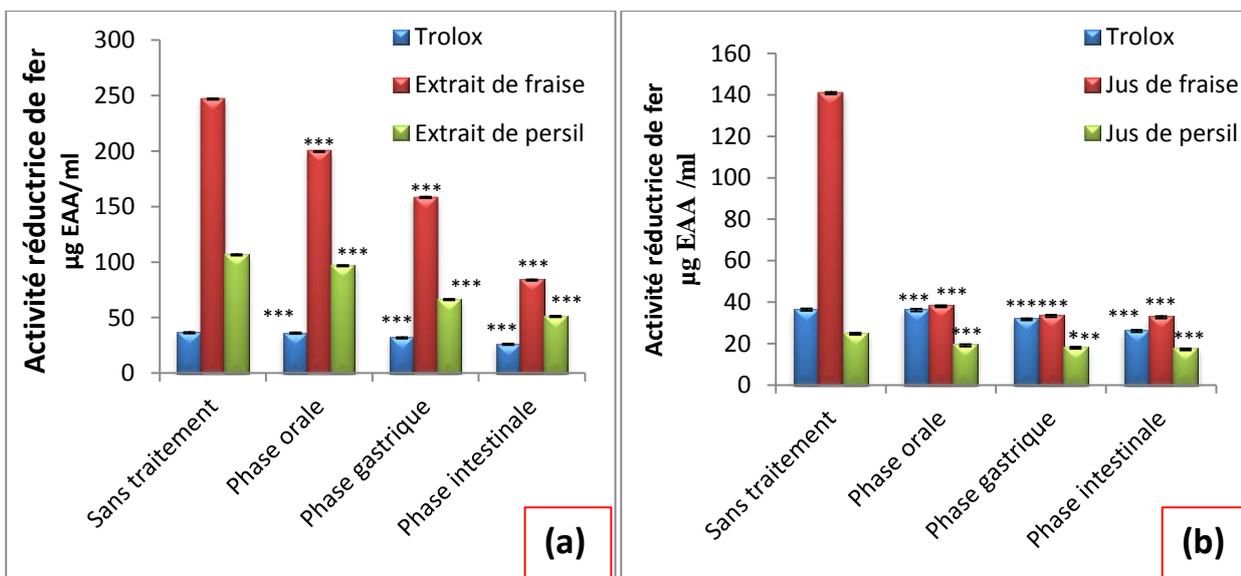


Figure33. Pouvoir réducteur après la digestion bucco-gastro-intestinale.

(a) : aux extraits (b) : aux jus

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

D'après l'histogramme mentionné dans la **figure 33**, on observe une chute brutale de cette propriété pour le jus de fraise pour atteindre une valeur de $33.18 \pm 0.01 \mu\text{g EAA/ml}$ (taux de perte est de 76.53%) dans la phase intestinale, alors que le jus de persil préserve mieux son activité réductrice avec un taux de perte de 30.10% ($17.67 \pm 0.00 \mu\text{g EAA/ml}$).

Cependant, comparativement aux jus, le pouvoir réducteur de fer des extraits est mieux préservé après le passage gastro-intestinal. Au niveau intestinale, nous constatons que l'extrait de persil a un pouvoir de $51.50 \pm 0.009 \mu\text{g EAA/ml}$ alors celui de l'extrait de fraise est de $84.19 \pm 0.02 \mu\text{g EAA/ml}$.

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que le pouvoir réducteur et anti-radicalaire des fruits et des légumes est étroitement lié aux variations quantitatives et qualitatives en composés phénoliques.

III.10. Digestion *in-vitro* en combinant bactéries /extraits, bactéries/ jus :

III.10.1. Aptitudes probiotiques de *L. plantarum* dans sa matrice:

III.10.1.1. Survie et viabilité de *L. plantarum* :

Les résultats de la viabilité de la souche en combinaison avec les extraits et les jus de fraise et de persil après chaque phase de digestion sont groupés dans la **figure 34**.

La viabilité bactérienne est améliorée en présence des jus et des extraits de fraise et de persil par rapport à la culture seule au cours de la digestion. Il apparaît que la survie en présence des jus est meilleure à celle en présence des extraits. En phase intestinale, le nombre de population cellulaire est de $34 \times 10^9 \text{ UFC/ml}$ et de $28.5 \times 10^9 \text{ UFC/ml}$ pour le jus de fraise et de persil respectivement; alors qu'un nombre de cellules de $32 \times 10^9 \text{ UFC/ml}$ est obtenu avec l'extrait de fraise et $20 \times 10^9 \text{ UFC/ml}$ avec l'extrait de persil.

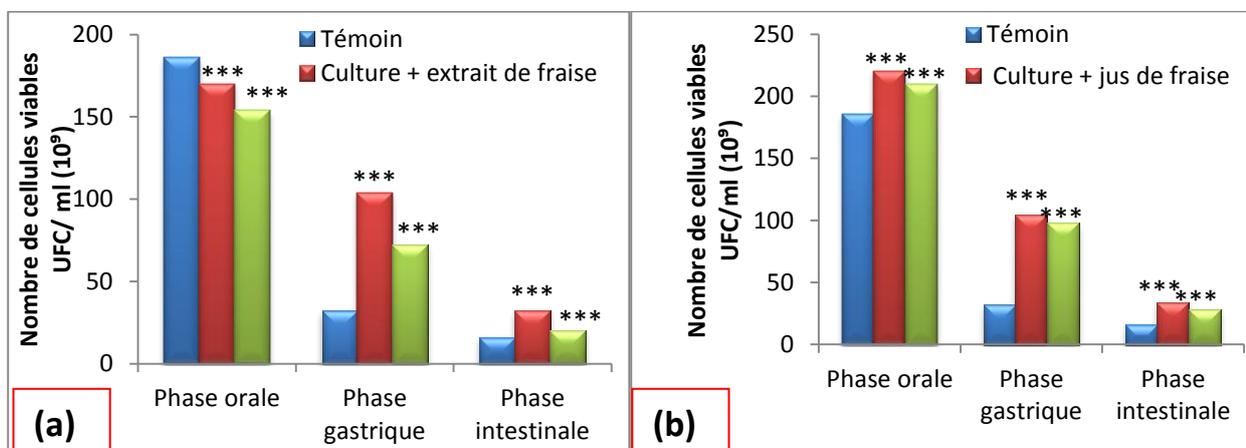


Figure 34. Nombre de cellules viables de *L. plantarum* après la digestion

(a) : combinée aux extraits (b) : combinée aux jus

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

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

Cette différence de croissance peut être due à l'effet stimulateurs des polyphénols sur la croissance des probiotiques, La plupart des études indiquent que l'effet des composés polyphénoliques dépend de la forme et le type des polyphénols et leur concentration présente dans le milieu, ainsi que la sensibilité et la susceptibilité de la souche bactérienne (**Gwiazdowska et al., 2015**).

III.10.1.2. Résistance au pH gastrique :

L. plantarum a été évalué pour sa capacité à survivre dans mes milieux aux bas pH, lorsqu'elle est véhiculée par les deux matrices végétales et leurs extraits (jus et extrait de fraise/ jus et extrait de persil). Cependant, la culture sur bouillon MRS, a été utilisée comme contrôle conventionnel.

La souche véhiculée par ces matrices végétales est exposé à la digestion bucco-gastro-intestinale. Par la suite, la phase intestinale a été récupérée afin de tester la capacité de *L. plantarum* à survivre dans les conditions hostiles acides. Les résultats de cette étude sont mentionnés dans la **figure 35** et le traitement statistique a montré des différences hautement significatives ($P < 0.001$)

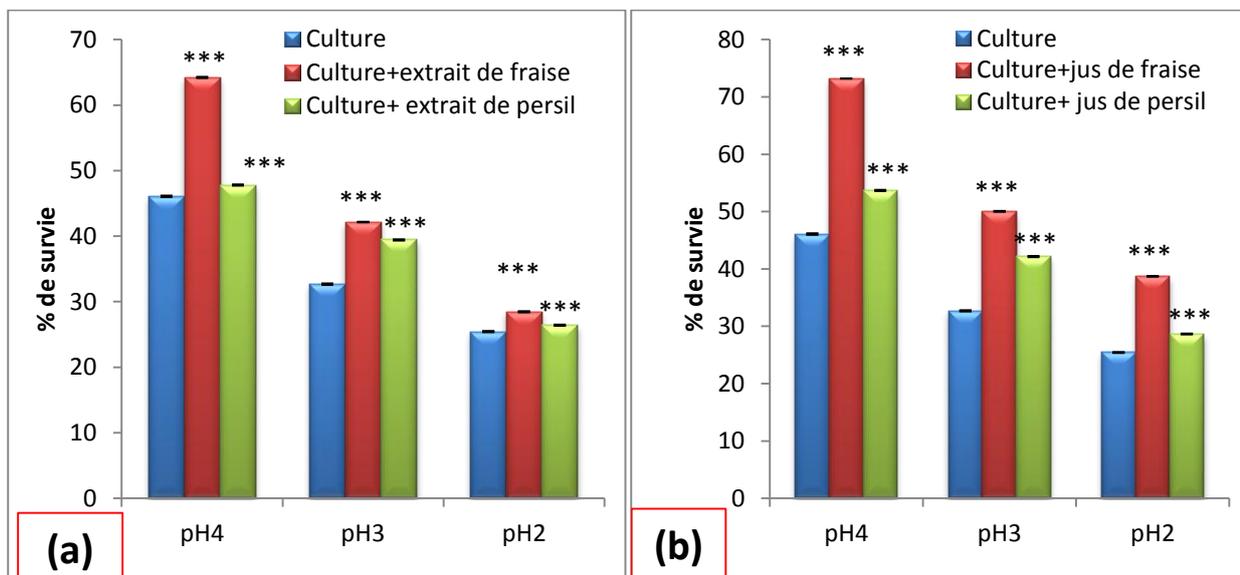


Figure 35. Survie aux bas pH de *L. plantarum* après la digestion (phase intestinale)
(a) : combinée aux extraits **(b)** : combinée aux jus.

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

D'après les résultats, nous remarquons que la survie et la viabilité de *L. plantarum* véhiculé par la matrice végétale (extrait et jus de fraise et de persil) après exposition aux bas pH pendant 2 heures est amélioré de manière hautement significative par rapport à celles de témoin (culture seule).

Le meilleur pourcentage de survie aux conditions acides est observé avec la culture en combinaison avec le jus de fraise où la survie est de $73.20 \pm 0.01\%$; $50.02 \pm 0.07\%$ et $38.64 \pm 0.04\%$ aux pH4, pH3 et pH2 respectivement. Cependant, avec le jus de persil, la viabilité était de $53.67 \pm 0.09\%$; $42.15 \pm 0.09\%$ et $28.69 \pm 0.08\%$ pour les mêmes valeurs de pH.

Dans le cas de combinaison de la culture avec les extraits végétaux, nous remarquons également qu'il y a une amélioration de la viabilité mais elle est inférieure à celle trouvée avec les jus. La viabilité de *L. plantarum* véhiculée par l'extrait de fraise est mieux que celle avec l'extrait de persil où le pourcentage de survie de la culture avec l'extrait de fraise était de $64.21 \pm 0.09\%$; $42.16 \pm 0.05\%$ et $28.46 \pm 0.10\%$ dans les milieux aux pH 4, pH 3 et pH 2 respectivement.

Par ailleurs, la combinaison de la culture avec l'extrait de persil démontre le plus faible pourcentage de survie par rapport aux autres combinaisons dont des pourcentages de $47.79 \pm 0.10\%$; $39.44 \pm 0.10\%$ et $26.4 \pm 0.09\%$ ont été enregistrés avec pH 4, pH 3 et pH 2 respectivement.

Les extraits et les jus de fraise et de persil exercent un effet protecteur de *L. plantarum* dans des conditions acides, le phénomène pourrait être principalement attribué à la présence de sucres dans les jus et leurs extraits. Dans une étude similaire, **Corcoran et al. (2005)**, ont démontré que la présence de glucose améliore la viabilité des probiotiques en cas d'exposition à des solutions à faible pH, ainsi les données ont indiqué que le glucose fournit l'ATP à la F0F1-ATPase via la glycolyse, ce qui permet l'exclusion des protons et améliore ainsi la survie pendant le transit gastrique. De même, **Aboufazli et Baba (2015)**, ont signalé que les matrices végétales pourraient améliorer la viabilité des probiotiques pendant le passage stomacale.

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

III.10.1.3. Résistance aux sels biliars :

Les résultats de la résistance de *L. plantarum* aux sels biliars véhiculés par les matrices végétales après la digestion bucco-gastro-intestinale sont illustrés dans la **figure 36**.

D'après l'histogramme, on observe que le pourcentage de survie de la souche après l'exposition à 0.3% de sels biliars durant 4 heures est amélioré de manière hautement significative ($p < 0.001$) comparativement au témoin. Il est clair que la culture combinée aux jus présente une meilleure survie par rapport à la culture combinée aux extraits dont le pourcentage de survie de *L. plantarum* véhiculé par le jus de fraise est de $78.42 \pm 0.01\%$ alors que dans le cas de jus de persil, il est de $74.97 \pm 0.05\%$. En outre, la présence de la souche dans l'extrait donne un taux de survie de $72.73 \pm 0.05\%$ et $69.42 \pm 0.03\%$ pour l'extrait de fraise et celui du persil respectivement.

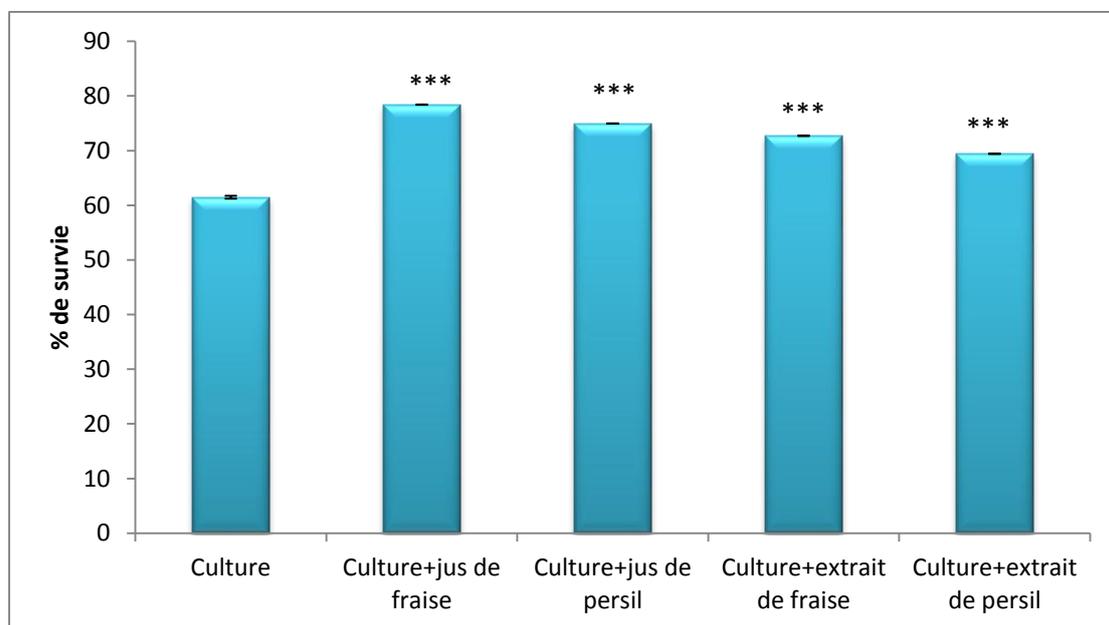


Figure 36. Survie en présence de 0.3% de sels biliars de *L. plantarum* combinée aux matrices après la digestion (phase intestinale).

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

En comparant les résultats de l'expérience, on peut noter clairement que la matrice végétale peut également empêcher les bactéries de s'exposer à la bile et donc d'augmenter la résistance de la souche à l'agressivité de la bile.

III.10.1.4. Capacité d'auto-agrégation :

La capacité d'auto-agrégation de la souche en présence de la matrice végétale est illustrée dans la **figure 37**. D'après les résultats obtenus, l'effet matrice a donné des différences hautement significatives ($p < 0.001$) avec une amélioration de l'auto-agrégation lorsque la souche est combinée aux jus et leurs extraits.

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

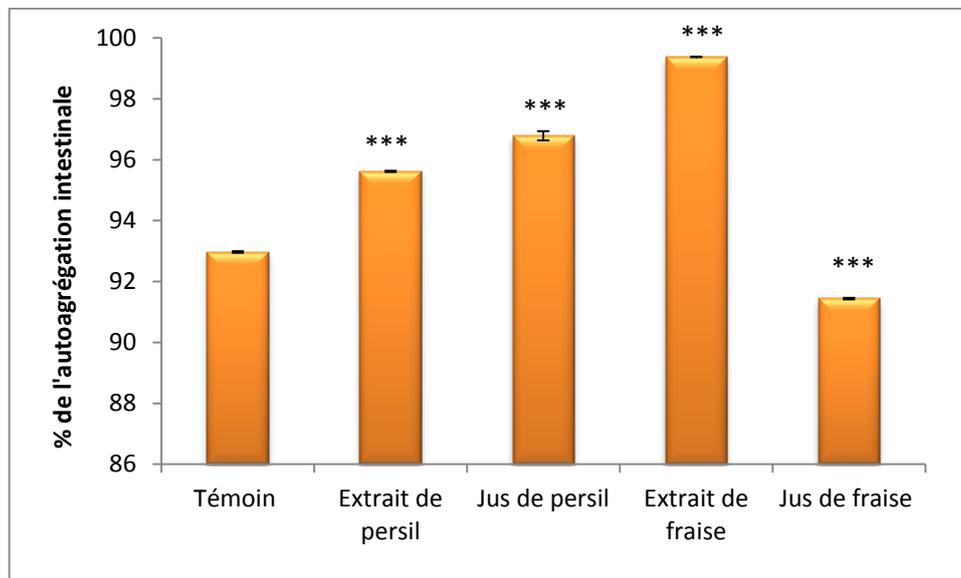


Figure37. Capacité d'auto-agrégation de *L. plantarum* en présence de matrice végétale (Niveau intestinal).

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

III.10.1.5. Hydrophobicité :

L'hydrophobicité de la souche a été étudiée en présence de matrices végétales et les résultats sont mentionnés dans la **figure 38**.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'hydrophobicité en présence des jus et leurs extraits est aussi meilleure que celle du témoin, cependant elle est relativement variable d'un solvant à l'autre et elle varie entre $75.17 \pm 0.05\%$ et $90.97 \pm 0.02\%$. *L. plantarum* représente une forte affinité pour l'éthyle acétate. Le taux d'hydrophobicité augmente de manière significative pour certains solvants tels que le toluène pour tous les échantillons ($p < 0.001$) et le xylène dans les jus de fraise et de persil par rapport au témoin. En revanche avec le xylène (extrait de persil) aucune différence significative n'a été trouvée ($p > 0.05$).

Une étude menée par **Khalil (2010)** a montré que les cellules adaptées à l'acide gallique sont plus hydrophobes pour tous les solvants testés et présentaient la plus forte affinité pour le xylène ($65 \pm 7.6\%$), cela peut être dû à la production d'une quantité plus élevée d'exopolysaccharides capsulaires.

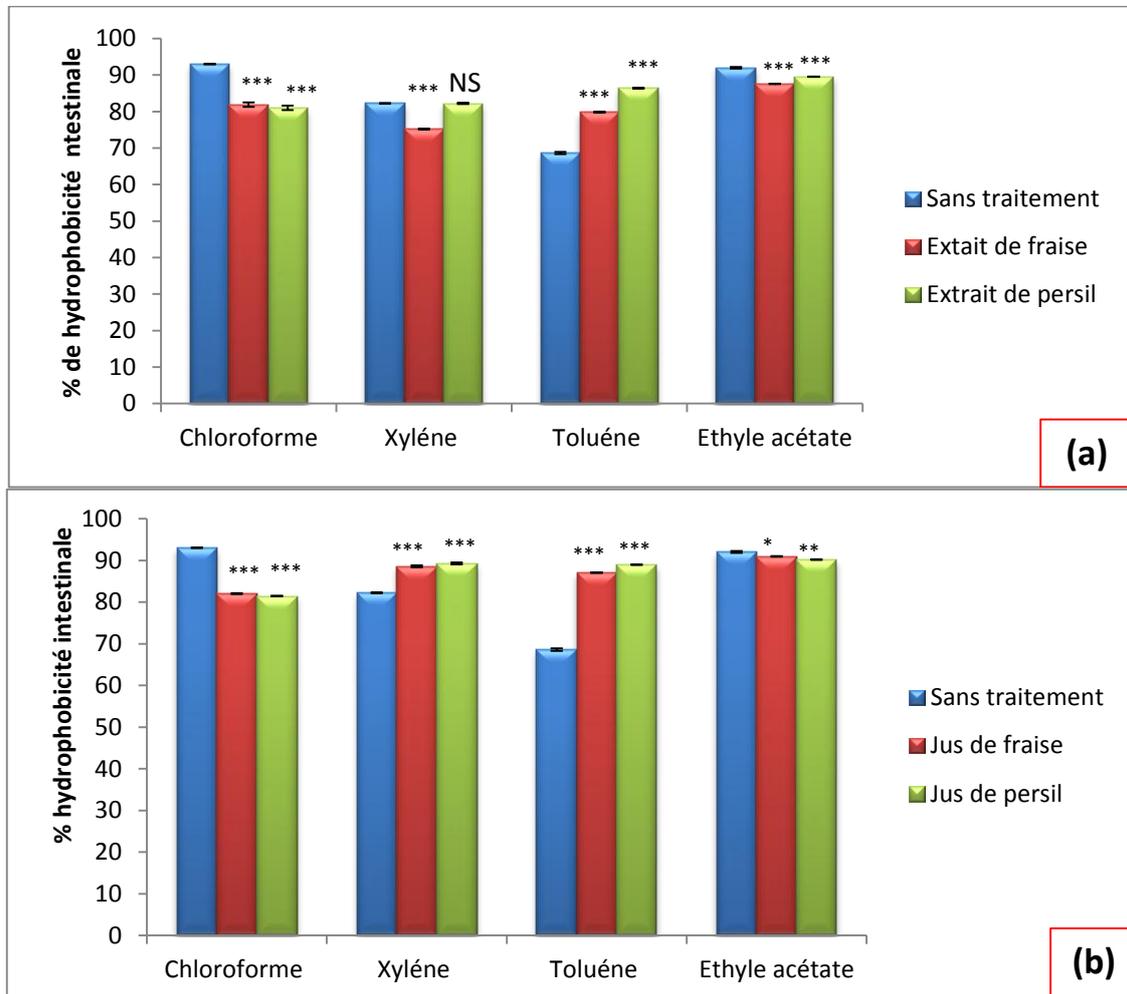


Figure 38. Pourcentage d'hydrophobicité intestinale de *L. plantarum*.

(a) : combinée aux extraits (b) : combinée aux jus

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

III.10.2. Activité antioxydante de *L. plantarum* en combinaison avec les matrices:

III.10.2.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène :

Les résultats de la capacité de *L. plantarum* en présence de matrices végétales (extrait et jus de fraise et de persil) à résister au peroxyde d'hydrogène après la digestion bucco-gastro-intestinale (phase intestinale) sont regroupés dans la **figure 39**.

D'après les résultats, nous observons que la capacité de *L. plantarum* à résister au peroxyde d'hydrogène est améliorée en présence de la matrice végétale, la fraise aussi bien que le persil sachant que la meilleure résistance est observée dans le cas de combinaisons de la culture avec les jus. Les différences sont statistiquement différentes ($p < 0.001$), avec une survie de la souche en présence des jus et des extraits de fraise et de persil supérieure à 60%, dans le cas de la présence d' H_2O_2 à une concentration 1.0mM.

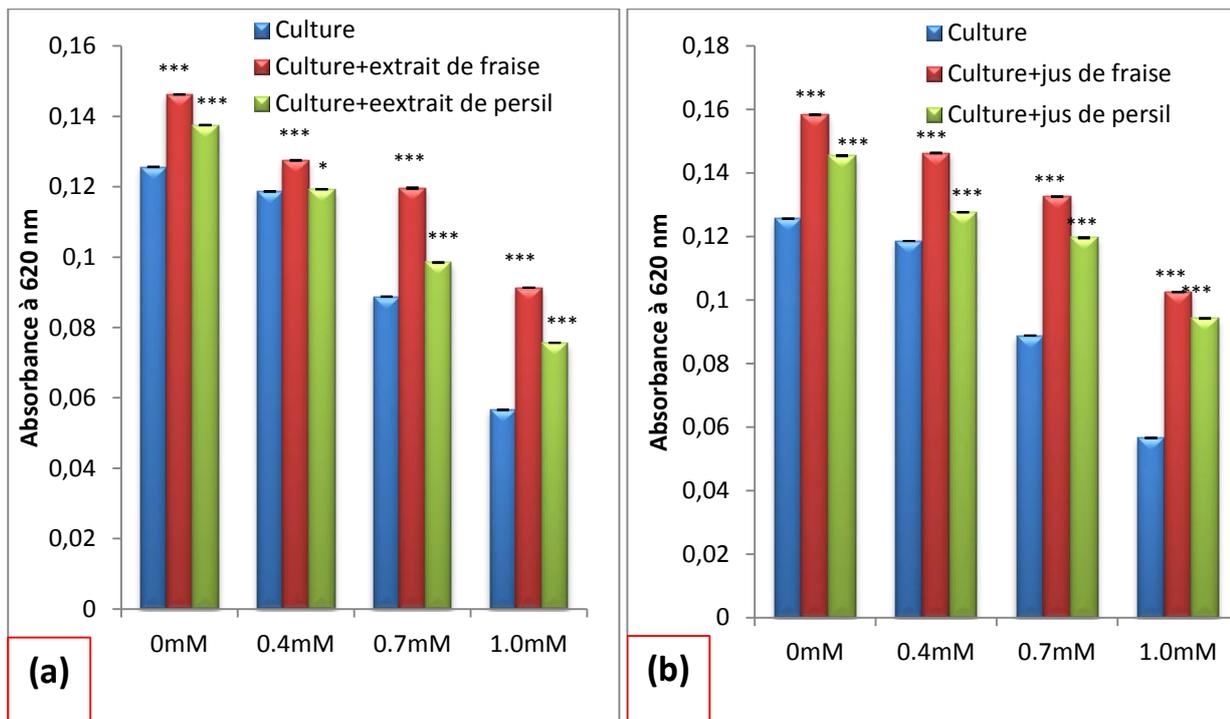


Figure 39. Capacité de *L. plantarum* à résister au peroxyde d'hydrogène au niveau intestinal. (a) : combinée aux extraits (b) : combinée aux jus

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

III.10.2.2. Piégeage de radical DPPH :

L'activité anti-radicalaire de *L. plantarum* en présence des extraits et de jus est illustrée dans la **figure 40**. D'après les résultats obtenus, nous constatons que la capacité de piégeage des radicaux libres de DPPH par la souche est plus améliorée en présence des matrices végétales (extrait et jus de fraise et de persil), par rapport au témoin et au cours des trois phases de digestion (orale ; gastrique ; intestinale), les différences entre le témoin et la souche combinée avec l'extrait et le jus de persil en phase de digestion intestinale sont significatives ($p < 0.05$), alors qu'elles sont très significatives ($p < 0.01$) entre le témoin et la souche combinée avec le jus et l'extrait de fraise.

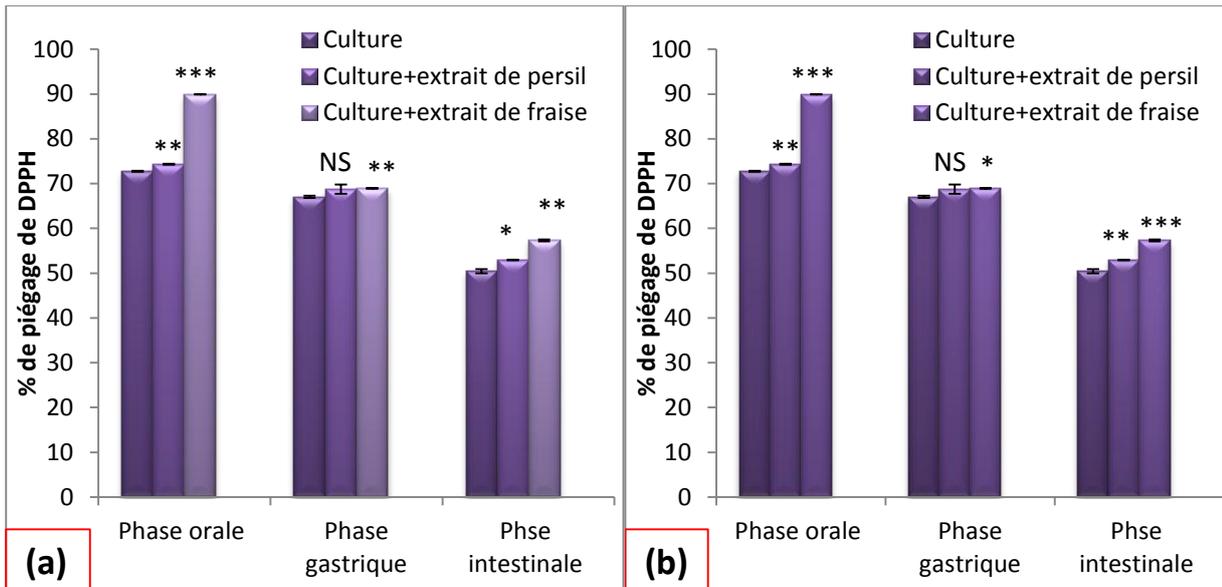


Figure 40. Piégeage de radicaux DPPH par *L. plantarum* lors de digestion.

(a) : combinée aux extraits (b) : combinée aux jus

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

III.10.2.3. Piégeage du radical hydroxyle :

Les résultats de la capacité de *L. plantarum* à piéger les radicaux hydroxyles après la digestion bucco-gastro-intestinale en présence de matrices végétales (extrait et jus de fraise et de persil) sont regroupés dans la **figure 41**.

Il est remarquable que la souche a une capacité à piéger les radicaux hydroxyles en présence des matrices végétales (extrait et jus de fraise et de persil), plus élevée à celle du témoin au cours des trois phases avec des différences hautement significatives ($p < 0.001$). Au niveau de l'étage intestinal, la capacité de piégeage des radicaux hydroxyles en présence de jus et d'extrait de fraise est plus élevée par rapport au persil et au témoin estimé à $43.44 \pm 0.01\%$ et $38.61 \pm 0.006\%$ respectivement.

Donc, cette augmentation de l'activité antioxydante de la souche comme déjà interpréter précédemment peut être due à l'augmentation du nombre cellulaire ou le métabolisme bactérien des composés phénoliques permet de générer des molécules hautement antioxydants.

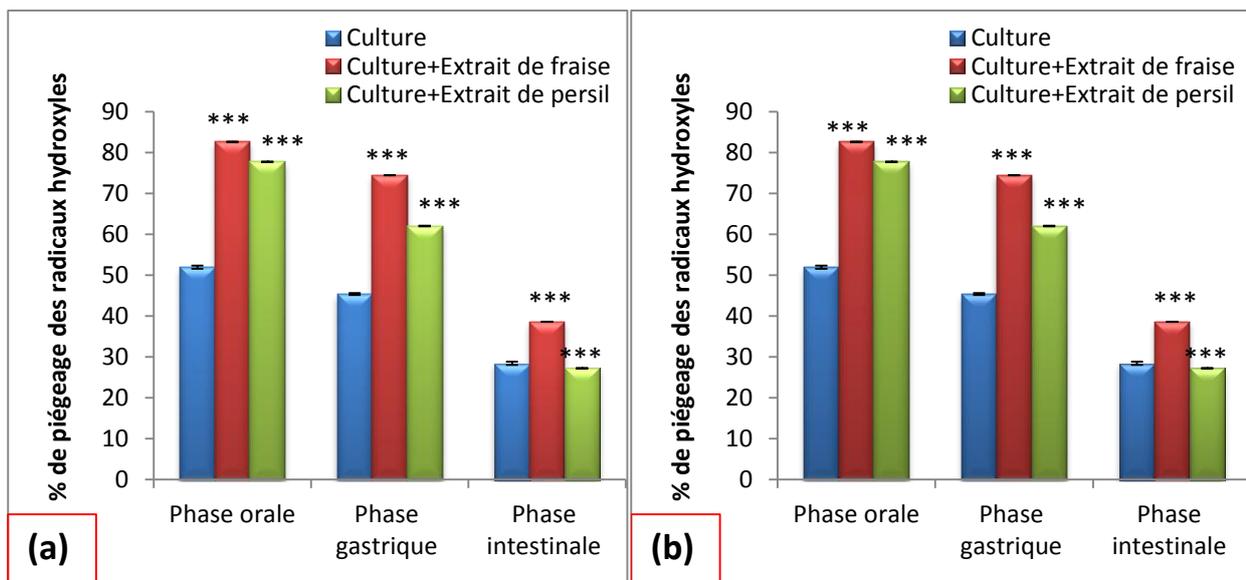


Figure 41. Piégeage des radicaux hydroxyles par *L.plantarum* combinée avec la matrice végétale lors de la digestion.

(a) : combinée aux extraits (b) : combinée aux jus

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

En outre, cette activité peut être due aux composés phénoliques eux-mêmes. Une étude menée par **Rahman et al. (2018)** a montré que les extraits de jus de fraise présentait un niveau élevé de capacité de piégeage des radicaux libre et cela est lié à sa richesse en composés phénoliques qui peuvent avoir des effets antioxydants contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) hydroxyle ($\cdot OH$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

III.11. Biodisponibilité des polyphénols et flavonoïdes après la combinaison de *L. plantarum* avec les matrices végétales (extrait / jus) lors de la digestion:

Les résultats des dosages après les phases de digestion lors de la combinaison *L. plantarum* - extraits et *L. plantarum* -jus sont illustrés dans la **figure 42**.

Il apparaît que la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes a diminué d'une manière hautement significatives ($p < 0.001$), que cette diminution est plus importante comparativement à celle obtenue lors des dosages après digestion des extraits et de jus seule, cela confirme qu'il y a une dégradation de ces composés par la souche bactérienne.

L'analyse des histogrammes de la digestion montre une perte en polyphénols et en flavonoïdes avec les quatre combinaisons extrait de fraise/ *L. plantarum*, extrait de persil/*L. plantarum*, jus de fraise / *L. plantarum* et jus de persil /*L. plantarum*. Par ailleurs, nous observons, que la souche *L. plantarum* utilise beaucoup plus les polyphénols dans le jus de fraise comparativement aux autres combinaisons.

Nos résultats, rejoignent ceux de **Gwiazdowska et al. (2015)**, qui ont démontré que les composés phénoliques représentent des prébiotiques pour les bactéries et que l'incubation des composés phénoliques avec les souches *L. rhamnosus* GG et *L. acidophilus* a permis de maintenir leurs survie et viabilité.

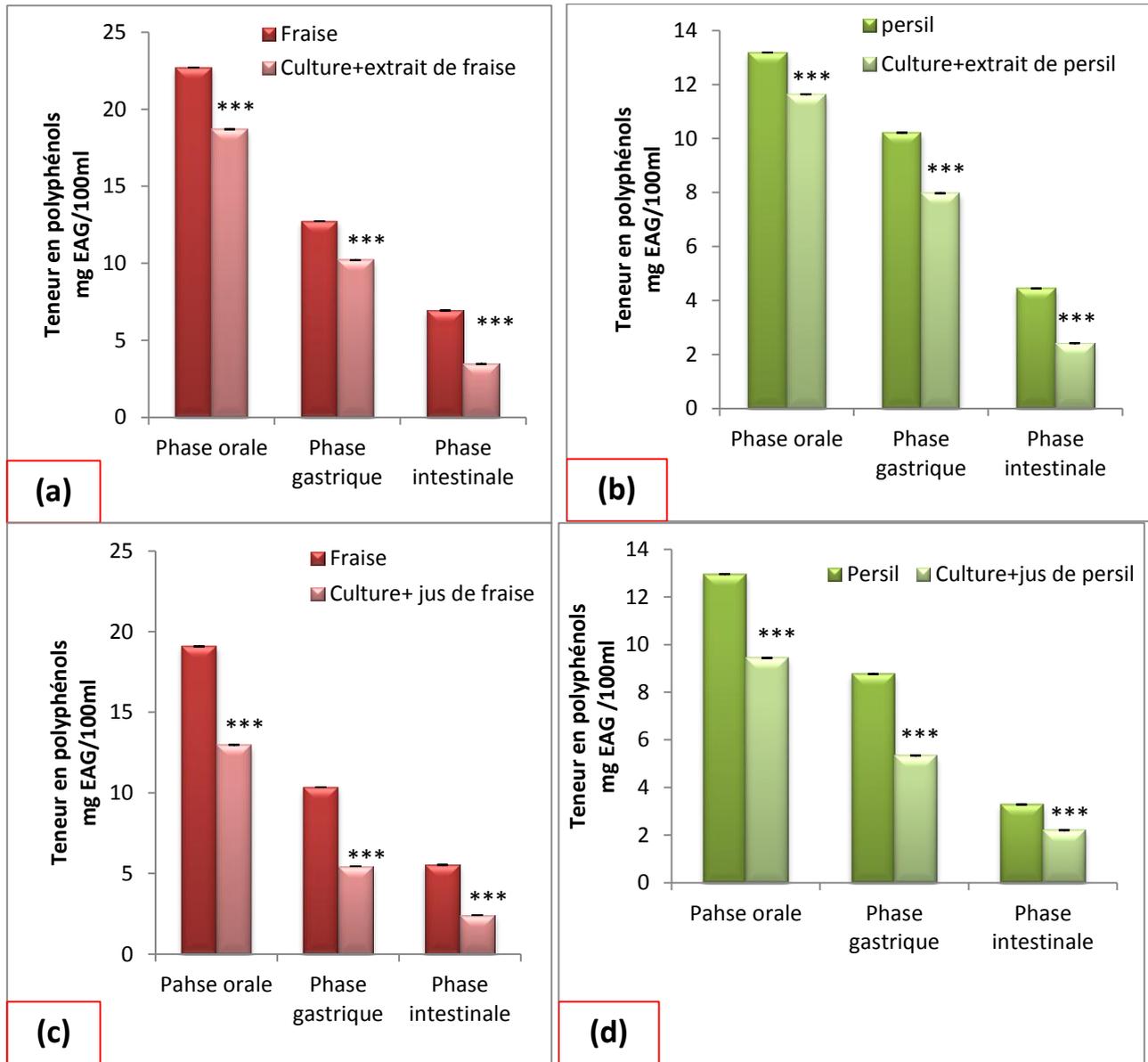


Figure 42. Effet de la digestion *in vitro* sur la teneur en polyphénols en présence de *L. plantarum*.

(a) : *L. plantarum* + extrait de persil (b) : *L. plantarum* + extrait de fraise

(c) : *L. plantarum* + jus de fraise (d) : *L. plantarum* + jus de persil

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

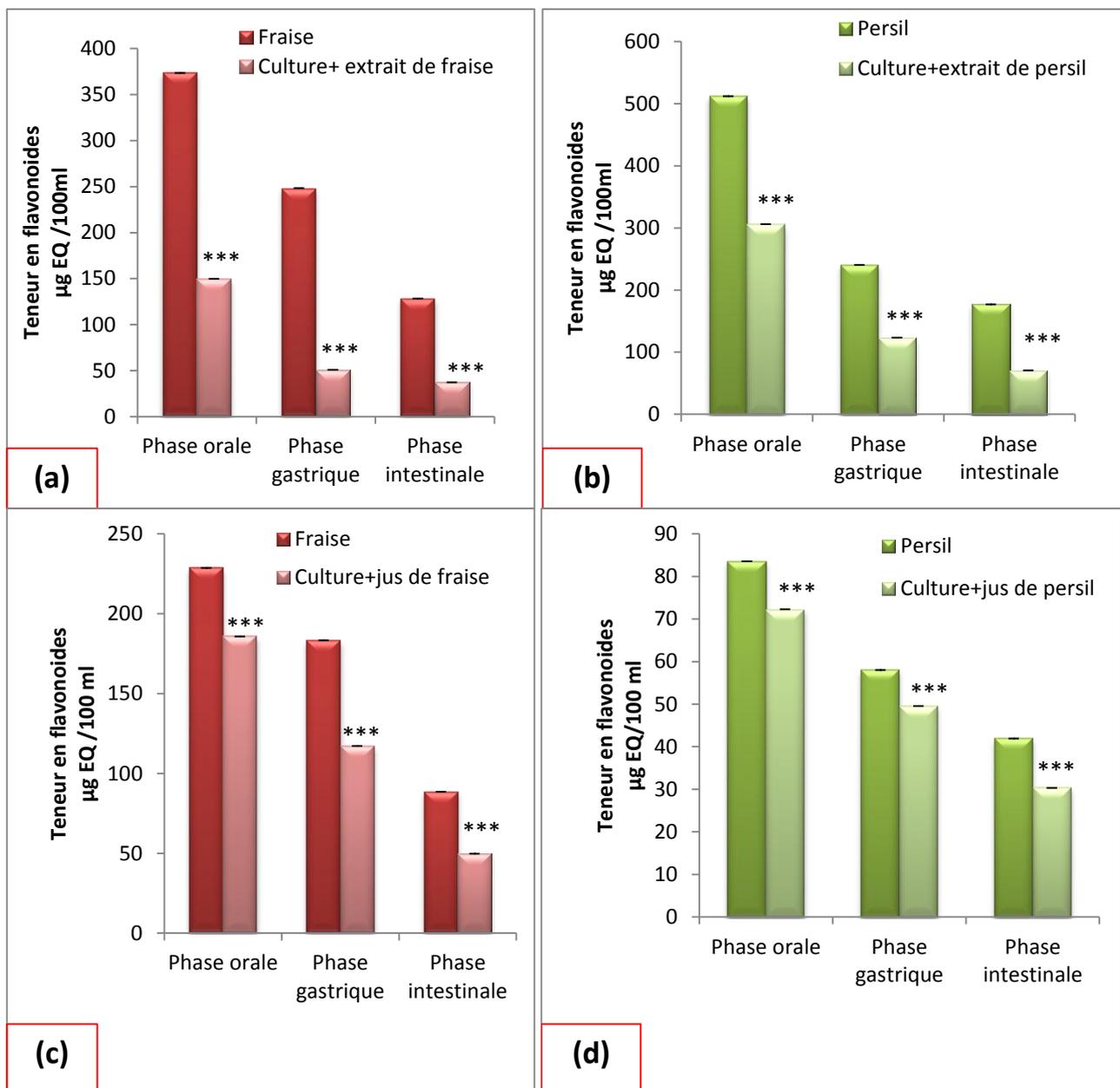


Figure 43. Effet de la digestion *in vitro* sur la teneur en flavonoïdes en présence de *L. plantarum*.

(a) : *L. plantarum*+ extrait de persil (b) : *L. plantarum* + extrait de fraise

(c) : *L. plantarum* + jus de fraise (d) : *L. plantarum* + jus de persil

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

III.12. Montage de digestion bucco-gastro-intestinale :

Au cours de la digestion, des phénomènes chimiques, enzymatiques et mécaniques se produisent simultanément dont dépend la physiologie digestive. L'étude de la digestion nécessite de recourir à des modèles *in vitro* ou *in vivo* plus développés (Menard et Dapont, 2014).

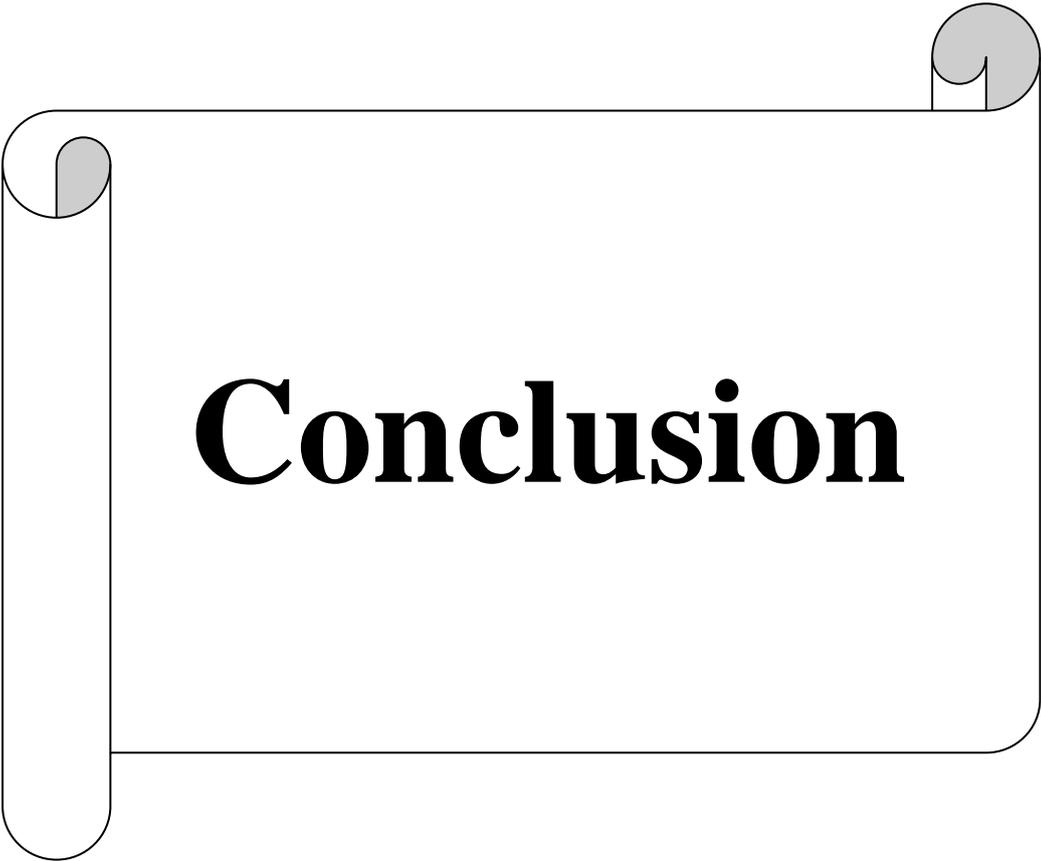
Les résultats illustrés dans le tableau ci-dessous ; représentent la différence entre les deux expériences *in vitro* , la première considérée comme témoin a été réalisée dans des tubes et des flacons stériles ou la phase buccale, gastrique et intestinale forment des compartiments séparés, et l'incubation est faite dans l'agitateur incubateur (**Memmert**), en revanche, la deuxième expérience a été menée dans des conditions semi- similaires à celles du tractus gastro-intestinal. A cet effet un système multi compartimentés a été développé afin de simuler chaque étape de la digestion et les temps de transit associés. Après le temps requis pour les deux expériences, le contenu a été récupéré à partir de la phase intestinale et soumis aux trois tests (Nombre de cellules (UFC/ml) ; capacité de piégeage de radicaux hydroxyles et de radicaux libres).

Tableau 7. Les différents tests réalisés après le montage digestifs

	Nombre de cellules (UFC/ml)	piégeage de radicaux hydroxyles (%)	piégeage des radicaux libres DPPH (%)
Témoin	$16 \times 10^9 \pm 0.00$	28.46 ± 0.36	50.42 ± 0.48
Montage	$28 \times 10^9 \pm 0.00$	52.00 ± 0.38	72.76 ± 0.10
Témoin : culture en tubes à essai			

Les résultats montrent que le nombre de cellules compté dans le contenant intestinal de montage est plus élevé par rapport à celui du témoin, ainsi que la capacité à piéger les radicaux hydroxyles et les radicaux libres estimés à 52.00 ± 0.38 % et 72.76 ± 0.10 % étaient relativement supérieure à celles de témoin. On peut déduire que la relation entre le nombre de cellules et l'activité antioxydante est proportionnelles si le nombre de cellules augmente la capacité de piégeage des oxydants radicalaires augmente.

Pour justifier cette différence pour laquelle le montage *in vitro* a permis de mimer les conditions digestives et de modéliser les paramètres essentiels de la digestion, nous pouvons cités les avantages de ce montage : la forme (**photo1**) , la température du corps (37°C), pH adapté pour les trois phases, chaque compartiment contient son liquide équivalent, le péristaltisme qui est assuré par un temps bien défini (le déplacement de la souche d'une phase à l'autre dans des conditions appropriés avec une agitation mécanique).



Conclusion

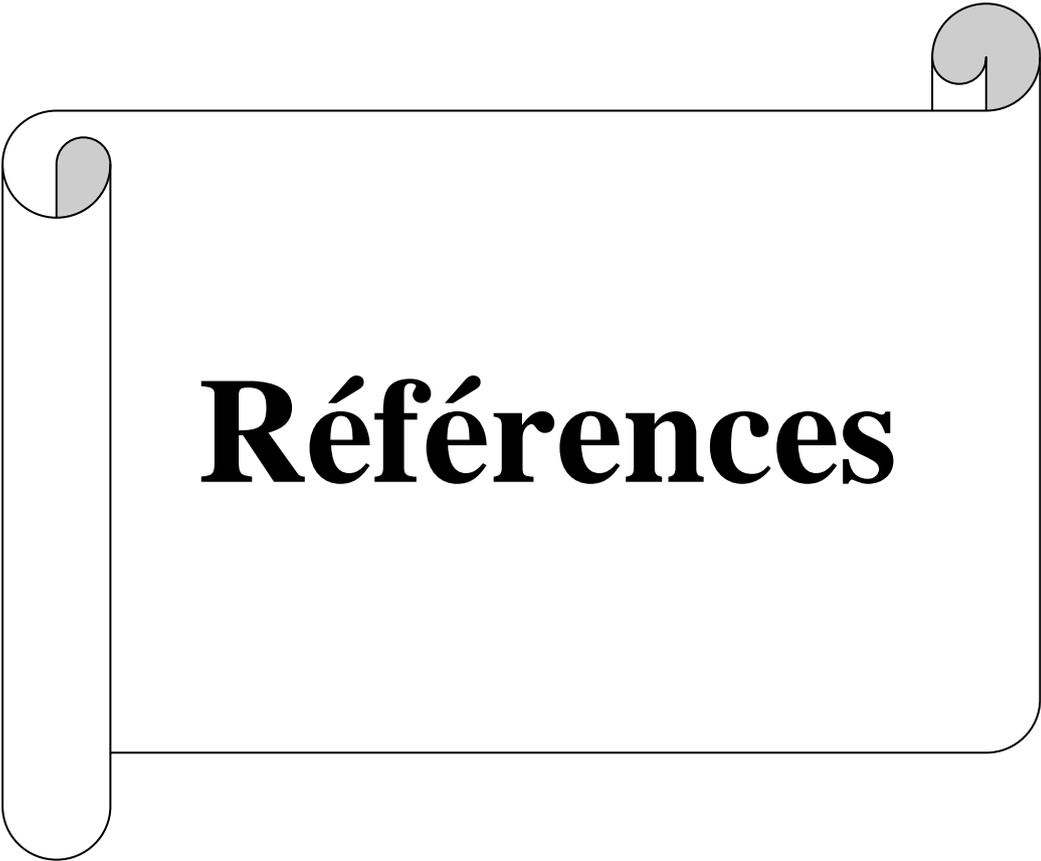
Les résultats des différentes parties de la présente étude ont montré que *L. plantarum* S10 peut résister aux conditions de digestion bucco-gastro-intestinale. Cette dernière a montré une tolérance remarquable vis-à-vis des conditions hostiles à savoir l'acidité, les sels biliaires, les enzymes digestifs. De même, notre bactérie a la particularité de co-agrégier avec les souches pathogènes, auto-agrégier et adhérer aux cellules épithéliales. De même, notre souche, a montré une bonne résistance au peroxyde d'hydrogène, une capacité de piégeage des radicaux hydroxyles ainsi que les radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

En raison de la teneur en éléments nutritifs adéquates, les deux matrices végétales (fraise et persil) ont amélioré la survie de la souche *L. plantarum* S10 après 24 heures de la fermentation ainsi que son pouvoir antioxydant, sachant que la survie est plus améliorée et plus appréciée avec le jus de fraise.

La combinaison bactérie-extraits (fraise-persil) et bactérie-jus (fraise-persil) et le passage dans le liquide simulant la digestion bucco-gastro-intestinale a montré une bonne survie avec une perte des composés phénoliques d'un étage à l'autre, ce qui confirme l'utilisation des polyphénols et des flavonoïdes par les bactéries comme stimulateurs de croissance. L'incorporation de la bactérie dans une matrice végétale a permis l'amélioration du statut probiotique de *L. plantarum* ainsi que son pouvoir antioxydant.

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives pour compléter ce travail, 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 ;
- Le développement des aliments fonctionnel tels que les jus fermentés par les probiotiques pour lutter contre les maladies induites par les radicaux libres.



Références

A

- **Aboufazli, F., & Baba, A. S. (2015).** Effect of vegetable milk on survival of probiotics in fermented ice cream under gastrointestinal conditions. *Food Science and Technology Research, 21*(3), 391-397.
- **Adour, K., Dabouz, S., & Benachour, K. E. (2016).** Evaluation des aptitudes probiotiques des lactobacilles isolés du beurre et du L'ben. Mémoire de Master. Université de Bejaia
- **Adriouch, S., Kesse-Guyot, E., Hercberg, S., Touvier, M., & Fezeu, L. K. (2017).** Association entre les apports en polyphénols et le risque de maladies cardiovasculaires: résultats d'une étude prospective sur 84 000 adultes français. *Nutrition Clinique et Métabolisme, 31*(3), 238-240.
- **Alegre, E. I. (2009).** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de Doctoral dissertation, Université de Strasbourg. pp.75-80.
- **Ali-Rachedi, F., Meraghni, S., Touaibia, N., & Mesbah, S. (2018).** Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea sub. Maritima L.* *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, (87)*, 13-21.
- **Al-Nabulsi, A. A., Awaisheh, S. S., Ibrahim, A. S., Hayek, A. S., & El-Qudah, M. J. (2014).** Health Benefits of Symbiotic Functional Food Products. *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*,(22), 395-403.
- **Al-Seeni, M. N., El Rabey, H. A., Al-Ghamdi, H., Al-Sieni, A. I., Sakran, M. I., & Mohammed, G. M. (2018).** Assessment of the antioxidant activity of parsley and carob in hypercholesterolemic male rats. *Biomedical Research, 29*(17), 3370-3377.
- **Al-Tawaha, R., & Meng, C. (2018).** Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: a review. *Advances in Environmental Biology, 12*(1), 16-27.
- **Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Ares, I., & Martínez, M. A. (2016).** Prebiotics: safety and toxicity considerations. *Nutraceuticals*. Academic Press. pp. 757-775.
- **Anandharaj, M., Sivasankari, B., Santhanakaruppu, R., Manimaran, M., Rani, R. P., & Sivakumar, S. (2015).** Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus*

and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. *Research in Microbiology*, 166(5), 428-439.

- **Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Ilavenil, S., Choi, K. C., & Srigopalram, S. (2016).** *In vitro* importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1), 6-10.
- **Ariza, M. T., Reboredo-Rodríguez, P., Cervantes, L., Soria, C., Martínez-Ferri, E., González-Barreiro, C., & Simal-Gándara, J. (2018).** Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. *Food chemistry*, 248, 155-165.

B

- **Baillif, S., Hartmann, D., Freney, J., & Kodjikian, L. (2010).** Implant intraoculaire et adhésion bactérienne: influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 33(3), 210-221.
- **Basu, A., Nguyen, A., Betts, N. M., & Lyons, T. J. (2014).** Strawberry as a functional food: an evidence-based review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(6), 790-806.
- **Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M., & Raffatellu, M. (2013).** Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(3), 1-16.
- **Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006).** Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729-38.
- **Bengoa, A. A., Zavala, L., Carasi, P., Trejo, S. A., Bronsoms, S., de los Ángeles Serradell, M., & Abraham, A. G. (2018).** Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Research International*, 103, 462-467.
- **Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014).** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364-371.
- **Boudouhi R., Ferreira C., Morel E., Szymanski A., Tizaoui S. (2005).** **Aliments fonctionnels : «réalité et/ou allégation »**, Université Lille 1 Sciences et Technologies. p 202.

- **Bouridane, H., Sifour, M., Idoui, T., Annick, L., & Thonard, P. (2016).** Technological and probiotic traits of the lactobacilli isolated from vaginal tract of the healthy women for probiotic use. *Iranian Journal of Biotechnology*, 14(3), 192-201.
- **Bove, P., Russo, P., Capozzi, V., Gallone, A., Spano, G., & Fiocco, D. (2013).** *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiological Research*, 168(6), 351-359.
- **Breidt, Jr, F., & Caldwell, J. M. (2011).** Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in cucumber fermentation brines. *Journal of food science*, 76(3), 198-203.

C

- **Cao, P., Wu, L., Wu, Z., Pan, D., Zeng, X., Guo, Y., & Lian, L. (2019).** Effects of oligosaccharides on the fermentation properties of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Science*, 102, 1-10.
- **China, R., Mukherjee, S., Sen, S., Bose, S., Datta, S., Koley, H., & Dhar, P. (2012).** Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiological research*, 167(8), 500-506.
- **Číž, M., Čížová, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A., & Lojek, A. (2010).** Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, 21(4), 518-523.
- **Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008).** Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1065-1073.
- **Collado, M. C., Surono, I., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007).** Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. *Journal of Food Science*, 72(3), 89-93.
- **Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2005).** Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied Environmental Microbiology*, 71(6), 3060-3067.

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

D

- **Dadan, M., Rybak, K., Wiktor, A., Nowacka, M., Zubernik, J., & Witrowa-Rajchert, D. (2018).** Selected chemical composition changes in microwave-convective dried parsley leaves affected by ultrasound and steaming pre-treatments—An optimization approach. *Food Chemistry*, 239, 242-251.
- **Das, D., & Goyal, A. (2015).** Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim. *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 263-268.
- **De Montijo-Prieto, S., Castro, D. J., Reina, J. C., Jimenez-Valera, M., & Ruiz-Bravo, A. (2019).** Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* C4 (CECT 9567), a potential probiotic strain isolated from kefir. *Archives of Microbiology*, 201(3), 409-414.
- **Dianawati, D., Mishra, V., & Shah, N. P. (2016).** Viability, acid and bile tolerance of spray dried probiotic bacteria and some commercial probiotic supplement products kept at room temperature. *Journal of Food Science*, 81(6), 1472- 1479.
- **Dias, F. S., Duarte, W. F., & Schwan, R. F. (2013).** Evaluation of adhesive properties of presumptive probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Bioscience Journal*, 29(5), 1678-1686.
- **Dinev, T., Beev, G., Tzanova, M., Denev, S., Dermendzhieva, D., & Stoyanova, A. (2018).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic and food spoilage microorganisms: a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 21(3), 253-268.
- **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660.
- **Dufour, C., Loonis, M., Delosière, M., Buffière, C., Hafnaoui, N., Santé-Lhoutellier, V., & Rémond, D. (2018).** The matrix of fruit & vegetables modulates the gastrointestinal bioaccessibility of polyphenols and their impact on dietary protein digestibility. *Food chemistry*, 240, 314-322.

E

- **Ekmekçi, H. A. V. V. A., Aslim, B., & Darilmaz, D. O. (2009).** Some factors affecting the autoaggregation ability of vaginal lactobacilli isolated from Turkish women. *Archive Biology and Science*, 61, 407-412.
- **Endo, H., Niioka, M., Kobayashi, N., Tanaka, M., & Watanabe, T. (2013).** Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: new insight into the probiotics for the gut-liver axis. *Public Library of Science One*, 8(5), 63388-6341.
- **Erlank, H., Elmann, A., Kohen, R., & Kanner, J. (2011).** Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(12), 2319-2327.

F

- **Farah, H., Elbadrawy, E., & Al-Atoom, A. A. (2015).** Evaluation of anti-oxidant and antimicrobial activities of ethanolic extracts of parsley (*Petroselinum crispum*) and coriander (*Coriandrum sativum*) plants grown in Saudi Arabia. *International Journal of Advanced Research*, 3(4), 1244-1255.
- **Filannino, P., Cardinali, G., Rizzello, C. G., Buchin, S., De Angelis, M., Gobbetti, M., & Di Cagno, R. (2014).** Metabolic responses of *Lactobacillus plantarum* strains during fermentation and storage of vegetable and fruit juices. *Applied Environment and Microbiol*, 80(7), 2206-2215.

G

- **Gharbi, Y., Fhoula, I., Ruas-Matiedo, P., Najjari, A., Boudabous, A., Gueimonde, M., & Ouzari, H. I. (2019).** In-vitro characterization of potentially probiotic *Lactobacillus* strains isolated from human microbiota: interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line HT29. *Annals of Microbiology*, 69(1), 61-72.
- **Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselsela, H., & Oueld-Mokhtar, S. M. (2015).** Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13(2), 118-129.
- **Gheziel, C., Russo, P., Arena, M. P., Spano, G., Ouzari, H. I., Kheroua, O., & Capozzi, V. (2019).** Evaluating the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains from Algerian infant feces: towards the design of probiotic starter cultures tailored for developing countries. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(1), 113-123.

- **Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012).** The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28(1), 9-19.
- **Gogineni, V. K., Morrow, L. E., Gregory, P. J., & Malesker, M. A. (2013).** Probiotics: history and evolution. *Journal of Ancient Diseases and Preventive Remedies*, 1(2), 1-7.
- **Guo, X. H., Kim, J. M., Nam, H. M., Park, S. Y., & Kim, J. M. (2010).** Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 16(4), 321-326.
- **Grajek, W., Olejnik, A., & Sip, A. (2005).** Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochimica Polonica*, 52(3), 665-671.
- **Gwiazdowska, D., Juś, K., Jasnowska-Malecka, J., & Kluczyńska, K. (2015).** The impact of polyphenols on *Bifidobacterium* growth. *Acta Biochimica Polonica*, 62(4), 895-901.

H

- **Hamia, C., Guergab, A., 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 adpressum*. *Annales des sciences et technologie*, 281(1766), 1-14.
- **Hamon, E., Horvatovich, P., Izquierdo, E., Bringel, F., Marchioni, E., Aoudé-Werner, D., & Ennahar, S. (2011).** Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiology*, 11(1), 63-74.
- **Handa, S., & Sharma, N. (2016).** In vitro study of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* F22 isolated from chhang—A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 91-97.
- **Havenaar, R., Ten Brink, B., & Huis, J. H. (1992).** Selection of strains for probiotic use. In *Probiotics*, Springer, Dordrecht. pp. 209-224.
- **Henning, S. M., Seeram, N. P., Zhang, Y., Li, L., Gao, K., Lee, R. P., & Kotlerman, J. (2010).** Strawberry consumption is associated with increased antioxidant capacity in serum. *Journal of Medicinal Food*, 13(1), 116-122.

- **Hervert-Hernandez, D., & Goñi, I. (2011).** Dietary polyphenols and human gut microbiota: a review. *Food Reviews International*, 27(2), 154-169.

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

I

- **Isa, J. K., & Razavi, S. H. (2017).** Characterization of *Lactobacillus plantarum* as a potential probiotic in vitro and use of a dairy product (yogurt) as food carrier. *Applied Food Biotechnology*, 4(1), 11-18.

J

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

- **Jayanthi, P., Lalitha, P., & Shubashini, K. S. (2011).** Phytochemical investigation of the extracts of *Eichhornia crassipes* and its solvent fractionates. *Journal of Pharmacy Research*, 4(5), 1405-1406.

K

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

- **Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri, M., & Settharaksa, S. (2013).** *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe*, 22, 6-13.

- **Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2001).** Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(7), 703-725.

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

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

- **Khalil, R. K. (2010).** Influence of gallic acid and catechin polyphenols on probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(11), 2069-2079.
- **Khemariya, P., Singh, S., Jaiswal, N., &Chaurasia, S. N. S. (2016).** Isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* from vegetable samples. *Food Biotechnology*, 30(1), 49-62.
- **Kim, J., Muhammad, N., Jhun, B. H., &Yoo, J. W. (2016).** Probiotic delivery systems: a brief overview. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 46(4), 377-386.
- **Kim, S. Y. (2017).** Production of fermented kale juices with *Lactobacillus* strains and nutritional composition. *Preventive Nutrition and Food Science*, 22(3), 231-236.
- **Kosin, B., & Rakshit, S. K. (2006).** Microbial and processing criteria for production of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 371-379.
- **Kumar, B. V., Vijayendra, S. V. N., & Reddy, O. V. S. (2015).**Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6112-6124.

L

- **Lee, N. K., Kim, H. W., Chang, H. I., Yun, C. W., Kim, S. W., Kang, C. W., & Paik, H. D. (2006).** Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* NK181 Isolated from jeotgal, a Korean fermented food. *Food Science and Biotechnology*, 15(2), 227-231.
- **Li, G. (2012).** Intestinal probiotics: interactions with bile salts and reduction of cholesterol. *Procedia Environmental Sciences*, 12, 1180-1186.
- **Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., & Wang, Q. (2012).**Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry*, 135(3), 1914-1919.
- **Li, Z., Teng, J., Lyu, Y., Hu, X., Zhao, Y., & Wang, M. (2019).** Enhanced Antioxidant Activity for Apple Juice Fermented with *Lactobacillus plantarum* ATCC14917. *Molecules*, 24(1), 51-63.
- **Lin, T. Y., & Chien, M. F. C. (2007).**Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*, 100(4), 1419-1423.

- **Lin, W.H., Hwang, C. F., Chen, L. W., & Tsen, H Y. (2006).** Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology*. 23(1): 74-81.
- **Linh, N. T. H., Sakai, K., & Taoka, Y. (2018).** Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented food as potential probiotics for aquacultured carp and amberjack. *Fisheries Science*, 84(1), 101-111.
- **Lubelski, J., Konings, W. N., & Driessen, A. J. (2007).** Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 463-476.

M

- **Mallappa, R. H., Singh, D. K., Rokana, N., Pradhan, D., Batish, V. K., & Grover, S. (2019).** Screening and selection of probiotic *Lactobacillus* strains of Indian gut origin based on assessment of desired probiotic attributes combined with principal component and heatmap analysis. *Food Science and Technology*, 105, 272-281.
- **Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2015).** Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Research International*, 2015, 1-18.
- **Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017).** Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021-1051.
- **Marshall, K. C., Pembrey, R., & Schneider, R. P. (1994).** The relevance of X-ray photoelectron spectroscopy for analysis of microbial cell surfaces: a critical view. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2(1-3), 371-376.
- **Ménard, O., & Dupont, D. (2014).** A tous et limites des modèles de digestion gastro-intestinale : de l'in vitro à l'in vivo. *Innovations Agronomiques* (36), 27-41.
- **Milardović, S., Iveković, D., & Grabarić, B. S. (2006).** A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68(2), 175-180.
- **Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., & Dufour, C. (2014).** A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124.

- **Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., & Prajapati, J. (2015).** Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(14), 3615-3626.
- **Mureşan, A., Sârbu, I., Pelinescu, D., Ionescu, R., Csutak, O., Stoica, I., & Vassu-Dimov, T. (2017).** In vitro selection of some lactic acid bacteria strains with probiotic potential. *Romanian Biotechnological Letters*, 23(4), 1-14.

N

- **Nantavisai, K., Puttikamonkul, S., Chotelersak, K., & Taweechotipatr, M. (2018).** In vitro adhesion property and competition against enteropathogens of Lactobacillus strains isolated from Thai infants. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 40(1), 1-23.
- **Nishiyama, K., & Mukai, T. (2019).** Adhesion of Lactobacillus to Intestinal Mucin. In *Lactic Acid Bacteria*. Humana Press, New York, NY, pp. 159-166.
- **Ninane, V., Mukandayambaje, R., & Berben, G. (2009).** Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir: le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(3), 459-466.

O

- **Oelschlaeger, T. A. (2010).** Mechanisms of probiotic actions—a review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57-62.
- **Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Grönlund, M. M., Isolauri, E., & Salminen, S. J. (1999).** Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 9(9), 623-630.

P

- **Panghal, A., Chhikara, N., Sindhu, N., & Jaglan, S. (2018).** Role of Food Safety Management Systems in safe food production: A review. *Journal of Food Safety*, 38(4), 1-29.
- **Parkar, S. G., Stevenson, D. E., & Skinner, M. A. (2008).** The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International journal of food microbiology*, 124(3), 295-298.

- **Patel, A. R. (2017).** Probiotic fruit and vegetable juices-recent advances and future perspective. *International Food Research Journal*, 24(5), 1850-1857.
- **Pathak, S., Kesavan, P., Banerjee, A., Banerjee, A., Celep, G. S., Bissi, L., & Marotta, F. (2018).** Metabolism of Dietary Polyphenols by Human Gut Microbiota and Their Health Benefits. In *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*. Academic Press. pp. 347-359.
- **Prabha, M. R., & Vasantha, K. (2011).** Antioxidant, cytotoxicity and polyphenolic content of *Calotropis procera*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(7), 136-140.
- **Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Corbo, M. (2015).** Challenges for the production of probiotic fruit juices. *Beverages*, 1(2), 95-103.
- **Prütz, W. A., Kissner, R., Nauser, T., & Koppenol, W. H. (2001).** On the oxidation of cytochrome c by hypohalous acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 389(1), 110-122.

R

- **Rahman, N. F. A., Shamsudin, R., Ismail, A., Shah, N. N. A. K., & Varith, J. (2018).** Effects of drying methods on total phenolic contents and antioxidant capacity of the pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peels. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 50, 217-225.
- **Ranadheera, C., Vidanarachchi, J., Rocha, R., Cruz, A., & Ajlouni, S. (2017).** Probiotic delivery through fermentation: dairy vs. non-dairy beverages. *Fermentation*, 3(4), 67-84.
- **Rastmanesh, R. (2011).** High polyphenol, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction. *Chemico-biological interactions*, 189(1-2), 1-8.
- **Reddy, L. V., Min, J. H., & Wee, Y. J. (2015).** Production of probiotic mango juice by fermentation of lactic acid bacteria. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 43(2), 120-125.
- **Rita, R. K. B., Dhankar, J., & Nalla, D. B. (2018).** Assessment of Strawberry Polyphenols Aqueous Extract for Major Compositional and Biofunctional Attributes. *International Journal Current Research Review*, 10(22), 1-6.
- **Ruiz, L., Margolles, A., & Sánchez, B. (2013).** Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, 4, 396-404.

S

- **Sahadeva, R. P. K., Leong, S. F., Chua, K. H., Tan, C. H., Chan, H. Y., Tong, E. V., & Chan, H. K. (2011).** Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal*, 18(4), 1515-1522.

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

- **Sanders, J. W., Venema, G., & Kok, J. (1999).** Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(4), 483-501.

- **Savedboworn, W., Charoen, R., & Pattayakorn, K. (2014).** Growth and survival rates of *Lactobacillus plantarum* in Thai cereal cultivars. *International Journal of Applied Science and Technology*, 7(3), 49-61.

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

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

- **Shewale, R. N., Sawale, P. D., Khedkar, C. D., & Singh, A. (2014).** Selection criteria for probiotics: a review. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 9(1), 17-22.

- **Singh, K. S., Kumar, S., Mohanty, A. K., Grover, S., & Kaushik, J. K. (2018).** Mechanistic insights into the host-microbe interaction and pathogen exclusion mediated by the Mucus-binding protein of *Lactobacillus plantarum*. *Scientific Reports*, 8(1), 14198-14208.

- **Soccol, C. R., de Souza Vandenberghe, L. P., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., De Dea Lindner, J., ... & Thomaz-Soccol, V. (2010).** The potential of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413-434.

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

T

- **Tang, W., Xing, Z., Hu, W., Li, C., Wang, J., & Wang, Y. (2016).**Antioxidative effects in vivo and colonization of *Lactobacillus plantarum* MA2 in the murine intestinal tract. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16), 7193-7202.
- **Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., &Giammanco, M. (2007).** Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), 466-479.

V

- **Vamanu, E. (2017).** Effect of gastric and small intestinal digestion on lactic acid bacteria activity in a GIS1 simulator. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(7), 1453-1457.
- **Vemuri, R., Shinde, T., Shastri, M. D., Perera, A. P., Tristram, S., Martoni, C. J., .&Eri, R. (2018).**A human origin strain *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 exhibits superior in vitro probiotic efficacy in comparison to plant or dairy origin probiotics. *International Journal of Medical Sciences*, 15(9), 840-848.

W

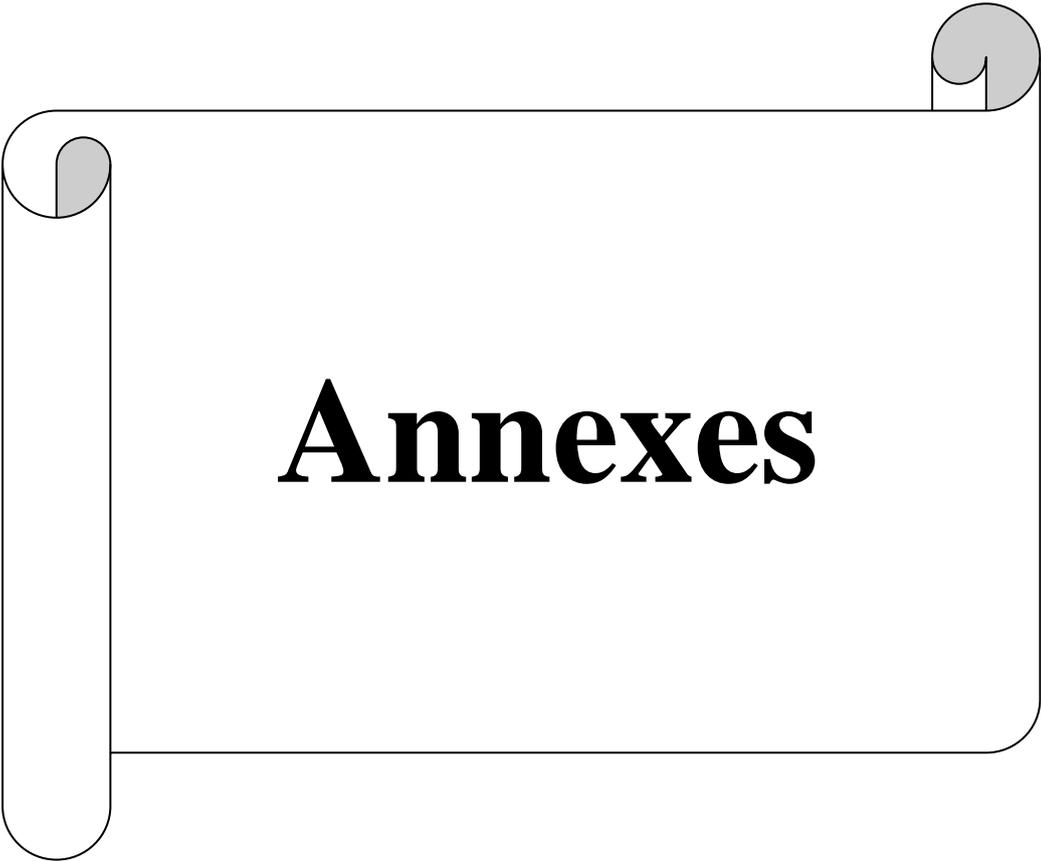
- **Wang, R., Jiang, L., Zhang, M., Zhao, L., Hao, Y., Guo, H., &Ren, F. (2017).** The Adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a Human intestinal epithelial cell line requires S-layer proteins. *Scientific Reports*, 7, 44029- 44039.
- **Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., &Li, W. (2017).**Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(5), 521- 525.
- **Wong, P. Y., & Kitts, D. D. (2006).** Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, 97(3), 505-515.

X

- **Xu, H., Jeong, HS., Lee, HS., &Ahn, J. (2009).**Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Applied Microbiology*, 49(2), 434-442.

Z

- **Zhang, S., Liu, L., Su, Y., Li, H., Sun, Q., Liang, X., & Lv, J. (2011).**Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. *African Journal of Microbiology Research*, 5(29), 5194-5201.
- **Zhang, J., Zhang, X., Zhang, L., Zhao, Y., Niu, C., Yang, Z., & Li, S. (2014).**Potential probiotic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Inner Mongolia “Hurood” cheese. *Journal Microbiology Biotechnol*, 24(2), 225-235.
- **Zhao, J., Tian, F., Zhao, N., Zhai, Q., Zhang, H., & Chen, W. (2017).** Effects of probiotics on d-galactose-induced oxidative stress in plasma: A meta-analysis of animal models. *Journal of Functional Foods*, 39, 44-49.
- **Zlotek, U., Mikulska, S., Nagajek, M., & Świeca, M. (2016).**The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 628-633.



Annexes

Annexe 1 : composition des tampons :

❖ **Eau physiologique :**

Ingrédients	Unité
NaCl	9 g
Eau distillée	1000 ml

❖ **Tampon Phosphate Saline (PBS) pH=7.2 :**

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

❖ **Tampon phosphate urée magnésium pH= 7.1 :**

Ingrédients	Unité
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	22.2 g
KH ₂ PO ₄	7.26 g
Urée	1.8 g
MgSO ₄	0.2 g
Eau distillée	1000 ml

Annexe2. Résultats des aptitudes probiotiques de *L. plantarum* S10:

Moyenne ± écart type (%)	pH			Co-agrégation		
	pH 4	pH 3	pH 2	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
	88.70±0.77	64.80±0.22	41.47±0.06	56.25±0.00	54.37±0.61	35.78±0.00

Moyenne ± écart type (%)	Hydrophobicité				Auto- agrégation	Résistance aux sels biliaires
	Chloroforme	Xylène	Toluène	Ethyle acétate		
	68.84±0.10	73.19±0.1	71.64±0.08	74.89±0.07	97.02±0.05	61.47±0.28

❖ **Activité antioxydante de *L. plantarum* :**

Moyenn e± écart type	Résistance au H ₂ O ₂ (Absorbance à 620 nm)				Piégeage de radicaux hydroxyles (%)		Piégeage de radicaux libres DPPH (%)	
	0mM	0.4mM	0.7mM	1mM	Surnagea nt	Culot	Surnagea nt	Culot
	0.22±0. 00	0.17±0. 00	0.16±0. 00	0.14±0. 00	32.86±0.3 4	58.09±0. 38	75.65±0.4 3	65.24±0. 06

Annexe3. Dosages des polyphénols et flavonoïdes de fraise et de persil (jus et extrait) :

	Polyphénols mg EAG/ 100ml	Flavonoïdes µg EQ/100 ml	Pouvoir réducteur du fer µg EAA/ml	Piégeage de radical libre DPPH (%)
Extrait de fraise	33.346±0.007	563.83±0.05	247.22±0.26	83.42±0.01
Extrait de persil	20.607±0.002	742.99±0.15	106.91±0.12	67.274±0.006
Jus de fraise	28.60±0.06	298.14±0.10	141.33±0.03	75.03±0.21
Jus de persil	14.669±0.001	103.40±0.11	25.28±0.09	24.25±0.01
Trolox	/	/	36.84±0.02	81.862±0.006

Annexe 4. Quelques paramètres de fermentation de jus :

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

Nombre de cellules UFC/ml (10 ⁹)	Jus de fraise fermenté		Jus de persil fermenté	
	T _{0h}	T _{24h}	T _{0h}	T _{24h}
	11.5	114.5	7.5	52

❖ Activités antioxydantes de la bactérie après 24heures de fermentation :

Activité antioxydante	Résistance au H ₂ O ₂ (Absorbance à 620 nm)				Piégeage de radicaux hydroxyles (%)	Piégeage de radicaux libres DPPH (%)
	0mM	0.4mM	0.7mM	1mM		
Jus de fraise fermenté	0.27±0.00	0.25±0.00	0.21±0.00	0.18±0.00	83.95±0.14	87.64±0.06
Jus de persil fermenté	0.24±0.00	0.21±0.00	0.19±0.00	0.16±0.00	64.88±0.01	71.13±0.85

Annexe5. Digestion bucco-gastro-intestinale de *L.plantarum* :

❖ Nombre de cellules viables :

Nombre de cellules UFC/ml (10 ⁹)	Sans traitement	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale
	320	186	32	16

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

	pH			Résistance aux sels biliaires	Auto-agrégation
	pH 4	pH 3	pH2		
Phase orale	82.66±0.16	57.50±0.00	37.02±0.08	57.65±0.47	95.05±0.01
Phase gastrique	54.19±0.18	44.67±0.18	28.89±0.09	42.89±0.06	94.00±0.02
Phase intestinale	46.07±0.12	32.68±0.12	25.43±0.07	38.64±0.20	92.97±0.02

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

Activité antioxydante	Résistance au H ₂ O ₂ (Absorbance à 620 nm)				Piégeage de radicaux hydroxyles (%)	Piégeage de radicaux libres DPPH (%)
	0mM	0.4mM	0.7mM	1mM		
Phase orale	0.14±0.00	0.13±0.00	0.10±0.00	0.08±0.00	52.00±0.23	72.76±0.10
Phase gastrique	0.13±0.00	0.12±0.00	0.09±0.00	0.06±0.00	45.43±0.36	67.04±0.25
Phase intestinale	0.12±0.00	0.11±0.00	0.08±0.00	0.05±0.00	28.46±0.14	50.42±0.48

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

	Polyphénols mg EAG/ 100ml			Flavonoïdes µg EQ/100 ml		
	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale
Extrait de fraise	22.71±0.00	12.73±0.00	6.93±0.00	373.55±0.05	247.84±0.43	128.23±0.02
Culture+extrai t de fraise	18.69±0.00	10.21±0.00	3.46±0.00	149.61±0.30	50.55±0.17	37.06±0.24
Extrait de persil	13.18±0.00	10.21±0.00	4.44±0.00	512.15±0.02	240.68±0.01	177.19±0
Culture+extrai t de persil	11.64±0.00	7.97±0.00	2.41±0.00	305.94±0.09	122.96±0.30	70.42±0.37
Jus de fraise	19.08±0.001	10.34±0.00	5.60±0.06	228.73±0.04	183.29±0.01	88.41±0.02
Culture+jus de fraise	12.97±0.00	5.44±0.00	2.41±0.00	185.800.04	117.16±0.01	49.68±0.04
Jus de persil	12.95±0.001	8.87±0.001	3.39±0.001	83.55±0.02	58.00±0.04	41.91±0.03
Culture+jus de persil	9.43±0.00	5.43±0.00	2.20±0.00	72.21±0.05	49.51±0.05	30.27±0.02

❖ **Activité antioxydante des extraits et de jus (fraise et persil) après digestion bucco-gastro-intestinale :**

	Pouvoir réducteur du fer $\mu\text{g EAA/ml}$			Piégeage de radical libre DPPH (%)		
	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale
Extrait de fraise	199.99 \pm 0.02	158.83 \pm 0.01	84.19 \pm 0.02	53.20 \pm 0.14	38.36 \pm 0.32	15.99 \pm 0.06
Extrait de persil	97.11 \pm 0.01	66.64 \pm 0.02	51.50 \pm 0.00	41.52 \pm 0.01	32.82 \pm 0.06	15.95 \pm 0.09
Jus de fraise	38.53 \pm 0.00	33.82 \pm 0.01	33.18 \pm 0.01	53.20 \pm 0.14	38.36 \pm 0.32	24.02 \pm 0.01
Jus de persil	19.66 \pm 0.00	18.49 \pm 0.00	17.67 \pm 0.00	19.52 \pm 0.2	14.49 \pm 0.15	10.19 \pm 0.18
Trolox	36.51 \pm 0.18	32.15 \pm 0.04	26.45 \pm 0.14	40.14 \pm 0.06	33.37 \pm 0.06	17.27 \pm 0.07

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

Nombre de cellules UFC/ml (10^9)	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale
Culture seule	186	32	16
Culture+extrait de fraise	170	104	32
Culture+extrait de persil	154	72	20
Culture+jus de fraise	280	132	34
Culture+jus de persil	210	98	28.5

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

	Phase intestinale				
	Résistance au pH (%)			Résistance aux sels biliaires (%)	Auto-agrégation (%)
	pH4	pH3	pH2		
Culture+extrait de fraise	64.21 \pm 0.09	44.45 \pm 0.04	28.46 \pm 0.10	72.73 \pm 0.05	99.37 \pm 0.00
Culture+extrait de persil	47.79 \pm 0.10	39.44 \pm 0.10	26.40 \pm 0.09	69.42 \pm 0.03	95.62 \pm 0.02
Culture+jus de fraise	73.20 \pm 0.01	50.02 \pm 0.07	38.70 \pm 0.04	78.42 \pm 0.01	91.44 \pm 0.03
Culture+jus de persil	53.67 \pm 0.09	42.15 \pm 0.09	28.64 \pm 0.08	74.97 \pm 0.05	96.78 \pm 0.15

	Hydrophobicité (%)			
	Phase intestinale			
	Chloroforme	Xylène	Toluène	Ethyle acétate
Culture+extrait de fraise	81.93 \pm 0.08	75.17 \pm 0.05	79.83 \pm 0.06	87.58 \pm 0.13
Culture+extrait de persil	81.01 \pm 0.60	82.24 \pm 0.13	86.39 \pm 0.03	89.55 \pm 0.03
Culture+jus de fraise	82.04 \pm 0.35	88.58 \pm 0.07	87.03 \pm 0.14	90.97 \pm 0.02
Culture+jus de persil	81.46 \pm 0.09	89.30 \pm 0.20	88.98 \pm 0.07	90.19 \pm 0.08

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

	Piégeage de radicaux hydroxyles (%)			Piégeage de radicaux libres DPPH (%)		
	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale
Culture+ extrait de fraise	82.64±0.05	74.48±0.01	38.61±0.00	89.91±0.03	68.91±0.00	57.30±0.20
Culture +extrait de persil	77.78±0.01	62.04±0.05	27.26±0.05	74.32±0.11	68.91±1.05	52.94±0.02
Culture+ jus de fraise	70.97±0.03	56.42±0.05	43.44±0.01	81.24±0.06	75.03±0.19	59.12±0.07
Culture+ jus de persil	64.76±0.03	49.81±0.02	39.90±0.01	74.87±0.28	68.15±0.11	51.51±0.01

	Résistance au H ₂ O ₂			
	(Absorbance à 620 nm)			
	Phase intestinale			
	0mM	0.4mM	0.7Mm	1mM
Culture+ extrait de fraise	0.14±0.00	0.12±0.00	0.11±0.00	0.09±0.00
Culture +extrait de persil	0.13±0.00	0.11±0.00	0.09±0.00	0.07±0.00
Culture+ jus de fraise	0.15±0.00	0.14±0.00	0.13±0.00	0.10±0.00
Culture+ jus de persil	0.14±0.00	0.12±0.00	0.11±0.00	0.09±0.00

Annexe 6. Photos des résultats de la survie des cultures : ×10⁹ UFC/ml

❖ **Digestion de *L.plantarum* seule :**



Sans traitement

Phase orale

Phase gastrique

Phase intestinale

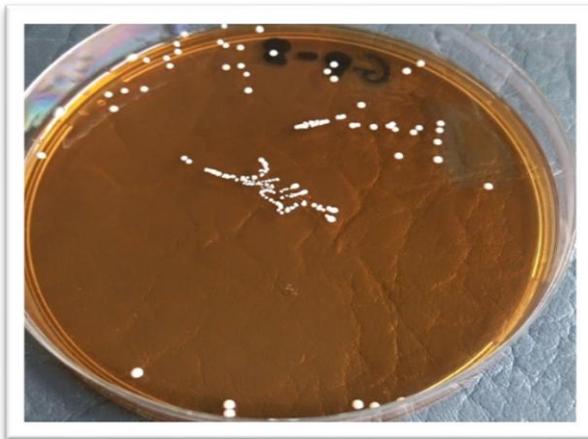
❖ Digestion de *L.plantarum* combinée avec les extraits (fraise et persil) :

Phase orale :



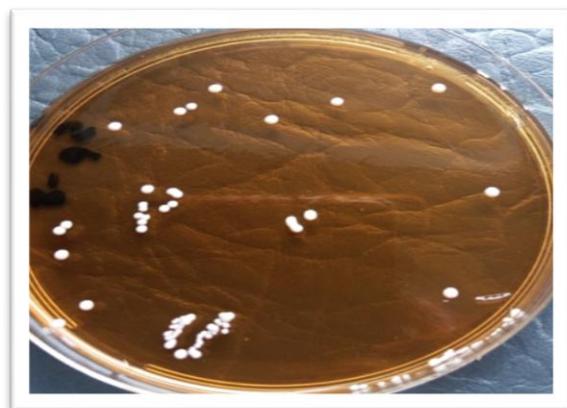
L.plantarum combinée avec l'extrait de persil *L.plantarum* combinée avec l'extrait de fraise

Phase gastrique



L.plantarum combinée avec l'extrait de persil *L.plantarum* combinée avec l'extrait de fraise

Phase intestinale



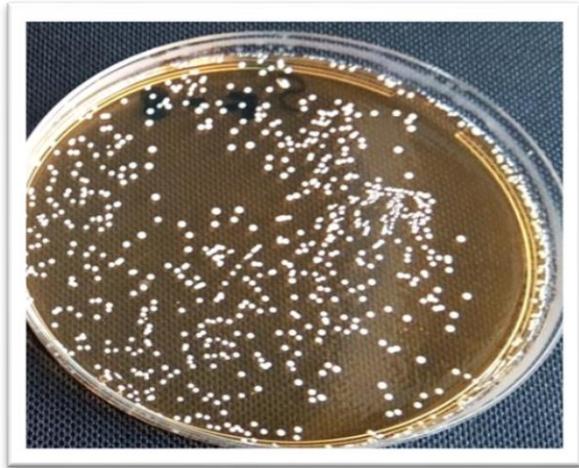
L.plantarum combinée avec l'extrait de persil *L.plantarum* combinée avec l'extrait de fraise

❖ Digestion de *L.plantarum* combinée avec le jus (fraise et persil) :

Phase orale



L.plantarum combinée avec le jus de fraise



L.plantarum combinée avec le jus de persil

Phase gastrique :

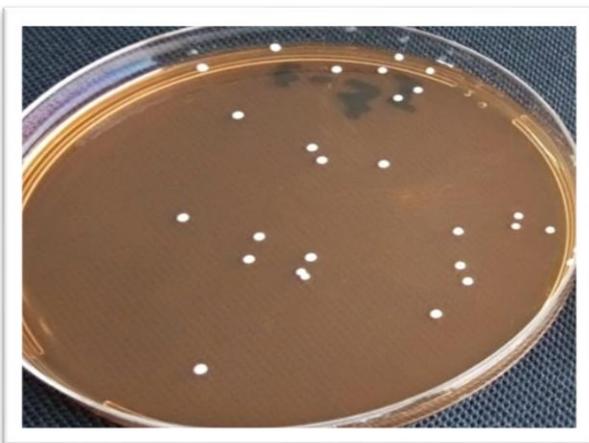


L.plantarum combinée avec le jus de fraise

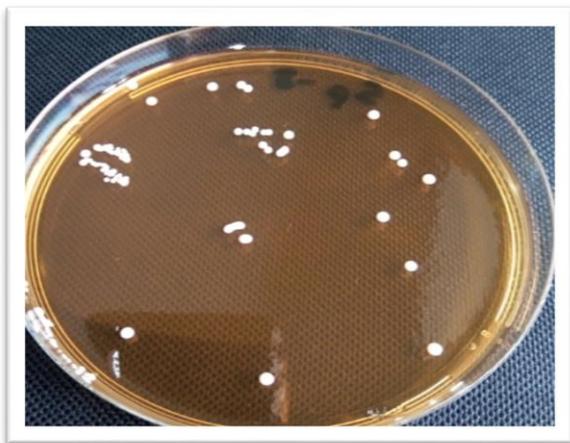


L.plantarum combinée avec le jus de persil

Phase intestinale

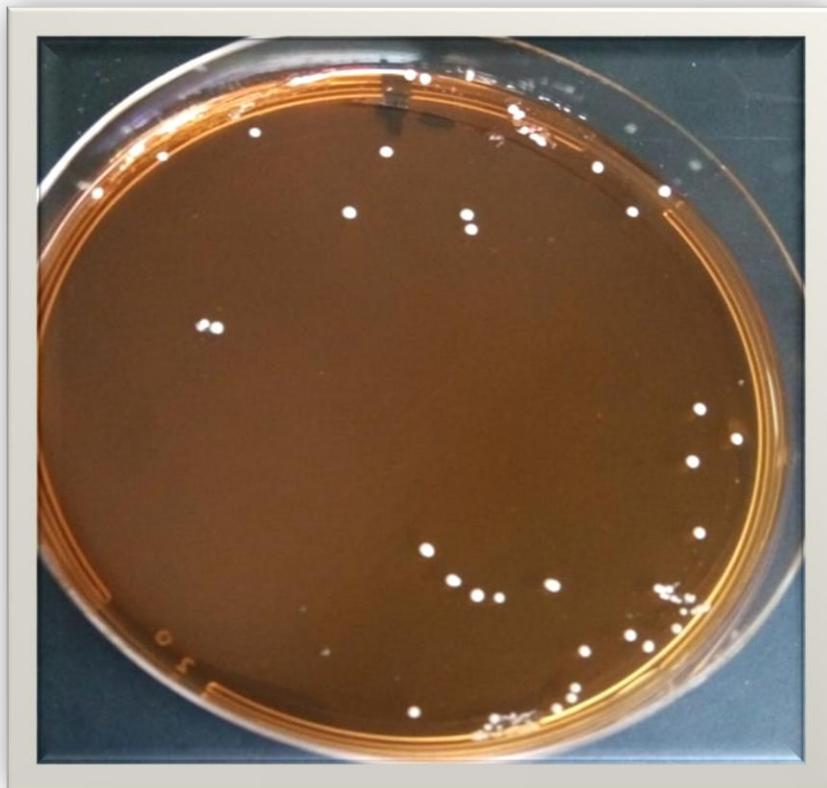


L.plantarum combinée avec le jus de fraise



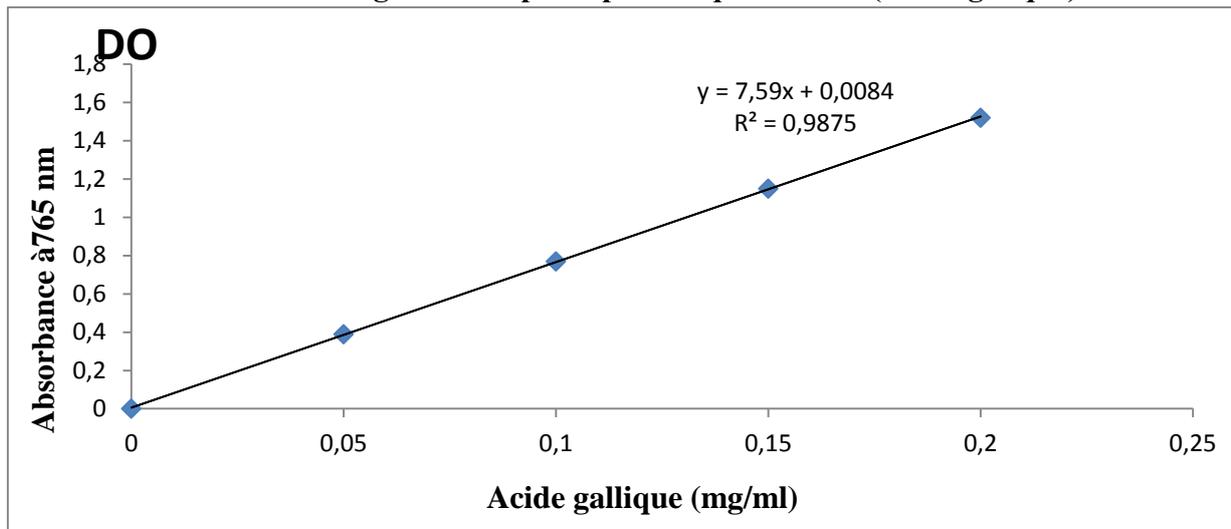
L.plantarum combinée avec le jus de persil

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

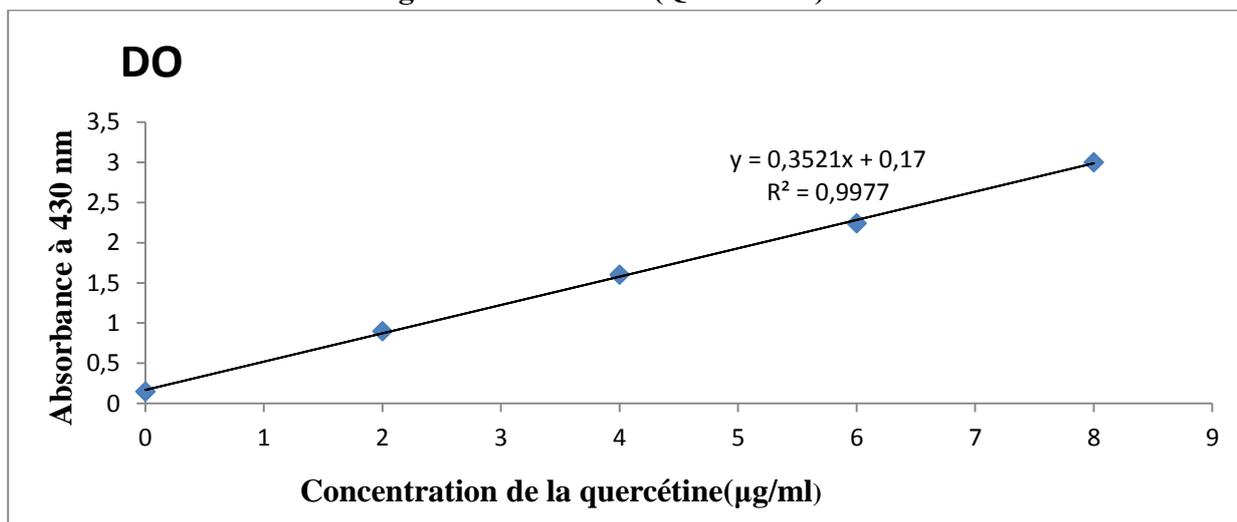


Les courbes d'étalonnage :

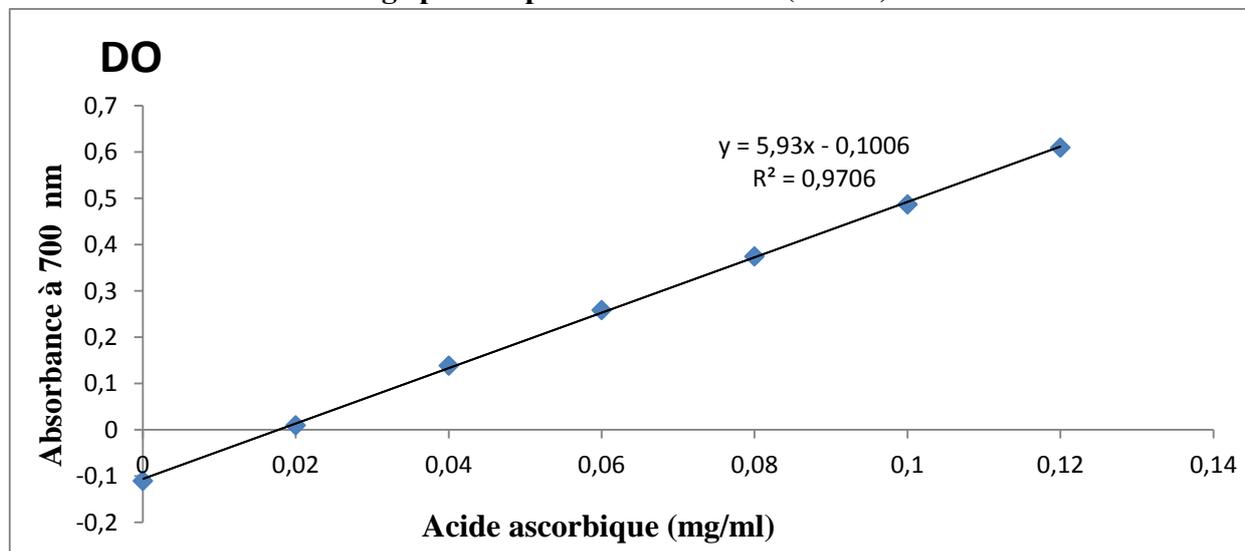
Annexe7. Courbe d'étalonnage des composés phénoliques totaux (Acide galique)



Annexe8. Courbe d'étalonnage des flavonoïdes (Quercétine)



Annexe9. Courbe d'étalonnage pour le pouvoir réducteur (FRAP)



Réalisé par : Nadia ALIOUCHE Ibtissem CHEKIRE	Encadreur : Pr. Tayeb IDOUI Date de soutenance : 17/07/2019
Thème : Performances probiotiques de <i>Lactobacillus plantarum</i> S10 lors de la digestion bucco-gastro-intestinale en présence de deux matrices végétales.	
Résumé	
<p>Le but de notre travail était dans un premier temps, l'étude de la survie, la viabilité, les aptitudes probiotiques et l'activité antioxydante de <i>L. plantarum</i> S10 lors de la digestion dans des conditions similaires à celles du tractus bucco-gastro-intestinale, dans un deuxième temps une évaluation du pouvoir antioxydant des extrait et des jus de fraise et de persil soumis aux mêmes conditions de digestion et dans une troisième étapes, une évaluation de l'effet de la combinaison de la bactérie aux matrices végétales sur la viabilité et la survie lors de la digestion bucco-gastro-intestinale.</p>	
<p>Les résultats ont montré que la souche répond aux critères de sélection des probiotique avec une résistance aux conditions de digestion. Soumis aux mêmes conditions, les matrices végétales (fraise et persil) améliorent la survie de la souche et elles sont considérées comme un bon véhicule de probiotique. La combinaison bactérie-extrait (fraise et persil), bactérie-jus (fraise et persil) a montré une augmentation du taux de survie et une amélioration des aptitudes probiotique ainsi que le pouvoir antioxydant de la souche (>50). Enfin, il y a une diminution de la biodisponibilité des composés phénoliques et flavonoïdiques au cours de passage à travers les différents étages digestifs.</p>	
Most clés : <i>L. plantarum</i> S10 ; digestion, survie, activité antioxydante, extrait, jus	
Abstract	
<p>The purpose of our work was initially to study the survival, viability, probiotic traits and antioxidant activity of <i>L. plantarum</i> S10 during digestion under similar conditions to those of gastro intestinal tract. Secondly, an evaluation of the antioxidant activity of strawberry and parsley extract and juice subjected to the same digestive conditions, and in the third step, an evaluation of the effect of the combination of strain - vegetable matrices on the viability and survival during oral gastro-intestinal digestion.</p>	
<p>The results showed that the strain respond to the selection criteria for probiotics with resistance to digestion conditions. Under the same conditions, the vegetable matrices (strawberry and parsley) improve the survival of the strain and are considered a good probiotic vehicle. The combination bacterium-extract (strawberry and parsley), bacteria-juice (strawberry and parsley) showed an increase in the survival rate and an improvement of the probiotic abilities as well as the antioxidant activity of the strain (> 50). Finally, there is a decrease in the bioavailability of phenolic and flavonoid compounds during passage through the different digestive stages.</p>	
Key words: <i>L. plantarum</i> S10, digestion, survival, antioxidant activity, extract, juice.	
<p style="text-align: right;">ملخص</p>	
<p>الغرض من عملنا في البداية هو دراسة مدى قابلية <i>L. plantarum</i> S10 في الحفاظ على قدرتها الحيوية، مع تقييم قدراتها البروبيوتيكية. ونشاطها المضاد للأكسدة أثناء الهضم في ظل الظروف المماثلة لتلك الموجودة في الجهاز الهضمي. ثانياً، تقييم قوة مضادات الأكسدة في مستخلص وعصير الفراولة والبقدونس المعرضين لنفس الظروف الهضمية، وفي خطوة ثالثة، تقييم تأثير جمع البكتيريا و الدعامة النباتية في الحفاظ على بقائها على قيد الحياة خلال الهضم.</p> <p>أظهرت النتائج أن السلالة تلبية معايير الانتقاء للبروبيوتيك مع مقاومة لظروف الهضم. في ظل نفس الظروف، تعمل الدعامة النباتية (الفراولة والبقدونس) على تحسين بقاء السلالة حية، كما تعتبر وسيلة جيدة لنقل البر وبيتيك حيث بينت نتائج الجمع بين البكتيريا-المستخلص (الفراولة والبقدونس) والبكتيريا-العصير (الفراولة والبقدونس) زيادة في نسب بقاء السلالة حية كما حسنت قدراتها البروبيوتيكية وكذلك قوة مضادات الأكسدة للسلالة (< 50) مع انخفاض في المركبات الفينولية والفلانويدات أثناء المرور عبر محتويات الجهاز الهضمي المختلفة.</p>	
<p style="text-align: center;">الكلمات المفتاح: <i>L. plantarum</i> S10، الهضم، القدرة الحيوية، نشاط المضاد للأكسدة، مستخلص، عصير</p>	