

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun–Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

M. BOUABDELLI Mohamed

M. BOUGHADDOU Djillali

M. DAOUD Bakir

Thème

**Evaluation des activités biologiques d'une bactérie lactique  
(probiotique)**

Soutenu publiquement le 22/06/2022

<b>Jury:</b>		<b>Grade</b>
<b>Président:</b>	M <sup>me</sup> BOUDALI S.	MAA
<b>Encadrant:</b>	M <sup>me</sup> BENGUIAR R.	MCA
<b>Co-encadrant:</b>	M <sup>me</sup> BENARABA R.	Pr.
<b>Examineur 1:</b>	M <sup>me</sup> MILIANI A.	MCB

Année universitaire 2021-2022

## *Remerciement*

Avant tout, nous remercions **Allah** le tout puissant de nous avoir donnés la force, le courage, la volonté, la persistance et nous a permis d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairés le chemin de la réussite.

Nos vifs remerciements et notre profonde gratitude vont particulièrement à Madame **BENGUIAR R.** qui nous a encadrées depuis les premiers instants. Sa pédagogie, son dévouement, son sérieux dans le travail, ses précieux conseils, ses encouragements, sa patience, sa disponibilité et sa gentillesse ont été importants pour nous et ont largement contribué à l'évolution de cette étude.

Nous remercions Madame **BENARABA R.** pour nous avoir fait l'honneur d'être notre Co-promotrice ainsi pour ses précieux conseils, ses orientations, pour tous son aide.

Nous tenons à remercier profondément Madame **BOUDALI S.** pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de notre soutenance.

Aussi, nous tenons à remercier profondément Madame **MILIANI A.** d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remerciment s'adressent à Madame **ABDELLAH *Fatiha*** à Mademoiselle **AYAD Noura**, et à Madame **Leila** pour leurs conseils et encouragements.

Nos immenses remerciements vont à nos **parents** pour leur amour inestimables, leurs Confiances, leurs soutiens, leurs sacrifices, et leurs encouragements tous nos amis de la promotion Master II **Microbiologie Appliquée.**

Enfin nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## *Dédicace*

**Je dédie ce modeste travail**

**A deux personnes les plus chers au monde que**

**Je ne remercierais jamais assez pour leurs aides,  
encouragements, Soutiens, sacrifices et leur patience**

**pendant toute ma vie :**

**Mes chers parents**

**A mes grands parents**

**A mon frère Abdelwahabe et ma sœur Sara**

**A toutes ma famille**

**A mes encadrantes Mme BENGUIAR et Mme BENARABA R.**

**pour leur compréhension**

**A mes collègues Djillali et Bakir qui ont partagée avec moi les moments  
difficiles de ce travail**

**Tous mes chers amis qui ont étaient toujours avec moi**

**A toutes la promotion de Master II**

**Microbiologie appliquée 2021/2022**

**Spécialement au groupe de BELALEM Fethi, ABDERREHIM Sara et**

**ABDI Dalila**

**Et au groupe de TAMERDJANET Nouha, ZERROUGUI Ikram et**

**BENARABA Sara**

**A tous mes enseignants pour m'avoir tout donnée, ce qui est inestimable, le  
savoir et le savoir-faire, je vous dis merci**

**A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer**



**Mohamed**

## Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce travail réalisé grâce à l'aide d'Allah le  
tout puissant

A la mémoire de mon défunt père.

À la plus belle créature qu'ALLAH a créée sur terre, À la source  
de Bonheur, de patience et de générosité, À ma mère  
BOUCHNAFA Khaira !

*A mes frères et mes sœurs.*

*A toute ma famille*

*A mes collègues Mohamed et Bakir.*

À tous mes amis avec qui j'ai grandi

À tous mes amis que j'ai rencontrés fait pendant mes études

A tous mes enseignants pour m'avoir tout donnée, ce qui est  
inestimable, le savoir et le savoir-faire, je vous dis merci

À tous les étudiants de la promotion 2021/2022

Spécialement au groupe de BELALEM Fethi, ABDERREHIM Sara  
et ABDI Dalila

Et au groupe de TAMERDJANET Nouha, ZERROUGUI Ikram et  
BENARABA Sara

A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer ...



**DEDICACE**

***A ma très chère mère***

***Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.***

***A mon très cher père***

***Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager.***

***A mes très chers frères***

***Et ma seule sœur.***

***A toute ma famille.***

***A mon binôme Mohamed et Djillali.***

***À tous mes amis que j'ai rencontrés fait pendant mes études***

***A tous mes enseignants pour m'avoir tout donnée, ce qui est inestimable, le savoir et le savoir-faire, je vous dis merci***

***À tous les étudiants de la promotion 2021/2022***

***Spécialement au groupe de BELALEM Fethi, ABDERREHIM Sara et ABDI Dalila***

***A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer ....***

**Bakir**



## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ABTS</b>	: Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>ATP</b>	: Adénosine-triphosphate
<b>BSA</b>	: Sérum albumine bovine
<b>DTNB</b>	: 5,5'-dithiobis (Znitrobenzoic Acid)
<b>EPS</b>	: Exopolysaccharides
<b>ERO</b>	: Espèces réactives de l'oxygène
<b>GPx</b>	: Glutathion peroxydase
<b>GRAS</b>	: Generally Regarded As Safe
<b>GSH</b>	: Glutathion réduit
<i>Lb</i>	: <i>Lactobacillus</i>
<b>LB1</b>	: Isolat1
<b>LB2</b>	: Isolat2
<b>LB3</b>	: Isolat3
<b>LB4</b>	: Isolat4
<b>MRS</b>	: Man Rogosa Sharpe
<b>NAC</b>	: N-acétylcystéine
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffer Saline
<b>SOD</b>	: Superoxydes dismutases
<b>Sp</b>	: Espèce non identifiée
<b>TPTZ</b>	: 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
<b>UFC</b>	: Unité formant colonie

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	: Organigramme récapitulatif de la démarche expérimentale.....	8
<b>Figure 2</b>	: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH) ( <b>Benzie &amp; Strain, 1996</b> ) .....	10
<b>Figure 3</b>	: Réaction d'Ellman avec une protéine de thiols libre ( <b>Rudyk et Eaton, 2014</b> ).....	12
<b>Figure 4</b>	: Pouvoir réducteur des isolats lactiques étudiés .....	15
<b>Figure 5</b>	: Concentrations du GSH des extraits cellulaires de cinq bactéries étudiées .....	17
<b>Figure 6</b>	: Groupements thiols des extraits cellulaires des souches étudiées ( <i>Lactobacillus</i> sp.; <b>LB1 ; LB2 ; LB3 et LB4</b> ).....	18

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Matériel, milieux de culture et produits chimiques utilisés.....	6
---	---

## LISTE DES ANNEXES

- Annexe I** : Probiotique de Lactibiane tolérance®
- Annexe II** : Composition de milieu MRS
- Annexe III** : Aspects macroscopiques et microscopiques des bactéries étudiées
- Annexe IV** : Préparation du tampon phosphate (PBS)
- Annexe V** : Composition du tampon de lyse
- Annexe VI** : Différentes voies de l'activité antioxydante de NAC
- Annexe VII** : Courbes d'étalonnage pour l'évaluation de FRAP
- Annexe VIII** : Courbes d'étalonnage pour l'évaluation de Glutathion et des groupements thiols
- Annexe IX** : Courbe d'étalonnage pour le dosage de protéines

<b>Liste des abréviations</b> .....	i
<b>Liste des figures</b> .....	ii
<b>Liste des tableaux</b> .....	iii
<b>Liste des annexes</b> .....	iv

## **T A B L E D E S M A T I E R E S**

### **Introduction**

#### *Partie expérimentale*

### **Chapitre I. Matériel et Méthodes**

<b>I.1. Objectifs de l'étude</b> .....	5
<b>I.2. Lieu et durée de travail</b> .....	5
<b>I.3. Matériel et produits chimiques</b> .....	5
<b>I.4. Matériel biologique</b> .....	7
<b>I.4.1. Matrice végétale</b> .....	7
<b>I.4.2. Souches bactériennes étudiées</b> .....	7
<b>I.4.2.1. Mélange de probiotiques</b> .....	7
<b>I.4.2.2. Isolats lactiques</b> .....	7
<b>I.5. Procédure expérimentale</b> .....	7
<b>I.5.1. Isolement, purification et pré-identification des isolats lactiques</b> .....	9
<b>I.5.2. Revivification des isolats lactiques</b> .....	9
<b>I.5.3. Evaluation de l'activité antioxydante des isolats lactiques</b> .....	9
<b>I.5.3.1 Préparation des suspensions des isolats lactiques (cellules intactes)</b> .....	9
<b>I.5.3.2. Evaluation du pouvoir réducteur du fer (technique de FRAP)</b> .....	10
<b>I.5.3.3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits cellulaires des isolats lactiques par la détermination des taux du glutathion réduit (GSH) et des groupements thiols (SH)</b> .....	11

<b>I.5.3.3.1.</b> Préparation des extraits cellulaires des isolats lactiques (lysats cellulaires) .....	11
<b>I.5.3.3.2.</b> Dosage des protéines par la méthode de Bradford .....	11
<b>I.5.3.3.3.</b> Dosage du glutathion réduit (GSH) et des groupements thiols (SH) par le réactif d'Ellman (DTNB) .....	12
<b>I.6.</b> Analyse statistique .....	13

## **Chapitre II. Résultats et Discussion**

<b>II.1.</b> Pouvoir réducteur du fer (FRAP) .....	15
<b>II.2.</b> Concentrations du Glutathion réduit (GSH) et des groupements thiols (SH) .....	17
<b>II.2.1</b> GSH au niveau des extraits cellulaires des cinq bactéries lactiques .....	17
<b>II.2.2</b> Dosage des groupements thiols .....	18

## **Conclusion et Perspectives**

## **Références Bibliographiques**

## **Annexes**

## **Résumé**

ملخص

## **Abstract**

# ***Introduction***

La génération des Espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle (OH) au cours du métabolisme cellulaire est un métabolisme normal et nécessaire. Elles jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire, l'apoptose, l'expression des gènes et le transport des ions (**Liu et al., 2011**). Cependant, lorsqu'elles sont produites en quantité excessive et non contrôlée, les ERO peuvent devenir toxiques pour les composants de la cellule, les lipides, les protéines et les acides nucléiques (**Sanchez, 2017**) et par conséquent conduit au stress oxydatif (**Valko et al., 2004**).

Ce phénomène oxydatif est défini comme un déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants en faveur des oxydants. Ce dernier est largement impliqué dans le développement de certaines pathologies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'obésité et le diabète (**Al-Dalaen et Al-Qtaitat, 2014**).

Pour se protéger aux effets néfastes des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes puissantes (**Haleng et al., 2007**). On distingue deux sources d'antioxydants. L'une est endogène et se compose d'enzymes notamment : la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (**Ighodaro et Akinloye, 2018**). L'autre est exogène non enzymatique et est apportée par l'alimentation. Ce sont les polyphénols, les caroténoïdes, les oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium, magnésium et manganèse), ainsi que les vitamines A, C et E. Ces antioxydants agissent en inhibant à la fois la formation et le développement des radicaux libres (**Shah et Modi, 2015**).

Afin de réduire les dommages oxydatifs induits par les radicaux libres, des antioxydants synthétiques ou naturels sont utilisés. Bien que, il s'est avéré récemment que ces antioxydants synthétiques disposent des effets indésirables sur la santé de l'homme. De nombreuses études ont dévoilé que ces antioxydants synthétiques sont toxiques voire cancérigènes (**Panicker et al., 2014 ; Socrier, 2017 ; Kornienko et al., 2019**). Au vu de leur impact sur la santé leur utilisation est donc compromise. Pour cela, les chercheurs donnent beaucoup d'intérêt aux antioxydants de nature biologique à l'instar des bactéries bénéfiques essentiellement les probiotiques. Ces derniers sont largement vantés pour leurs effets bénéfiques sur la santé, ainsi que leur rôle dans le domaine agroalimentaire (**Liu et al., 2018**). Leur efficacité repose en grande partie sur le choix de l'espèce et même de la souche bactérienne sélectionnée. Parmi les souches bactériennes vivantes sélectionnées en raison de leur importance contribution au maintien de l'écosystème intestinal, on distingue les bactéries lactiques (**Yadav et Shukla, 2017**).

## *Introduction*

---

---

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis plusieurs siècles comme des agents protecteurs, sont caractérisés par la synthèse des métabolites antimicrobiens ; en raison de leurs propriétés, elles jouent divers rôles tels que la conservation des aliments (**Ajao et al., 2021**), la stimulation immunitaire et la compétition pour les sites d'adhésion aux parois de l'intestin (**Djadouni, et al., 2013**). Elles peuvent se retrouver à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, dans des divers produits alimentaires comme les produits laitiers fermentés et même sur la surface des végétaux (plantes, fruits et légumes, ...) (**Makhloufi, 2011**). Récemment, de nombreuses études ont montré que certaines souches de bactéries lactiques exercent des activités antioxydantes et anti-inflammatoires (**Jain et Mehta, 2017 ; Khan et al., 2021**).

D'autre part, les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation des matières végétales et animales. Elles ont un rôle important dans la préparation et la conservation de nombreux aliments fermentés, leur conférant le statut Généralement reconnu comme sans danger (GRAS) (**Ayyanna et al., 2018**). Parmi les aliments fermentés les plus riches en bactéries lactiques, le blé fermenté traditionnel (hamoum). En effet, les grains de blé conservés plusieurs années en silos souterrains, cette conservation permet la prolifération de nombreux microorganismes qui entraînent leur fermentation naturelle.

Les bactéries lactiques isolées du blé fermenté peuvent être considérées comme une solution prometteuse, dans les applications médicales et alimentaires, de ce fait, diverses études se sont intéressées à trouver des méthodes de valorisation de ce produit fermenté en l'utilisant comme source d'isolement des bactéries lactiques à caractère probiotique et antioxydant puissant, deux facteurs déterminants d'un potentiel thérapeutique important. Dans cette optique, l'objectif de cette étude consiste à évaluer, *in vitro*, l'activité antioxydante de quatre bactéries lactiques isolées du blé fermenté. Cette activité a été évaluée par le biais de la réduction du fer et la détermination des taux en glutathion réduit et en protéines à groupement thiols (SH).

# *Partie expérimentale*

# **Chapitre I**

## **Matériel et méthodes**

### **I.1. Objectifs de l'étude**

Cette présente étude s'intéresse à évaluer l'activité antioxydante de quatre bactéries lactiques isolées du blé fermenté.

Le pouvoir antioxydant de ces isolats a été mesuré via leurs capacités à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ainsi que leurs aptitudes à synthétiser le Glutathion réduit et les groupements thiols. Et ce afin de sélectionner parmi eux la souche ayant le potentiel antioxydant le plus important et susceptible d'être utilisé dans le domaine biotechnologique ou bien dans les stratégies nutritionnelles préventives contre les pathologies chroniques à stress oxydatif et ce en les utilisant dans les préparations nutraceutiques.

L'activité antioxydante des 4 isolats a été comparée à celle d'une souche lactique, choisie comme référence, isolée d'un complément alimentaire commercialisé sous le nom de Lactibiane ®.

### **I.2. Lieu et durée de travail**

La démarche expérimentale relative à cette étude a été réalisée durant la période allant du 08/02/2022 jusqu'au 30/03/2022. Elle a été effectuée au sein des Laboratoires suivants :

- ❖ Laboratoire d'Amélioration et de Valorisation des productions animales locales  
*Université Ibn Khaldoun- Tiaret*
- ❖ Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie « *Université Ibn Khaldoun- Tiaret* ».

### **I.3. Matériel et produits chimiques**

Le matériel, les produits chimiques et les milieux de culture nécessaires à l'accomplissement de ce travail sont cités dans le tableau 1

**Tableau 1** : Matériel, milieux de culture et produits chimiques utilisés.

Matériel et Appareillages	Réactifs et produits chimiques	Milieux de culture
-Spectrophotomètre (SHIMADZU) -Vortex (TECHNO KARTELL) -Balance analytique (OHAUS) -Agitateur magnétique (ROTMAG) -Bain marine (MEMMERT) -Broyeur (ULTRA TURRAX T25) -Sonicateur (BANDELIN SONOREX TK52) -Centrifugeuse (SIGMA) -Boîte de Pétri -Autoclave -Incubateur (MEMMERT)	-Acétate de sodium ( $C_2H_3NaO_2$ ; PH=3,6 ; PM=82,034g/mol) -Chlorure de fer III ( $FeCl_3$ ; PM=162,2g/mol) -2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ ; $C_{18}H_{12}N_6$ ; PM=312,34g/mol) -Acide chlorhydrique (HCL ; PM=36,45g/mol) (1N) -Sulfate ferreux ( $FeSO_4$ ; PM=151,908g/mol) - Acide gallique ( $C_7H_6O_5$ ; PM=170,12g/mol) - Acide ascorbique ( $C_6H_8O_6$ ; PM=176,12g/mol) - Quercétine ( $C_{15}H_{10}O_7$ ; PM=302,23g/mol) -Catéchine ( $C_{15}H_{14}O_6$ ; PM=290,26g/mol) -Hydrogénophosphate de sodium ( $Na_2HPO_4$ ; PM=141,98g/mol) - Phosphate de potassium dibasique ( $K_2HPO_4$ ; PM= 228,23 g/mol) - Phosphate de potassium monobasique ( $KH_2PO_4$ ; PM= 136,09 g/mol) -Sérum albumine bovine (BSA) -Réactif de Bradford -Chlorure de sodium (NaCl; PM=58,44g/mol) -Chlorure de potassium (KCl ; PM=74,55g/mol) -Sodium phosphate dibasique dodécahydraté ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ; PM=358,14) -Chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ; PM=203,31g/mol) -Chlorure de calcium ( $CaCl_2$ ; PM=110,98g/mol) -N-acétylcystéine ( $C_5H_9NO_3S$ ; PM=163,195g/mol) -Glutathion réduit ( $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ ; PM=307,32g/mol)	-MRS (Bouillon) -MRS (Gélose)

## I.4. Matériel biologique

### I.4.1. Matrice végétale

Au cours de cette présente étude, l'isolement des bactéries lactiques a été réalisé à partir d'un aliment fermenté traditionnel (le blé fermenté naturellement), ce dernier a été gracieusement fourni par un agriculteur de la région de Relizane. Le choix d'utiliser le blé fermenté pour l'isolement est justifié par le fait que cet aliment a un potentiel bénéfique sur la santé, il est historiquement et traditionnellement utilisé contre certaines complications digestives, il est considéré comme un aliment fonctionnel ayant des propriétés médicinales dans la prévention et le traitement de nombreuses complications physiopathologiques intestinales. Ses vertus sont dues à sa composition et sa grande diversité en microorganismes essentiellement les bactéries lactiques issues de la fermentation naturelle, à potentiel probiotique, caractérisées par des effets protecteurs bénéfiques sur le microbiote intestinal et des propriétés nutritionnelles diététiques sur la santé de l'intestin.

### I.4.2. Souches bactériennes étudiées

#### I.4.2.1. Mélange de probiotiques

Le mélange bactérien utilisé pour l'isolement d'une bactérie probiotique, est un complément alimentaire lyophilisé et commercialisé sous le nom de Lactibiane Tolérance® développé par le laboratoire PiLeJe, France, ce complément est constitué d'un mélange de ferments lactiques dosés à  $4.10^9$  UFC /g de poudre lyophilisées, il est constitué de souches suivantes : *Bifidobacterium lactis* LA303 , *Lactobacillus acidophilus* LA201 , *Lactobacillus plantarum* LA301, *Lactobacillus salivatus* LA302, *Bifidobacterium lacis* LA304 (**voir annexe I**). Ces souches ont fait l'objet de plusieurs recherches garantissant et certifiant leurs effets bénéfiques santé, leurs innocuités, leurs viabilités et survie dans le tube digestif et leur adhésion aux cellules épithéliales intestinales (**Drouault-Holowacza et al., 2006**)

#### I.4.2.2. Isolats lactiques

Quatre bactéries lactiques ont été isolées à partir du blé fermenté.

## I.5. Procédure expérimentale

La démarche expérimentale globale concernant cette étude est illustrée par l'organigramme suivant :

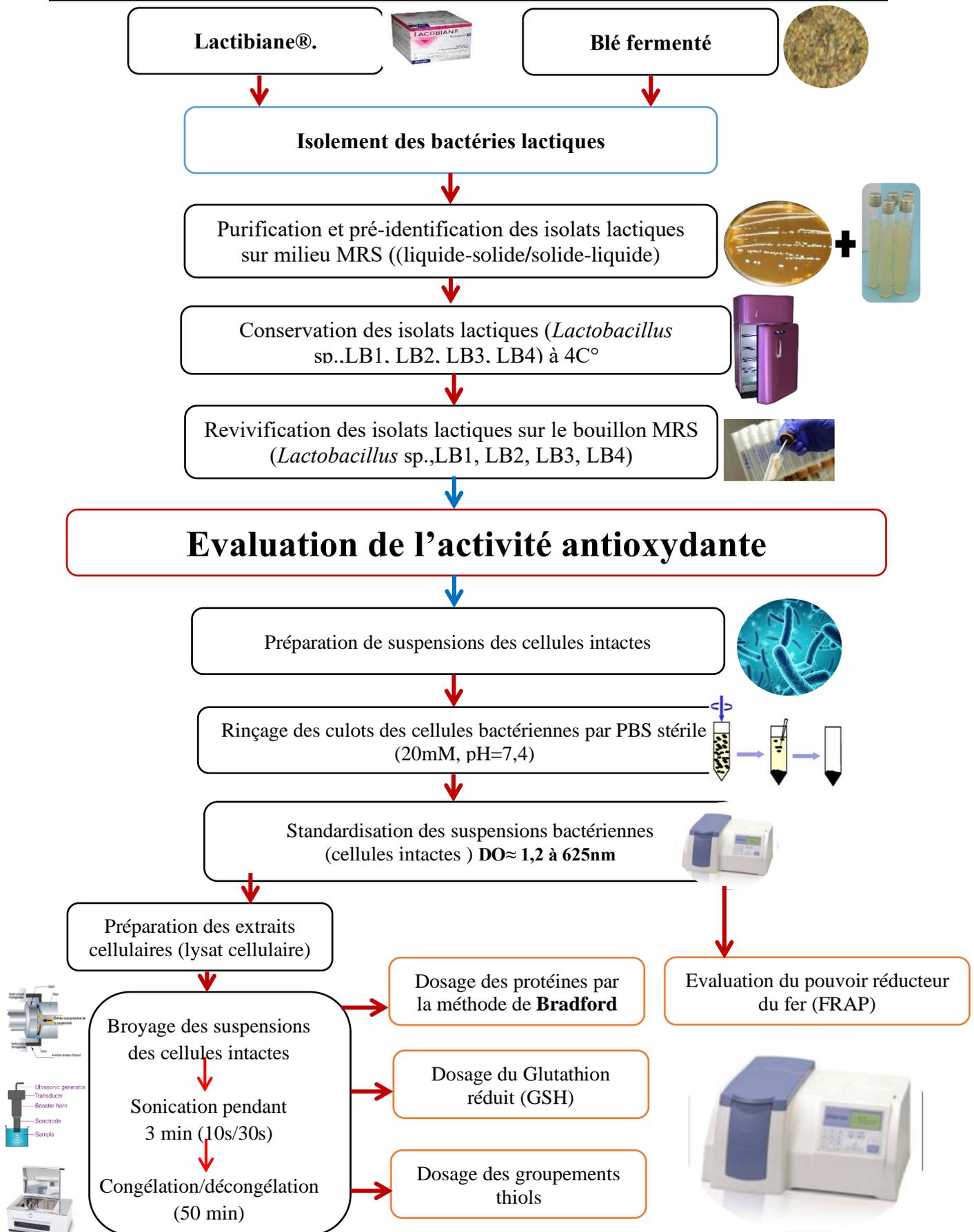


Figure 1 : Organigramme récapitulatif de la démarche expérimentale

### **I.5.1. Isolement, purification et pré-identification des isolats lactiques**

L'isolement et la purification des isolats a fait l'objet d'un projet de fin d'étude, complémentaire à notre projet, intitulé « Interaction entre bactéries probiotiques et bactéries pathogènes ». De manière très succincte cette partie consiste à prélever une quantité de probiotique lyophilisé ou l'aliment fermenté et de la mettre dans un bouillon MRS, ce dernier a été incubé à 37°C pendant 24h afin d'assurer une revivification des bactéries lactiques présentes dans le lyophilisat et le blé fermenté. Ainsi après incubation, cinq isolats typiques à Gram positif et à catalase négative ont été retenus à savoir quatre provenant du blé fermenté et un isolat du mélange probiotique.

La purification de ces isolats a été effectuée par plusieurs repiquages successifs sur le milieu MRS (liquide-solide/solide-liquide). Avant une conservation à court terme à 4°C, dans une gélose MRS inclinée, ces derniers ont subi une pré-identification basée sur des caractéristiques morphologiques (examen macroscopique, microscopique) et divers tests biochimiques (catalase, mannitol-mobilité, citrate de Simmons, type fermentaire...).

### **I.5.2. Revivification des isolats lactiques**

A partir des cultures précédemment conservées dans le milieu MRS incliné, des prélèvements des isolats ont été inoculés dans un bouillon MRS. Ces inoculations ont été suivies d'une incubation, soit en aérobiose ou anaérobiose, pendant 18h et à 37°C et ce afin d'obtenir des cultures jeunes.

### **I.5.3. Evaluation de l'activité antioxydante des isolats lactiques**

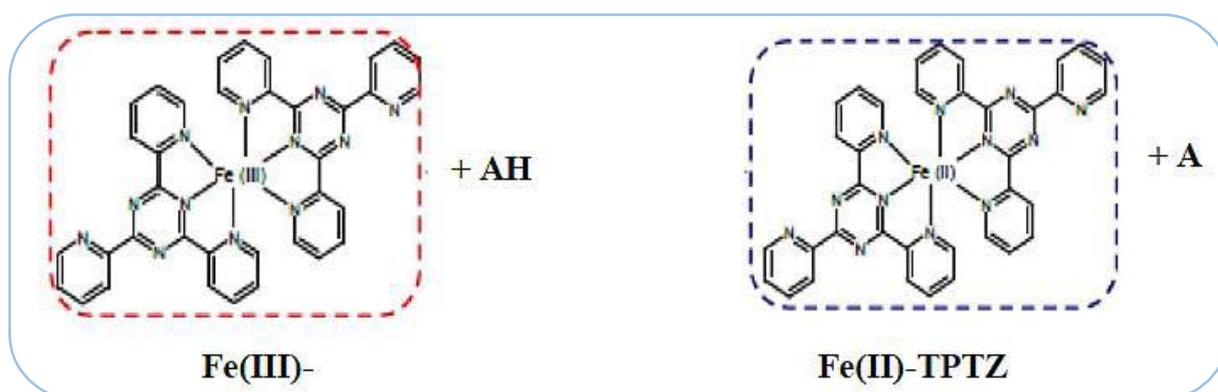
#### **I.5.3.1. Préparation des suspensions des isolats lactiques (cellules intactes) selon Su et al., (2015)**

Des cultures jeunes de chaque isolat lactique, issus de l'aliment fermenté et le mélange de probiotique, ont été utilisées pour préparer les suspensions des cellules intactes destinées à l'évaluation de l'activité antioxydante. Après centrifugation (à 6000 rpm durant 10 min et à 4°C) des isolats en culture sur bouillon MRS, le surnageant a été éliminé et les culots des cellules bactériennes ont subi trois rinçages successifs avec 500 µl de PBS stérile (à 20 mM, pH 7,4). Ces derniers ont été remis en suspension dans 500 µl du tampon cité précédemment. Le nombre total des cellules bactériennes obtenues a été ajusté à 10<sup>9</sup> UFC/ml ce qui correspond à une densité optique de 1,2. Cette concentration est largement utilisée dans les différents tests d'évaluation des propriétés probiotiques *in vitro*.

### I.5.3.2. Evaluation du pouvoir réducteur du fer (Technique de FRAP)

- **Principe**

La méthode de FRAP développée par **Benzie & Strain. (1996)** est basée sur la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III)-TPTZ)<sub>2</sub>] en un complexe tripyridyltriazine ferreux [(Fe(II)-TPTZ)<sub>2</sub>] par un antioxydant, à un pH 3,6 pour maintenir la solubilité du fer (**figure 2**). Lors de la réduction du complexe ferrique en complexe ferreux une coloration bleue intense apparaît très rapidement avec un maximum d'absorption à 593 nm. Le pouvoir réducteur est proportionnel à la formation de la couleur bleue, plus la couleur bleue est intense, plus l'échantillon peut être considéré comme un bon réducteur



**Figure 2 :** Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH) (**Benzie & Strain, 1996**).

- **Mode opératoire**

Ce test peut être utilisé comme un index du pouvoir antioxydant des défenses non enzymatiques. Il est basé sur la mesure de la réduction par les suspensions bactériennes et dans des conditions d'acidité (pH 3,6), d'une solution comprenant du tampon acétate ; 2,4,6 Tripyridyl-s-triazine (TPTZ) (Sigma-Aldrich, USA), et un sel ferrique (FeCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O), ce qui provoque la formation du complexe TPTZ-Fe<sup>++</sup>, de couleur bleue. Une gamme étalon est obtenue à partir d'une solution mère de FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O à 1000μM (les courbes de la gamme d'étalonnage figurent en **Annexe VII**). La solution FRAP a été préparée à partir des trois solutions initiales : tampon acétate (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>, 3H<sub>2</sub>O) à pH 3,6, TPTZ à 10 mM et FeCl<sub>3</sub> à 20 mM) et placée à 37°C pendant toute la durée de l'analyse. Pour effectuer cette analyse 100 μL de chaque suspension bactérienne ou de la solution-gamme, sont ajoutés à 900 μL de la

solution FRAP. La lecture des échantillons se fait après 30 min d'incubation à une température ambiante par spectrométrie à 593 nm.

La concentration de pouvoir réducteur du fer pour chaque suspension bactérienne a été calculée par l'utilisation d'une gamme d'étalonnage effectuée avec le FeSO<sub>4</sub> (**annexe VII**).

### **I.5.3.3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits cellulaires des isolats lactiques par la détermination des taux du glutathion réduit (GSH) et des groupements thiols (SH).**

#### **I.5.3.3.1. Préparation des extraits cellulaires des isolats lactiques (lysats cellulaire) selon Su et al., (2015) modifié.**

Des cultures jeunes de chaque isolat lactique ont été utilisées pour obtenir les lysats cellulaires destinés à l'évaluation des concentrations du Glutathion réduit et des protéines à groupements Thiols. Après centrifugation de 6000 rpm pendant 10 min et à 4 °C et après élimination du surnageant, les culots cellulaires ont subi trois rinçage successifs avec 500µL de PBS stérile (à 20 mM, pH 7,4). Le nombre total des cellules bactériennes a été ajustées à 10<sup>9</sup> UFC/ml. Ces dernières ont été remises en suspensions dans 3 ml du tampon de lyse ayant un pH de 7,2 (**voir annexe V**) les suspensions cellulaires ainsi obtenus ont été broyées à l'aide d'un ultra turrax T25x (pendant 5 min et à une vitesse de 8000 rpm). Ensuite les broyats obtenus ont subi dans un bain de glace, quatre cycles de sonications de 3 min (10s/30s). Afin de récupérer les extraits cellulaires, cette procédure a été complétée par cinq cycles congélation/décongélation pendant 50 minutes. Ces extraits ont été utilisés pour effectuer le dosage des protéines totales, GSH et groupements SH.

#### **I.5.3.3.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford**

- **Principe**

La méthode de Bradford est une méthode d'analyse spectrophotométrique utilisée pour déterminer la concentration des protéines en solution. Cette méthode repose sur la propriété du bleu de Coomassie à se lier, en milieu acide, aux protéines et de former ainsi un complexe de couleur bleu qui absorbe à 595 nm. La concentration des protéines dans les échantillons est déterminée par comparaison à une gamme étalon, réalisée dans les mêmes conditions, avec une solution standard d'albumine de sérum bovin (**Bradford ,1976**).

- **Mode opératoire**

100  $\mu\text{L}$  de chaque suspension bactérienne ont été homogénéisés avec 2 mL de réactif de Bradford de couleur rouge. Le mélange obtenu a été agité et laissé à température ambiante et à l'obscurité pendant 15 min. La lecture d'absorbance a été lue à 595 nm. La concentration de protéine a été déterminée par l'utilisation d'une gamme d'étalonnage d'albumine de sérum bovin (BSA) (**voir annexe IX**).

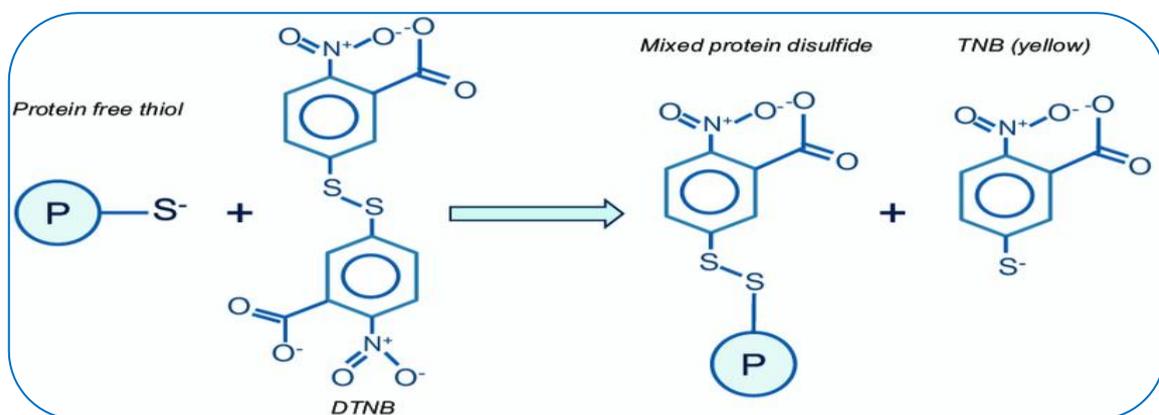
### I.5.3.3.3. Dosage du glutathion réduit (GSH) et des groupements thiols (SH) par le réactif d'Ellman (DTNB).

- **Principe**

La mesure des groupements thiols (SH) des protéines et du Glutathion réduit a été effectuée en utilisant le réactif d'Ellman ou bien DTNB acide dinitro-2,2-dithio-5,5-benzoïque (**Faure et Lafond, 1995**). Le DTNB est une molécule possédant un pont disulfure interne. Ce pont disulfure est clivé en présence de molécules thiolées, libérant ainsi deux molécules de TNB (5-thiol-2-nitrobenzic acide), un composé chromogénique absorbant la lumière à 412 nm la concentration en thiols est déterminée par spectrophotomètres (figure 3).

- **Technique**

500  $\mu\text{L}$  d'extrait cellulaire des isolats lactiques ou de gamme ont été ajoutés à 750  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate (0,05N, pH 8) et 250  $\mu\text{L}$  de réactif d'Ellman. Le mélange a été incubé à une température ambiante pendant 15 min et à l'obscurité. La lecture d'absorbance a été effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions expérimentales et en remplaçant l'extrait cellulaire par l'eau distillée. La concentration de GSH pour chaque isolat lactique a été déterminée en utilisant une gamme d'étalonnage de GSH réduit (**voir annexe VI**). Alors que le taux des groupements thiols a été évalué en utilisant une gamme d'étalonnage de N-Acétyl-Cystéine (NAC) (**voir annexe VI**)



**Figure 3** : Réaction d'Ellman avec une protéine de thiols libre (**Rudyk et Eaton, 2014**)

## I.6. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne. L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica Statsoft, (version 6.1, Statsoft, Tulsa. OK). L'ANOVA à un facteur a été utilisée pour effectuer la comparaison des moyennes (comparaison entre les cinq bactéries lactiques). Cette analyse a été suivie par le test Post-hoc Duncun afin de déterminer les différences significatives et comparer les moyennes.

Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives pour un *p value* inférieur à 0,05 dans l'ensemble des analyses statistiques. Les constatations suivantes ont été retenues :

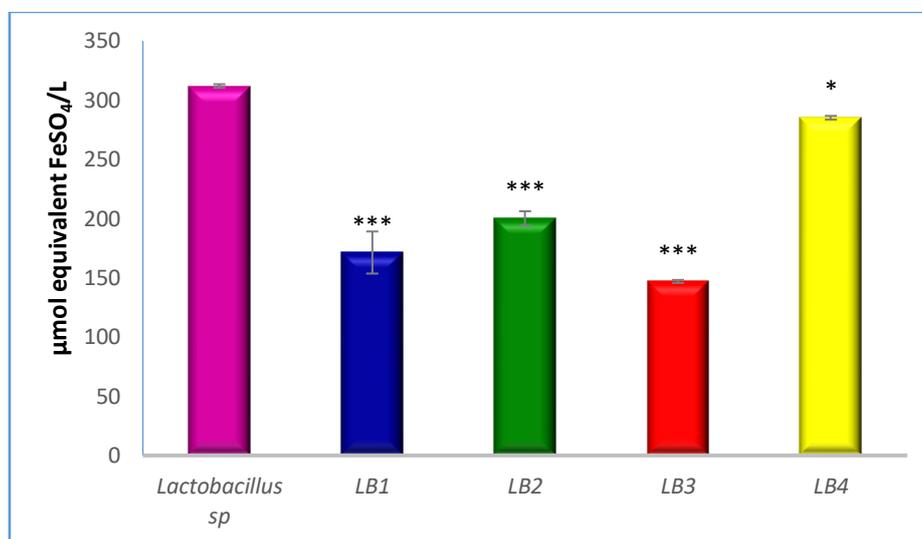
- *Pour un  $p < 0,05$  la différence est significative (\*)*
- *Pour un  $p < 0,01$  la différence est très significative (\*\*)*
- *Pour un  $p < 0,001$  la différence est hautement significative (\*\*\*)*

# **Chapitre II**

## **Résultats et Discussions**

### II.1. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Les résultats de pouvoir réducteur du fer concernant les cinq bactéries sont représentées dans la figure 4.



**Figure 4 :** Pouvoir réducteur du fer des isolats lactiques étudiés

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne  $\pm$  ES de six essais indépendants)

(\*):LB4 vs *Lactobacillus*; (\*\*\*):LB1, LB2, LB3 vs *Lactobacillus*

Ces résultats indiquent que l'isolat LB4 présente une activité antioxydante, reflétée par la capacité réductrice du fer, plus élevée et significative avec une concentration de  $285,18 \pm 1,58 \mu\text{mol/L}$  en comparaison aux autres isolats lactiques du blé fermenté (LB1, LB2 et LB3) et ce avec des concentrations de l'ordre de  $171,36 \pm 17,77$  et  $200,18 \pm 6,05$ ;  $146,97 \pm 1,25 \mu\text{mol/L}$ , respectivement.

Néanmoins, ce pouvoir réducteur reste faible par rapport au pouvoir réducteur de la souche *Lactobacillus sp.* (Utilisée comme probiotique de référence). Cette dernière montre une activité réductrice puissante estimée à  $311,99 \pm 1,55 \mu\text{mol/L}$ .

Ces résultats sont en accord avec **Zago et al., (2021)**, qui ont étudié l'activité antioxydante de différentes souches de *Lactobacillus helveticus* isolées à partir du fromage Italien, ces auteurs ont constaté que l'activité réductrice du fer varie entre 189 et 216  $\mu\text{mol/L}$ .

D'autres études ont rapporté que les souches d'*Oenococcus oeni* isolées à partir de vin, présentent un pouvoir réducteur très élevé ainsi que cette activité est dépendante de la souche et de la composition du milieu de culture (Su et al., 2015).

Nos valeurs restent largement supérieures à celles trouvées par Shokryazdan et al., (2017) soient 135,28 et 136,96 µg Trolox/mL pour l'activité réductrice du fer chez différentes souches de *Lb. pentosus* ITA23 et *Lb. acidipiscis* ITA44 et à celles de Kim et al., (2020) (80 à 120 µM) pour l'activité antioxydante des différentes bactéries lactiques (*Lactobacillus acidophilus* (LA-5) ; *Lactobacillus paracasei* (DKGF1) ; *Lactobacillus casei* (DKGF8) et *Lactobacillus plantarum* (DKGF9) isolées à partir d'une kimchi (aliment traditionnel Coréen).

Alors que des travaux réalisés sur des souches de *Lactobacillus* isolées à partir de la matière fécale des enfants, ont trouvé des concentrations largement supérieures aux nôtres soient 1734,3 µmol/L. Pour *Lb. rhamnosus* 4B15 et 1700 µmol/L pour *Lb. gasseri* 4M13 (Oh et al., 2018)

Ces différents résultats obtenus pour l'activité réductrice peuvent être probablement dus au genre de la bactérie isolée et à son potentiel probiotique ainsi que leurs conditions de développement et à la composition du milieu de culture (Su et al., 2015)

L'activité réductrice du fer des bactéries lactiques peut aussi être associée à l'action des exopolysaccharides synthétisés. En effet, Shokryazdan et al., (2017) ont démontré que le pouvoir réducteur peut être attribué au peptidoglycane et exopolysaccharide de *Lactobacillus*.

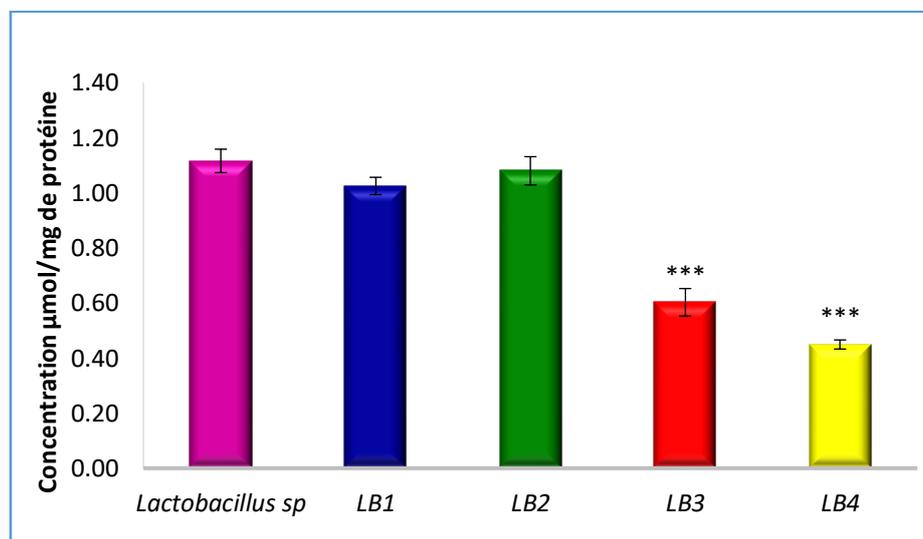
Aussi dans l'investigation réalisée par Liu et al., (2011), sur l'évaluation de l'activité antioxydante des exopolysaccharides issus de différentes souches lactiques, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* NTU 101 (101EP) et *Lactobacillus plantarum* NTU 102 (102EP) présentent une activité antioxydante, via la réduction du fer, puissante avec une concentration varie entre de 0,73 et 0,75 mg/mL.

Nous pouvons supposer qu'il existe une relation entre l'activité observée, la structure et le poids moléculaire des exopolysaccharides issus des bactéries probiotiques. En effet, Xu et al., (2011) ont suggéré que les fractions des exopolysaccharides de *Bifidobacterium animalis* RH ont des activités antioxydantes directes et puissantes. Aussi, Aguilar-Toalá et al., (2017), ont rapporté que des fractions peptiques dérivés de *Lb. plantarum* présentent une activité antioxydante élevée varie entre 282,8–362,3 µmol Équivalents de Trolox.

## II.2. Concentrations du glutathion réduit (GSH) et des groupements thiols (SH)

### II.2.1. GSH au niveau des extraits cellulaires des cinq bactéries lactiques

Les résultats obtenus concernant les concentrations du glutathion réduit au niveau des extraits des isolats lactiques sont illustrés dans la figure 5.



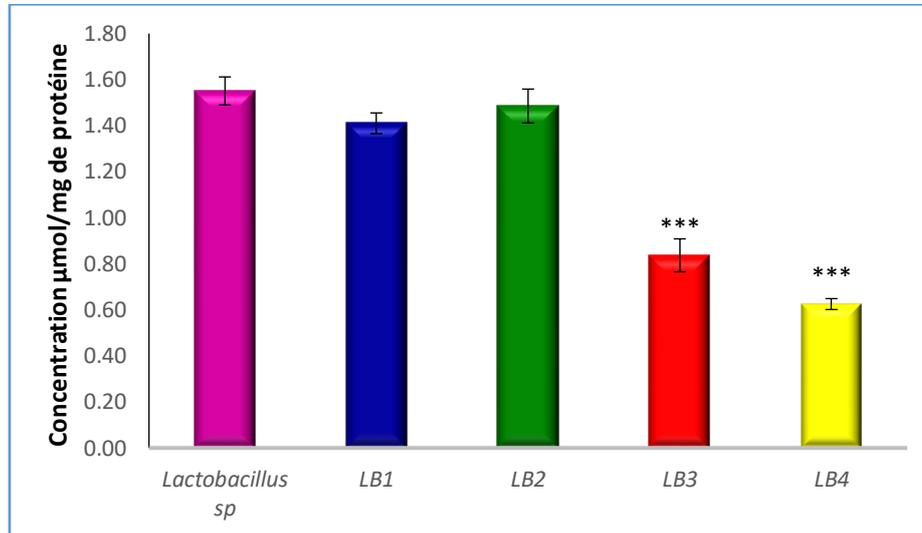
**Figure 5 :** Concentrations du GSH des extraits cellulaires de cinq bactéries étudiées  
(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne  $\pm$  ES de trois essais indépendants)  
(\*\*\*):LB3 et LB4 vs *Lactobacillus sp.* ; LB1 et LB2

Les concentrations du GSH au niveau des extraits cellulaires des isolats LB1 et LB2 sont quasi identiques à celles obtenues dans l'extrait cellulaire de la souche *Lactobacillus sp.* avec des taux de  $1,02 \pm 0,03$  et  $1,08 \pm 0,05$   $\mu\text{mol/mg}$ , respectivement.

Cependant, ces concentrations sont significativement supérieures à celles obtenues au niveau des extraits cellulaires des isolats LB3 et LB4. Avec des concentrations de  $0,6 \pm 0,05$  et  $0,44 \pm 0,01$   $\mu\text{mol/mg}$  protéines

### II.2.2. Dosage des groupements thiols

Les résultats obtenus concernant les groupements thiols sont représentées dans la figure 6.



**Figure 6 :** Groupements thiols des extraits cellulaires des souches étudiées (*Lactobacillus sp.* ; LB1 ; LB2 ; LB3 et LB4)

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne  $\pm$  ES de trois essais indépendants).

(\*\*\*):LB3 et LB4 vs *Lactobacillus sp.* ;LB1 et LB2

Les résultats du dosage des protéines thiols au niveau des extraits cellulaires des isolats lactiques, illustrés dans la figure 6, révèlent une différence significative entre les quatre isolats LB1 ; LB2 ; LB3 et LB4. Dont la plus faible concentration est observée chez l'isolat LB4, ce dernier enregistre de valeur de 0,62  $\mu\text{mol/mg}$  de protéines.

Cependant, ces taux sont significativement élevés au niveau des extraits cellulaires des isolats LB1 et LB2. Ont des valeurs de  $1,41 \pm 0,04 \mu\text{mol/mg}$  de protéines ;  $1,48 \pm 0,06 \mu\text{mol/mg}$ , respectivement.

Au cours de cette étude les résultats indiquent que les isolats lactiques issus du blé fermenté ont une capacité antioxydante in vitro puissante. Ces résultats confirment ceux obtenus par plusieurs études (Wiederholt et Steele, 1994 ; Yoon et Byun, 2004 ; Al-madboly et al., 2017). Selon Kullisaar et al., (2002), une souche de *Lb. fermentum* ME-3, est capable de produire et d'accumuler du GSH et de maintenir le rapport élevé de GSH/GSSG.

Aussi, une autre étude menée par **Kullisaar et ses collaborateurs, (2010)**, ces derniers ont confirmé que deux souches de *Lactobacillus fermentum* E3 et E18, produisent des teneurs importantes en GSH.

En outre, **Fernandes et Steele, (1993)**, ont affirmé que les quantités du Glutathion et des groupements thiols intracellulaires de certaines bactéries lactiques (*Lactococcus lactis ssp. cremoris* et *Streptococcus thermophilus*, et *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* varient entre 6 à 51 nmol/mg de protéines et 0,7 à 0,81 nmol/ mg de protéines, respectivement. Celles-ci sont largement inférieures à celle obtenue dans notre étude (**Fernandes et Steele, 1993**). **Su et ses collaborateurs en (2015)**, ont étudié l'évaluation des glutathions de plusieurs souches d'*Oenococcus oeni*. D'après leurs résultats, ces dernières présentent une concentration évaluée entre 0,83 et 7,23 nmol/mg de protéines dans un milieu de culture modifié (ATP).

De nombreuses études sur le pouvoir antioxydant des bactéries probiotiques ont été menées chez l'animal. Ainsi, une étude menée chez des rats carencés en vitamine E confirme l'effet antioxydant d'extraits cellulaires de *Lactobacillus* spp. SBT sur le statut antioxydant (**Kaizu et al., 1993**).

Une autre étude in vivo, des rats traités pendant 14 jours avec deux souches différentes de *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* (A13 et B3 ;  $10^{10}$ UFC/j) (**Coskun et al., 2010**). Le statut antioxydant des rats est amélioré par rapport à la population ne consommant aucune des deux souches probiotiques (augmentation significative du taux de GSH dans l'intestin grêle, pas de variation de la teneur en vitamine C).

Aussi dans une étude clinique réalisée par **Kullisaar et al., (2003)**, Ces chercheurs ont soumis pendant 21 jours de 21 volontaires sains au lait de chèvre fermenté ou non avec *Lb. fermentum* ME-3 ( $3 \times 10^{11}$  UFC/j). Les résultats obtenus indiquent, une diminution significative du statut redox (GSSG/GSH).

# *Conclusion et perspectives*

## Conclusion

---

---

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt pour leurs valeurs nutritionnelles et thérapeutiques dans les domaines agroalimentaires et pharmaceutiques. Parmi ces microorganismes bénéfiques, les bactéries lactiques à potentiel probiotique isolées à partir des aliments fermentés traditionnels occupent une place d'excellence et un choix à prendre en considération dans la stratégie préventive qui visent à la restauration du microbiote intestinal et à la réduction des maladies associées au stress oxydatif. Dans ce contexte, l'objectif de cette présente étude porte sur l'évaluation de l'activité antioxydante in vitro de quatre bactéries lactiques isolées à partir du blé fermenté.

Les résultats d'évaluation du pouvoir réducteur indiquent que l'isolat LB4 présente une activité réductrice du fer plus importante et significative en comparaison aux autres isolats lactiques du blé fermenté (LB1, LB2 et LB3). Néanmoins, ce pouvoir réducteur reste faible par rapport au pouvoir réducteur de la souche probiotique *Lactobacillus* sp.

Par ailleurs, les résultats d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro évaluée par le dosage du GSH montrent que les concentrations de GSH au niveau des extraits cellulaires des isolats LB1 et LB2 sont quasi identiques à celles obtenues dans l'extrait cellulaire de la souche *Lactobacillus* sp. avec des taux de  $1,02 \pm 0,03$  et  $1,08 \pm 0,05$   $\mu\text{mol/mg}$  de protéines, respectivement. Bien que, ces teneurs sont significativement supérieures à celles obtenues au niveau des extraits cellulaires des isolats LB3 et LB4. Avec des concentrations de  $0,6 \pm 0,05$  et  $0,44 \pm 0,01$   $\mu\text{mol/mg}$  de protéines, respectivement.

Parallèlement, les résultats du dosage des protéines thiols révèlent une différence significative entre les quatre isolats lactiques LB1 ; LB2 ; LB3 et LB4. Dont les plus faibles concentrations sont observées chez l'isolat LB4, ce dernier enregistre une valeur de  $0,62$   $\mu\text{mol/mg}$  de protéines. Cependant, ces taux sont significativement élevés au niveau des extraits cellulaires des isolats LB1 et LB2. Ont des valeurs de  $1,41 \pm 0,04$   $\mu\text{mol/mg}$  de protéines et  $1,48 \pm 0,06$   $\mu\text{mol/mg}$ , respectivement.

L'ensemble de ces résultats nous laisse suggérer que les bactéries lactiques issues du blé fermenté peuvent être proposées comme une solution alternative aux antioxydants synthétiques et être présentées comme un antioxydant puissant dans une optique d'un traitement préventif. Cependant, il est clair que des tests supplémentaires et des investigations plus profondes sont nécessaires à entreprendre afin de valider et consolider ces résultats. Les perspectives de cette présente étude visent à :

## *Conclusion*

---

---

- Identifier les isolats lactiques par la galerie api 50CH et par les techniques moléculaires telles que la PCR....
- Evaluer l'activité antioxydante en utilisant d'autres techniques comme la SOD, GPx, ABTS..
- Evaluer d'autres activités biologiques des isolats lactiques in vitro.
- Déterminer les propriétés probiotiques des isolats lactiques.
- Réaliser des études in vivo et cliniques afin d'évaluer et de valider l'effet antioxydant des isolats lactiques.

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

**A**

**Aguilar-Toalá, J. E., Santiago-López, L., Peres, C. M., Peres, C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., ... & Hernández-Mendoza, A. (2017).** Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 65-75.

**Ajao, O., Banwo, K., Ogunremi, O. et Sanni, A. (2021).** Propriétés antimicrobiennes et potentiels probiotiques des bactéries lactiques isolées du bœuf cru à Ibadan, au Nigeria. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 770-773.

**Al-Dalaen, S. M., & Al-Qtaitat, A. I. (2014).** American Journal of Bioscience and Bioengineering. *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2(5), 60-71.

**Al-Madboly, L. A., Khedr, E. G., & Ali, S. M. (2017).** Optimization of reduced glutathione production by a *Lactobacillus plantarum* isolate using Plackett–Burman and Box–Behnken designs. *Frontiers in Microbiology*, 8, 772.

**Ayyanna, R., Ankaiah, D., & Arul, V. (2018).** Anti-inflammatory and antioxidant properties of probiotic bacterium *Lactobacillus mucosae* AN1 and *Lactobacillus fermentum* SNR1 in Wistar albino rats. *Frontiers in microbiology*, 9, 3063.

**B**

**Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996).** The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.

**Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.

**C**

**Coskun, S., B. Aslim and Z. Yuksekdog (2010).** Effect of two strains of *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* on nitric oxide generation and antioxidant status of rat small intestine. *Medicinal Chemistry Research*, 19(9), 1082-1091.

**D**

**Djadouni, F. (2013).** Evolution de l'activité antimicrobienne des isolats des bactéries lactiques et détermination des spectres d'action de leurs biopeptides vis-à-vis des germes d'altération. Thèse de doctorat .Université d'Oran, Es-Sénia, p 199.

**Drouault-Holowacz, S., Foligné, B., Dennin, V., Goudercourt, D., Terpend, K., Burckel, A., & Pot, B. (2006).** Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolerance: in vitro and in vivo considerations. *Clinical Nutrition*, 25(6), 994-1003.

**F**

**Faure, P., & Lafond, J. L. (1995).** Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In *Analysis of free radicals in biological systems* (pp. 237-248). Birkhäuser Basel.

**Fernández, L., & Steele, J. L. (1993).** Glutathione content of lactic acid bacteria. *Journal of dairy science*, 76(5), 1233-1242.

### **H**

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

### **I**

**Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018).** First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.

### **J**

**Jain, N. E. H. A., & Mehta, A. R. C. H. A. N. A. (2017).** The unexplored roles of probiotic Bacteria: In vitro anti-inflammatory and anthelmintic activity of *Enterococcus faecium* Bm10 KY788342 and *Lactobacillus casei* GM10 KY794586. *Asian J Pharm Clin Res*, 10(9), 117-119.

### **K**

**Kaizu, H., M. Sasaki, H. Nakajima and Y. Suzuki (1993).** Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2493-2499.

**Khan, A. N., Yasmin, H., Ghazanfar, S., Hassan, M. N., Keyani, R., Khan, I., ... & Ahmad, A. (2021).** Antagonistic, Anti-oxidant, Anti-inflammatory and Anti-diabetic Probiotic Potential of *Lactobacillus agilis* Isolated from the Rhizosphere of the Medicinal Plants. *Saudi journal of biological sciences*, 28(11), 6069-6076

**Kim, D. Y., Kim, H. S., Yoo, J. S., Cho, Y. A., & Kim, C. H. (2020).** Antioxidant activity of lactic acid bacteria isolated from Korean traditional food kimchi. *Journal of Dairy Science and Biotechnology*, 38(2), 89-98.

**Kornienko, J. S., Smirnova, I. S., Pugovkina, N. A., Ivanova, J. S., Shilina, M. A., Grinchuk, T. M., ... & Lyublinskaya, O. G. (2019).** High doses of synthetic antioxidants induce premature senescence in cultivated mesenchymal stem cells. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.

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

**Kullisaar, T., E. Songisepp, M. Mikelsaar, K. Zilmer, T. Vihalemm and Zilmer M. (2003).** "Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *The British Journal of Nutrition*, **90**(2), 449-56.

**Kullisaar, T., Songisepp, E., Aunapuu, M., Kilk, K., Arend, A., Mikelsaar, M., ... & Zilmer, M. (2010).** Complete glutathione system in probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3. *Applied biochemistry and microbiology*, **46**(5), 481-486.

### **L**

**Liu, C. F.; Tseng, K. C.; Chiang, S. S.; Lee, B. H.; Hsu, W. H.; Pan, T. M. (2011).** Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus exopolysaccharides*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**, (12), 2284-2291.

**Liu, Y., Chen, H., Chen, W., Zhong, Q., Zhang, Q., Zhang, G., & Chen, W. (2018).** Beneficial effects of tomato juice fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* : Antioxidation, antimicrobial effect, and volatile profiles, *Molecules*, **23** (9), 2366.

### **M**

**Makhloufi, K. M. (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza ,Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

### **O**

**Oh, N. S., Joung, J. Y., Lee, J. Y., & Kim, Y. (2018).** Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. *PLOS ONE*, **13**(2), e0192021.

### **P**

**Panicker, V.P, George, S., Dhanush Krishna, B.(2014).**Toxicity study of butylated hydroxyl toluene (BHT) in rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. ,**3**(8),758-763.

### **R**

**Rudyk, O., & Eaton, P. (2014).** Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox Biology*, **2**, 803–813.

### **S**

**Sanchez C.(2017).** Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology*.,**2**:13-22.

**Shah, P., & Modi, H. A. (2015).** Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity. *Int. J. Res. Appl. Sci. Eng. Technol*, **3**(6), 636-641.

**Shokryazdan, P., Jahromi, M. F., Bashokouh, F., Idrus, Z., & Liang, J. B. (2017).** Antiproliferation effects and antioxidant activity of two new *Lactobacillus* strains. *Brazilian Journal of Food Technology*, 21(0).

**Socrier, L. (2017).** Influence de la localisation d'antioxydants sur la peroxydation des lipides membranaires: étude du mode d'action de dérivés PBN et de composés phénoliques. Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne.

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

**V**

**Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004).** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1), 37-56.

**W**

**Wiederholt, K. M., and Steele, J. L. (1994).** Glutathione accumulation in Lactococci. *Journal of Dairy Sciences*, 77, 1183–1188. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77056-9

**X**

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

**Y**

**Yadav, R and Shukla, P. (2017).** Probiotics for human health: in current progress and applications. *Recent advances in applied microbiology*, 133-147

**Yoon, Y. H., and Byun, J. R. (2004).** Occurrence of glutathione sulphydryl(GSH) and antioxidant activities in probiotic *Lactobacillus* spp. *Asian Australas Journal of Animal Sciences*, 17, 1582–1585

**Z**

**Zago, M., Massimiliano, L., Bonvini, B., Penna, G., Giraffa, G., & Rescigno, M. (2021).** Functional characterization and immunomodulatory properties of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from Italian hard cheeses. *Plos one*, 16(1), e0245903.

# ***ANNEXES***

### Annexe I. Probiotique Lactibiane tolérance®

Lactibiane Tolérance est un complément alimentaire composé de 5 souches Bactériennes concentrées à  $10^{10}$  UFC par sachet :

- *Bifidobacterium lactis* LA 303
- *Lactobacillus acidophilus* LA 201
- *Lactobacillus plantarum* LA 301
- *Lactobacillus salivarius* LA 302
- *Bifidobacterium lactis* LA 304



L'ensemble des 5 souches sélectionnées pour Lactibiane Tolérance® répond à tous nos critères de qualité :

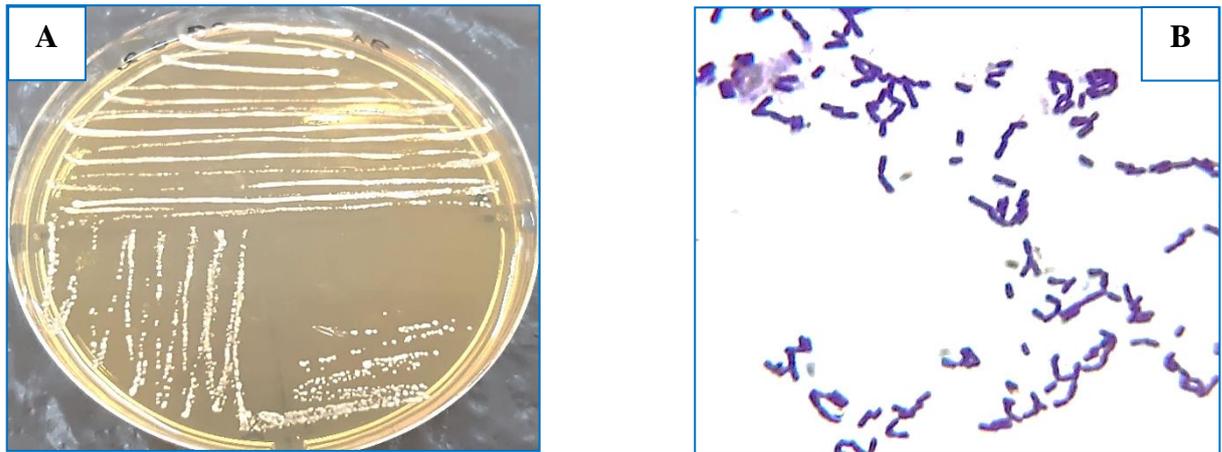
- Absence de pathogénicité pour l'homme
- Viabilité des souches et survie dans le tube digestif
- Adhésion aux cellules épithéliales intestinales
- Modulation des réponses immunitaires
- Effets souche et dose dépendants

### Annexe II. Composition de milieu MRS Liquide (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

- Peptone bactériologique.....10g
- Extrait de viande.....8,0g
- Extrait autolytique de levure.....4,0g
- Glucose.....20g
- Tween.....80g
- Phosphate dipotassium.....2,0g
- Acétate de sodium.....5,0g
- Citrate d'ammonium.....2,0g
- Sulfate de magnésium..... 2,0g
- Sulfate de manganèse ..... 0.05g

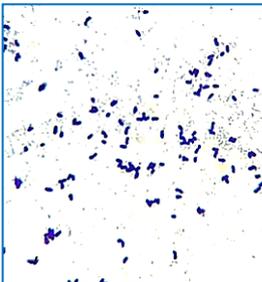
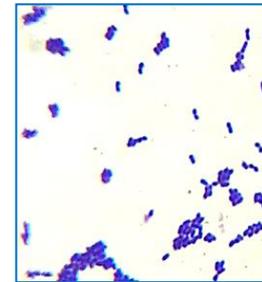
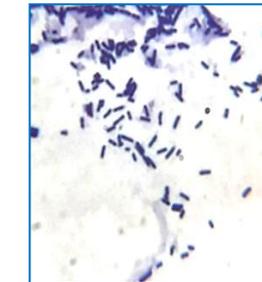
Stérilisation à 121°C Pendant 15min pH 6,2

**Annexe III. Aspects macroscopiques et microscopiques des bactéries étudiées**



**Figure 1 :** Aspects macroscopique (A) et microscopique (B) de *Lactobacillus* sp. (souche probiotique de référence)

**Tableau 1.** Caractères morphologiques des isolats lactiques à partir du blé fermenté

Isolats	<i>LB1</i>	<i>LB2</i>	<i>LB3</i>	<i>LB4</i>
Aspect macroscopique				
Aspect microscopique				

**Annexe IV. Préparation du tampon phosphate pH 7,4 (PBS)**

0,68g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  .....250ml eau distillée

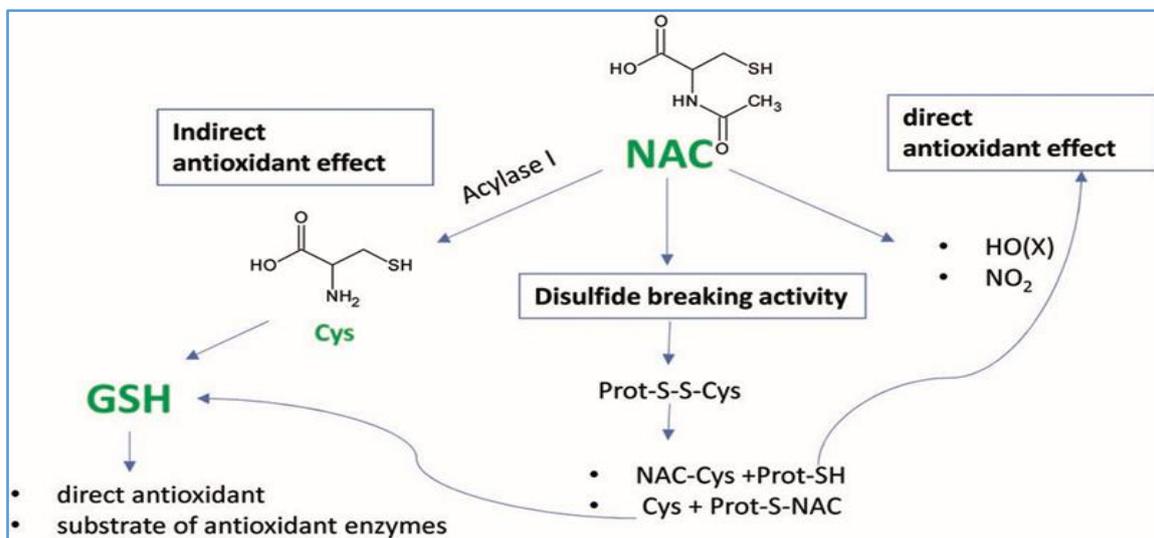
1,14g de  $\text{K}_2\text{HO}_4$  .....250ml eau distillée

Mélanger 250 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 250 ml de  $\text{K}_2\text{HO}_4$ , la solution est ajustée à pH 7,4

**Annexe V. Composition du tampon de lyse pH= 7,2**

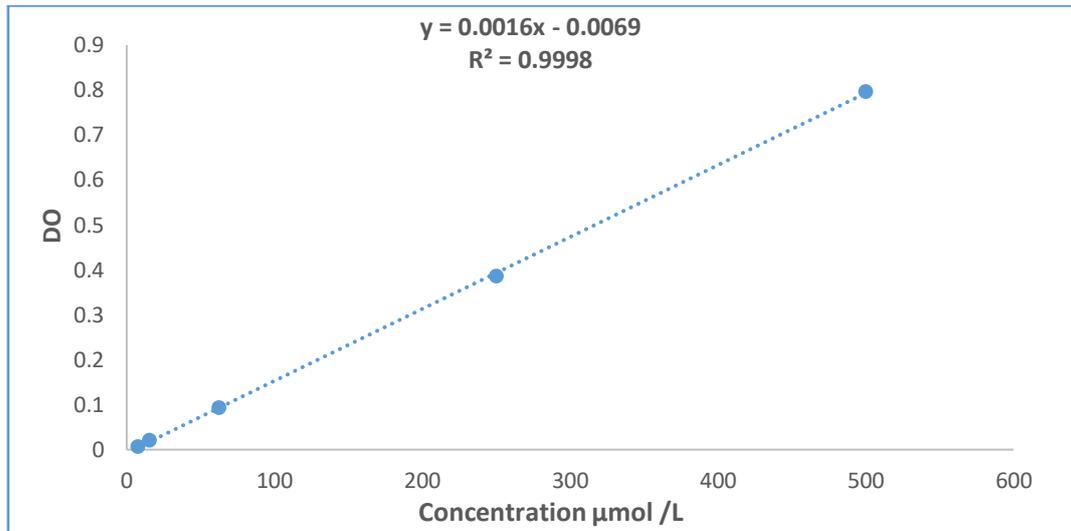
- NaCl ..... 8g
- KCl..... 0,2g
- $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ..... 2,9g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ..... 0,2g
- $\text{MgCl}_2$ ..... 0,1g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ..... 0,132g

**Annexe VI. Différentes voies de l'activité antioxydante de NAC**



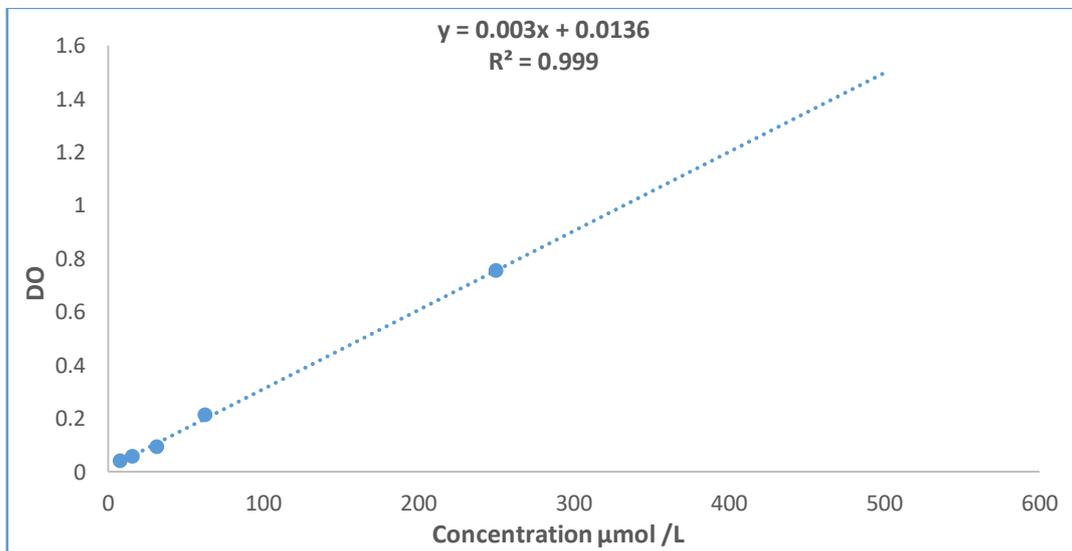
**Figure 2:** Activité antioxydante de NAC (Aldini et al., 2018).

**Annexe VII. Courbes d'étalonnage pour l'évaluation de FRAP**

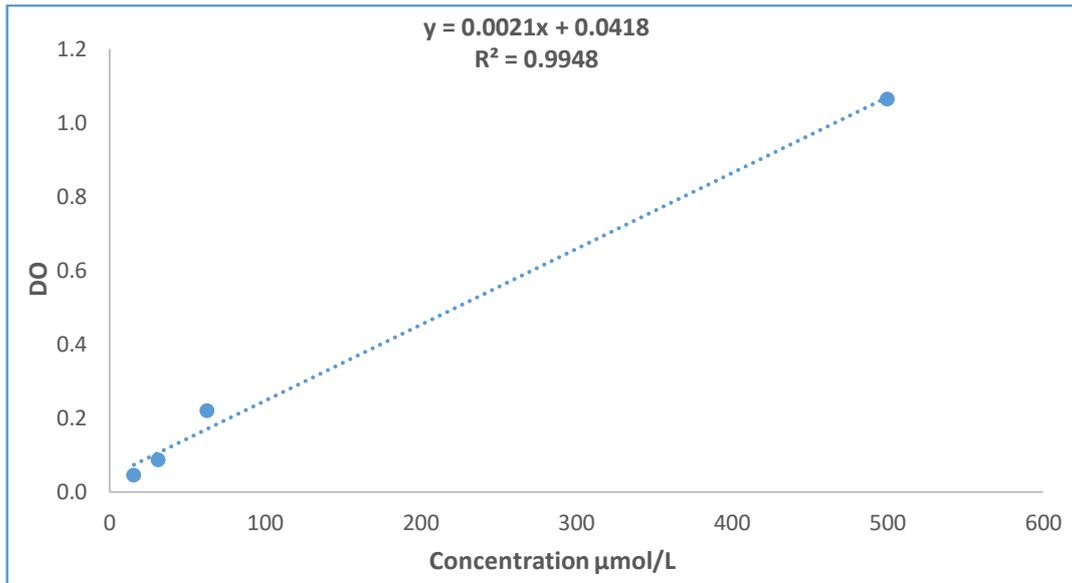


**Figure 3 :** Courbe d'étalonnage de FeSO<sub>4</sub> à 593nm

**Annexe VIII. Courbes d'étalonnage pour l'évaluation du Glutathion et des groupements thiols:**

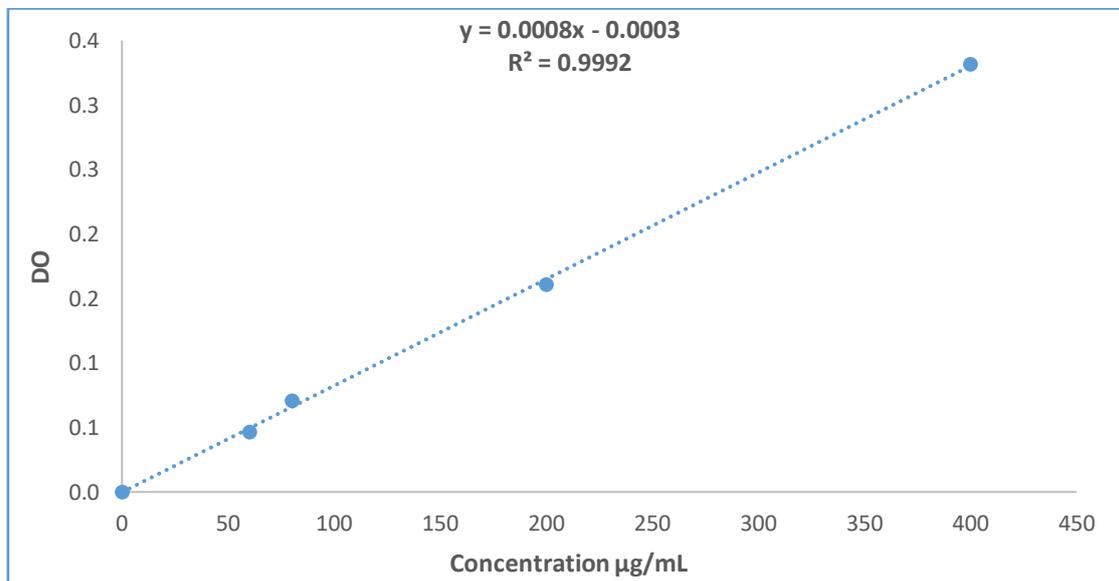


**Figure 4 :** Courbe d'étalonnage du glutathion réduit à 412 nm



**Figure 5 :** Courbe d'étalonnage de N-acétylcystéine à 412 nm.

**Annexe IX. Courbe d'étalonnage pour le dosage de protéines**



**Figure 6:** Courbe d'étalonnage de BSA à 595 nm

### Résumé :

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, en raison de leurs multiples propriétés bénéfiques, qui semblent relativement associées à leurs activités antioxydantes. C'est dans cette optique que s'inscrit notre étude basée sur l'évaluation de l'activité antioxydante de quatre isolats lactiques issus du blé fermenté. L'activité antioxydante a été évaluée par les techniques du pouvoir réducteur ferrique (FRAP), dosage du glutathion et des groupements thiols. Les résultats d'évaluation du pouvoir réducteur montrent que l'isolat LB4 présente une activité réductrice ferrique plus importante et significative en comparaison aux autres isolats lactiques (LB1, LB2 et LB3). Par ailleurs, les résultats de détermination des concentrations du GSH et des groupements SH montrent que les deux isolats LB1 et LB2 dévoilent des taux très élevés en glutathion et en groupements thiols. On note respectivement pour le glutathion:  $1,02 \pm 0,03$  et  $1,08 \pm 0,05$   $\mu\text{mol/mg}$  de protéines. Il va de même pour les groupements SH, on constate respectivement :  $1,41 \pm 0,04$  et  $1,48 \pm 0,06$   $\mu\text{mol/mg}$  de protéines. Ces résultats laissent à suggérer que les isolats lactiques issus du blé fermenté ont un potentiel antioxydant puissant et présentent de bons candidats probiotiques.

**Mots clés :** Bactéries lactiques, probiotique, activité antioxydante, blé fermenté, stress oxydatif.

### ملخص :

تستخدم بكتيريا حمض اللاكتيك على نطاق واسع في الصناعات الغذائية والدوائية ، نظرا لخصائصها المفيدة المتعددة ، والتي يبدو أنها مرتبطة نسبيا بأنشطتها المضادة للأكسدة. مع وضع ذلك في الاعتبار ، تم إدراج دراستنا القائمة على تقييم النشاط المضاد للأكسدة لأربعة عزلات لبنية من القمح المخمر. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة من خلال تقنيات القوة الارجاعية للحديد (FRAP) ، وتحديد مجموعات الجلوتاثيون والثيول. تظهر نتائج تقييم الطاقة المخفضة أن عزل LB4 له نشاط أكبر وكبير للحد من الحديد مقارنة بعزلات اللاكتيك الأخرى (LB1 و LB2 و LB3).. بالإضافة إلى ذلك ، تظهر نتائج تحديد تركيزات GSH ومجموعات SH أن العزلات LB1 و LB2 يكشفان عن مستويات عالية جدا من مجموعات الجلوتاثيون والثيول. ويلاحظ تركيز الجلوتاثيون على التوالي :  $1.02 \pm 0.03$  و  $0.05 \pm 1.08$  ميكرومول / ملغ من البروتين. وينطبق الشيء نفسه على مجموعات SH ، نجد على التوالي:  $1.41 \pm 0.04$  و  $0.06 \pm 1.48$  ميكرومول / ملغ من البروتين. تشير هذه النتائج إلى أن بكتيريا حمض اللاكتيك التي عزلت من القمح المخمر له إمكانات قوية مضادة للأكسدة ولديها ترشحات جيدة ليكون بروبيوتيك.

**الكلمات الدالة:** بكتيريا حمض اللاكتيك، البروبيوتيك، النشاط المضاد للأكسدة، القمح المخمر، الإجهاد التأكسدي.

### Abstract:

Lactic acid bacteria are widely used in the food and pharmaceutical industries, due to their multiple beneficial properties, which seem to be relatively associated with their antioxidant activities. This study aimed to assess the antioxidant activity of four lactic isolates from fermented wheat. The antioxidant activity was evaluated by ferric reducing power techniques (FRAP), determination of glutathione and thiol groups. The results of the reducing power assessment show that LB4 isolate has a greater and significant ferric reducing activity compared to other lactic isolates (LB1, LB2 and LB3).. In addition, the results of the determination of the concentrations of GSH and the SH groups show that the two isolates LB1 and LB2 reveal very high levels of glutathione and thiol groups. Glutathione is noted respectively:  $1.02 \pm 0.03$  and  $1.08 \pm 0.05$   $\mu\text{mol/mg}$  of protein. The same goes for the HS groups, we find respectively:  $1.41 \pm 0.04$  and  $1.48 \pm 0.06$   $\mu\text{mol/mg}$  of protein. These results suggest that lactic acid isolates from fermented wheat have potent antioxidant potential and have good probiotic candidates.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, probiotic, antioxidant activity, fermented wheat, oxidative stress.

