



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^{elle} Benaraba Sara

M^{elle} Tamerdjane Nouha Fatima zohra

M^{elle} Zerrougui Ikram

Thème

**Evaluation de l'activité antiradicalaire *in vitro*
d'une bactérie lactique « *probiotique* »**

Soutenu publiquement le 30/06/2022

Jury :

- **Présidente :** M^{me} MADJEBER N
- **Encadrante :** M^{me} BENARABA. R
- **Co-encadrante :** M^{me} BENGUIAR. R
- **Examineur:** Mr. ABBAS A.H

Grade :

MCA
Pr
MCA
MCB

Année universitaire 2021/2022



Remerciements

Avant tout, nous remercions "Allah" le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite

*Nos vifs remerciements et profonde gratitude s'adressent à notre promoteur **Mme Benaraba R**, qui nous dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa patience, ses conseils, sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans lui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Ainsi nous tenons à remercions notre Co-promoteur **Mme Benguiair R**, d'avoir accepté de nous diriger ainsi pour ses précieux conseils, ses orientations, pour tous son aide.*

*Nous tenons particulièrement à remercier les membres du jury **Mme. Medjeber. N** et **Dr. Abbas AH** d'avoir accepté de juger ce travail.*

Un chaleureux remerciement à nos parents pour leur amour inestimables, leurs Confiances, leurs soutiens, leurs sacrifices et leurs encouragements.

*Nos sincères remerciements aux membres de l'équipe du laboratoire d'Amélioration et de Valorisation des Productions Animales Locales
Surtout **Mme Abdellah Fatiha**, merci **Mlle Ayad Noura**
Aide et encouragements.*

Nous souhaiterons également remercier nos professeurs de la faculté des sciences de la nature et de la vie pendant les cinq années du notre parcours.



Dédicace

*A l'aide de **Dieu** tout puissant, de m'avoir donné le courage, la santé, et m'a accordé son soutien durant les périodes les plus difficiles. Qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :*

*A mes très chers **parents**, que j'admire beaucoup, qui m'ont toujours aidé dans ma vie et qui n'ont cessés de m'encourager et de me soutenir tout au long de mes études, que Dieu les garde en bonne santé et bonheur.*

*A mon très cher **frère** et mes adorables **sœurs** pour leurs tendresses et leurs permanentes présence à mes côtés*

*Aux petites enfants de la famille : **Ramzi, Loudjaine, Mohammed, Nassim, Sanaa, Maram***

*À mes binôme **Ikram** et **Nouha** qui sont partagées avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail.*

Je remercie toutes les personnes que je n'ai pas pu citer leurs noms ici, et qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

*Sans oublier mes braves Amies de la promotion Master II Microbiologie appliquée
À tous ceux qui aiment la science.*

Sarah





Dédicace

*Avant toute chose je remercie **Allah** le tout puissant de m'avoir donné la Santé, la patience et le courage pour réaliser ce travail.*

J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à :

***Ma mère, Fouzia** je ne te remercierai jamais assez pour tout l'amour sans égal que tu m'apportes. Tu as été toujours présente à mes côtés, tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie.*

***Mon père, ABDELKADER**, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi... Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*Mes chères frères **Mohamed Achraf, Yacine et Abd llatif EL ghifaria et khalil** qui ont étaient toujours avec moi avec leurs aides et soutiens.*

*Mes binôme **Nouha et Sara** qui ont partagé avec moi les moments difficiles de ce travail.*

*Mes très chères amies **Imene, Rofaida et Fouad**. Pour leur présence à mes côtés.*

*A tous mes enseignants pour m'avoir tout donnée, ce qui est inestimable, le savoir et le savoir-faire, spécialement à ^{Mme} **BENARABA Rachida** pour son encadrement.*

Et en fin à toute la promotion de Master II de microbiologie appliquée 2021 /2022.

*Je cite à part le groupe de **BOUABDELLI Mohamed, BOUGHADDOU Djilali et DAOUD Bakir**.*

*Et le groupe de **BELALEM Fethi, ABDI Dalila et ABDERRHEM Sara** Pour tous les bons moments que nous avons partagés.*

Ikram



Dedicace



Avant toute chose je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la Santé, la patience et le courage pour réaliser ce travail.

À mes très cher parents Mr Tamerdjane Abdelkader et Khadraoui Kheira Qui m'ont soutenu jusqu'à présent, que Dieu vous bénisse davantage.

*À mes très cher frères et sœurs Chaimaa, Mohamed, Moussa, Alaa, Abdelbasset merci pour votre soutien moral, sans vous je n'y arriverai pas. Je désire remercier Madame **BENARABA.R**, qui nous a encadrées depuis les*

Premiers instants pour m'avoir donné la chance d'effectuer mes travaux de Recherche dans son laboratoire.

Je vous remercie pour tout le temps et l'aide que vous m'avez consacré et plus

Particulièrement pour la confiance et la liberté que vous m'avez accordées dans

*La gestion de mon projet de recherche et Madame **BENGUIAR.R**, pour nous*

Avoir fait l'honneur d'être notre Co-promotrice.

*À mes trinômes, **Ikram** et **Sara** pour tout ce qu'on a eu à partager Votre prédisposition à travailler en équipe et votre complicité a été de beaucoup dans l'achèvement de ce travail.*

À mes copines Rofaida et Imen, merci pour vos soutiens et encouragements.

*Enfin à mes très chers collègues **Mohamed, Djilali, Bakri** et **Fethi, Sara, Dalila** pour tous ces bons moments qu'on a eu à partager sous le signe d'une amitié pérenne Je vous en remercie pour tout.*

Nouha



LISTE DES ABREVIATIONS

AG :	Acide gallique
BHT :	Butylhydroxytoluène
DPPH :	2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl
EPS :	Exopolysaccharides
ERO :	Espèces réactives d'oxygène
K₂HPO₄ :	Phosphate de potassium dibasique
KH₂PO₄ :	Phosphate de potassium monobasique
LAB :	Bactéries lactiques
LB1 :	Isolats 1 de blé fermenté
LB2 :	Isolats 2 de blé fermenté
LB3 :	Isolats 3 de blé fermenté
LB4 :	Isolats 4 de blé fermenté
MDA :	Malondialdéhyde
MeOH :	Méthanol
MRS:	Man-Rogosa et Sharp
Na₂HPO₄ :	Hydrogénophosphate de sodium
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PI :	Pourcentage d'inhibition
P/V :	Poids / volume
ROS :	Reactive oxygen Species
Sp :	Espèce non identifiée
TBARS :	Thiobarbiturique Acide Réactive Substance
TCA :	L'acide trichloracétique
TEP :	1, 1, 3,3 tétraéthoxypropane
UFC :	Unité Formant Colonie

LISTE DES FIGURES

Figure n° 1 : Organigramme récapitulatif du protocole expérimental.....	6
Figure n° 2 : Réaction chimique relative à la réduction du radical DPPH°.....	8
Figure n° 3 : Formation du complexe malondialdéhyde/ Acide thiobarbiturique de couleur rose	10
Figure n° 4 : Activité du piégeage du radical DPPH° par la souche de référence <i>Lactobacillus sp</i> et les isolats lactiques LB1, LB2, LB3, LB4.....	14
Figure n° 5 : Pourcentage d'inhibition des MDA par la souche de référence <i>Lactobacillus sp</i> et les isolat lactiques LB1, LB2, LB3, LB4	16

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n° 1 : Matériel, milieux de culture et produits chimiques utilisés	4
---	---

LISTE DES ANNEXES

Annexe n° 1 : Description et composition du LACTIBIANE Tolérance	29
Annexe n° 2 : Composition du milieu MRS liquide (de De Man Rogosa et Sharpe).....	29
Annexe n° 3 : Aspects macroscopique et microscopique des isolats lactiques issus de blé fermenté sur gélose MRS après coloration de Gram (Objectifx100).....	30
Annexe n° 4 : Préparation de 500 ml de solution de tampon PBS (1X)	30
Annexe n° 5 : Préparation de 50 ml de la solution de DPPH.....	30
Annexe n° 6 : Courbe d'étalonnage pour l'évaluation de l'activité antioxydante par le biais de la technique TBARS.....	31
Annexe n° 7 : Effet protecteur de l'acide gallique contre la peroxydation lipidique.....	32
Annexe n° 8 : Effet protecteur de la souche de référence <i>Lactobacillus sp</i> et des isolats lactiques contre la peroxydation lipidique.....	32

TABLE DES MATIERES

Remerciement	
Dédicaces	
Liste des abréviations.....	i
Liste des figures	iii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des annexes.....	v
Introduction	
Chapitre I : Matériel et méthodes	
I.1 Objectif de l'étude	3
I.2 Lieu et durée de la démarche expérimentale	3
I.3 Matériel et produits chimiques	3
1.4 Matériel biologique	5
I.4.1 Matériel végétal	5
I.4.2 Souches bactériennes utilisées	5
1.4.2.1 Mélange de probiotiques	5
1.4.2.2 Isolats lactiques	5
I.5 Procédure expérimentale	5
I.6 Isolement, purification et réidentification des isolats lactiques	7
I.7 Revivification des isolats lactiques	7
I.8 Evaluation de l'activité antioxydante des isolats lactiques	7
I.8.1 Préparation des suspensions des isolats lactiques (cellules intactes)	7
I.8.2 Capacité des isolats lactiques à piéger le radical libre 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH)	8
I.8.3 Effet préventif, <i>in vitro</i>, des isolats lactiques vis à vis de la peroxydation lipidique induite	9
I.8.3.1 Induction de la peroxydation lipidique <i>in vitro</i>	9
I.8.3.2 Evaluation de la peroxydation lipidique	9

Chapitre II : Résultats et discussions

I.9 Analyse statistique	11
II.1. Evaluation de capacité de Piégeage des radicaux libres par 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH)	13
II.2 Evaluation de l'effet préventif des souches isolées vis à vis de la peroxydation lipidique	15
Conclusion et Perspectives	19
References bibliographies	
Annexes	
Résumé	
الملخص	

Introduction

De nos jours, l'évolution vers une alimentation raffinée industrialisée de synthèse, riche en calories mais pauvre en micronutriments et éléments essentiels entraîne des complications pouvant induire une détérioration de la santé conduisant à long terme à des pathologies lourdes, (neurodégénératives, cardiovasculaires, cancéreuses. C'est pour cette raison, le besoin de nouvelles mesures de santé préventives basées sur l'utilisation de produits d'origine naturelle et/ou biologique, sûrs, efficaces et bénéfiques, à stimuler de manière exponentielle la recherche scientifique. Au cours de ces dix dernières années celle-ci s'est intéressée particulièrement aux probiotiques des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquates, confèrent un bien être pour la santé de l'hôte au-delà des effets nutritionnels et additionnels. Ils sont des acteurs incontournables du développement et d'innovation dans les domaines des industries agro-alimentaire et pharmaceutique **(Shi et al., 2016)**.

Actuellement leurs effets positifs sur la santé de l'homme et de l'animal sont largement admis; parmi leurs effets bénéfiques l'amélioration de la valeur nutritionnelle des produits alimentaires, le contrôle et la réduction du cholestérol sérique, renforcement du système immunitaire, la prévention des infections intestinales, l'amélioration du transit intestinal, la réduction des symptômes de l'intolérance au lactose, la réduction du risque de cancer du côlon, et l'amélioration de la digestion de la gliadine contre la maladie cœliaque dans les aliments contenant du gluten **(Kechagia et al., 2013 ; Zendeboodi et al., 2020)**. Un certain nombre de micro-organismes sont actuellement reconnus et utilisés comme probiotiques. Cependant le degré de l'efficacité des probiotiques dépend essentiellement des souches probiotiques en question. Les plus couramment utilisées et vantées pour leurs propriétés bénéfiques particulièrement sur le microbiote intestinal sont les bactéries lactiques à l'instar de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* **(Emiliano et al., 2014)**. Ces bactéries constituent l'un des groupes de microorganismes le plus largement utilisé dans la production de divers types d'aliments fermentés. Ces micro-organismes sont très diversifiés caractérisés par leur capacité de fermenter les sucres (principalement le glucose) en acide. Le principal produit de la réaction est l'acide lactique. Elles fermentent différents types de produits : lait, fruits, légumes, céréales, poissons, viandes etc. Elles peuvent être retrouvées dans l'estomac et les intestins d'animaux et des êtres humains ou dans l'environnement. Leur capacité d'adaptation et de survie à une grande variété d'environnement est sans doute à l'origine de leur grande diversité de métabolismes. Elles sont classées en deux catégories selon leur voie de métabolisation des glucides : homo-fermentaire (ou homolactique) ou hétéro-fermentaire (ou hétéro-lactique) **(Felis et al., 2015)**. Pendant la fermentation, les bactéries lactiques synthétisent un certain nombre de composés, tels que les Exo-polysaccharides, les composés aromatiques, les acides organiques..., qui permettent d'allonger la durée de

conservation de l'aliment et d'améliorer les propriétés sanitaires, sensorielles et nutritionnelles et d'augmenter la capacité antioxydante de l'aliment fermenté. Cette augmentation est due principalement à la dépolymérisation de composés phénoliques (**Lortal et al., 2020**).

Depuis des millénaires et à l'échelle internationale, les aliments fermentés existent dans notre diète. Ces aliments « vivants », façonnés par des micro-organismes, représentent environ un tiers de la nourriture dans le monde (**Tamang et Kailasapathy., 2010**). En Algérie, le blé fermenté traditionnel appelé Hamoum, une denrée alimentaire ancestral, obtenu après une fermentation naturelle dans un grenier souterrain appelé Matmora, est considéré comme un aliment ayant des propriétés préventives contre les complications physiopathologiques intestinales (**Benmehel et al., 2019**). Plusieurs bactéries lactiques caractérisent cette denrée alimentaire, elles appartiennent essentiellement aux genres *Lactobacillus* (69 %), *Pediococcus* (15%), *Leuconostoc* (8%) et *Enterococcus* (8%) (**Tahlaïti et al., 2017**).

Vue la masse microbienne qui le caractérise et sa composition en métabolites spécifiques, le blé fermenté est censé avoir un impact sur la santé et prévenir les pathologies à désordres métaboliques en lien avec la nutrition (syndrome métabolique, hypertension artérielle, maladies cardiovasculaires) et les pathologies digestifs (intolérances digestives, allergies, maladies inflammatoires intestinales). Ces pathologies sont caractérisées par un désordre oxydatif accru (**LeLay et al., 2014**), cependant les répercussions bénéfiques du blé fermenté sur ce déséquilibre oxydatif ne sont pas clairement élucidées. Actuellement on suggère que cette capacité antioxydante peut dépendre de l'écosystème microbien de cet aliment. Cet écosystème peut être constitué de souches bactériennes ayant un potentiel antioxydant à vertus thérapeutiques et peut influencer la capacité antioxydante globale de l'aliment fermenté.

Dans ce contexte et dans le but d'une valorisation biologique de cet aliment utilisé ancestralement dans le l'ouest algérien, ce présent travail vise à évaluer l'activité antioxydante de quatre bactéries lactiques isolées du blé naturellement fermenté, afin d'envisager la possibilité de leur utilisation dans le domaine biotechnologique (conservation des aliments, souches starters...) ou bien dans les stratégies nutritionnelles préventives contre les pathologies chroniques à stress oxydatif.

Partie expérimentale

Chapitre I

Matériel et Méthodes

I.1 Objectif de l'étude

Cette présente étude s'intéresse à évaluer l'activité antioxydante de quatre bactéries lactiques isolées d'un aliment traditionnel : le blé naturellement fermenté. Le pouvoir antioxydant de ces isolats a été mesuré via leurs capacités de piéger le radical libre DPPH ainsi que leurs effets protecteurs vis-à-vis des altérations oxydatives lipidiques. Et de sélectionner la souche ayant le potentiel antioxydant le plus important et susceptible. L'activité antioxydante des 4 isolats a été comparée à celle d'une souche lactique probiotique, choisie comme référence, isolée d'un complément alimentaire commercialisé sous le nom de Lactibiane®.

I.2 Lieu et durée de la démarche expérimentale

La démarche expérimentale associée à cette étude a été réalisée durant la période allant du 08 février jusqu'à 20 Avril 2022, elle a été effectuée au sein des Laboratoires suivants :

-Laboratoire de recherche Amélioration et Valorisation des Productions Animales Locales (LAVPAL) de l'institut des Sciences Vétérinaires « *Université Ibn Khaldoun de Tiaret* »

-Laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie « *Université Ibn Khaldoun de Tiaret* ».

I.3 Matériel et produits chimiques

Les différents appareils, produits chimiques, milieux de culture et réactifs nécessaires à la réalisation de la partie expérimentale sont répertoriés dans le tableau suivant :

Tableau n° 1 : Matériel, milieux de culture et produits chimiques utilisés

Produits chimiques, Réactifs et Milieux de culture	Matériel et Appareillage
<p>-Acide galique (C₇H₆O ; PM=170,12g/mol)</p> <p>-Acide thiobarbiturique (TBA), PM =144,15g/mol).</p> <p>-Acide trichloracétique (TCA), PM=163,38 g/mol</p> <p>-BHT (2, 6-di-tert-butyl-4-méthylphénol, PM =220,35046g/mol).</p> <p>-Butanol-1 (C₄ H₁₀ O, PM= 74,121 g/mol)</p> <p>-Chlorure d'hydrogène (Hcl) à 36%, PM=36,461g/mol.</p> <p>-Chlorure de potassium (Kcl PM=74 ,55 g/mol).</p> <p>-Chlorure de sodium (Nacl PM=58 ,44 g/mol).</p> <p>-DPPH (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle C₁₈H₁₂N₅O₆ ; PM= 394.32 g/mol).</p> <p>-Dihydrogénophosphate de sodium (NaH₂PO₄ PM= 119,98 g/mol).</p> <p>-Hydrogénophosphate de sodium (Na₂HPO₄, PM= 119.98 g/mol)</p> <p>-Méthanol (CH₃OH) %.</p> <p>-Sulfate de cuivre (CuSO₄), PM=159,609 g/mol</p> <p>-Phosphate de potassium monobasique (KH₂PO₄), PM=136,09 g/mol</p> <p>-Phosphate de potassium dibasique (K₂HPO₄) PM=228,23 g/ mol</p> <p>-TEP(1,1,3,3tétraéthoxypropane), PM=220,3g/mo</p> <p>-Milieu MRS (bouillon et gélose)</p>	<p>-Agitateur magnétique (IKAMAG)</p> <p>-Bain marie (GFL)</p> <p>-Balance analytique (OHAUS)</p> <p>-Centrifugeuse (SIGMA 3K10)</p> <p>-Distillateur (Boeco WS 3500)</p> <p>-Incubateur (Heraeus instruments)</p> <p>-pH-mètre (starter2100)</p> <p>-Sonicateur (Bandelinsonorex)</p> <p>-Spectrophotomètre UV (OPTIZEN 1412V)</p> <p>-Vortex (Techno)</p> <p>-Bec Bunsen</p>

1.4 Matériel biologique**I.4.1 Matériel végétal**

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 les agriculteurs de la région de Rélizane, Algérie. Le choix d'utiliser le blé fermenté pour l'isolement est justifié par le fait que cet aliment a un potentiel bénéfice 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 physio pathologiques 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 (**Benmehel et al., 2019**)

I.4.2 Souches bactériennes utilisées**1.4.2.1 Mélange de probiotiques**

Le mélange bactérien utilisé pour l'isolement de la bactérie probiotique considérée comme référence, au cours de cette étude, 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 lactis* LA304 (**voir annexe n°1**). Ces souches ont fait l'objet de plusieurs recherches garantissant et certifiant leur effet bénéfique santé, leur innocuité, leur viabilité et survie dans le tube digestif et leur adhésion aux cellules épithéliales intestinales (**Drouault-Holowacza et al., 2006**).

1.4.2.2 Isolats lactiques

Les isolats lactiques utilisés au cours de cette présente étude pour l'évaluation de l'activité antioxydante sont issus du blé fermenté provenant de la région de Rélizane.

I.5 Procédure expérimentale

La démarche expérimentale relative à cette étude est illustrée par l'organigramme suivant

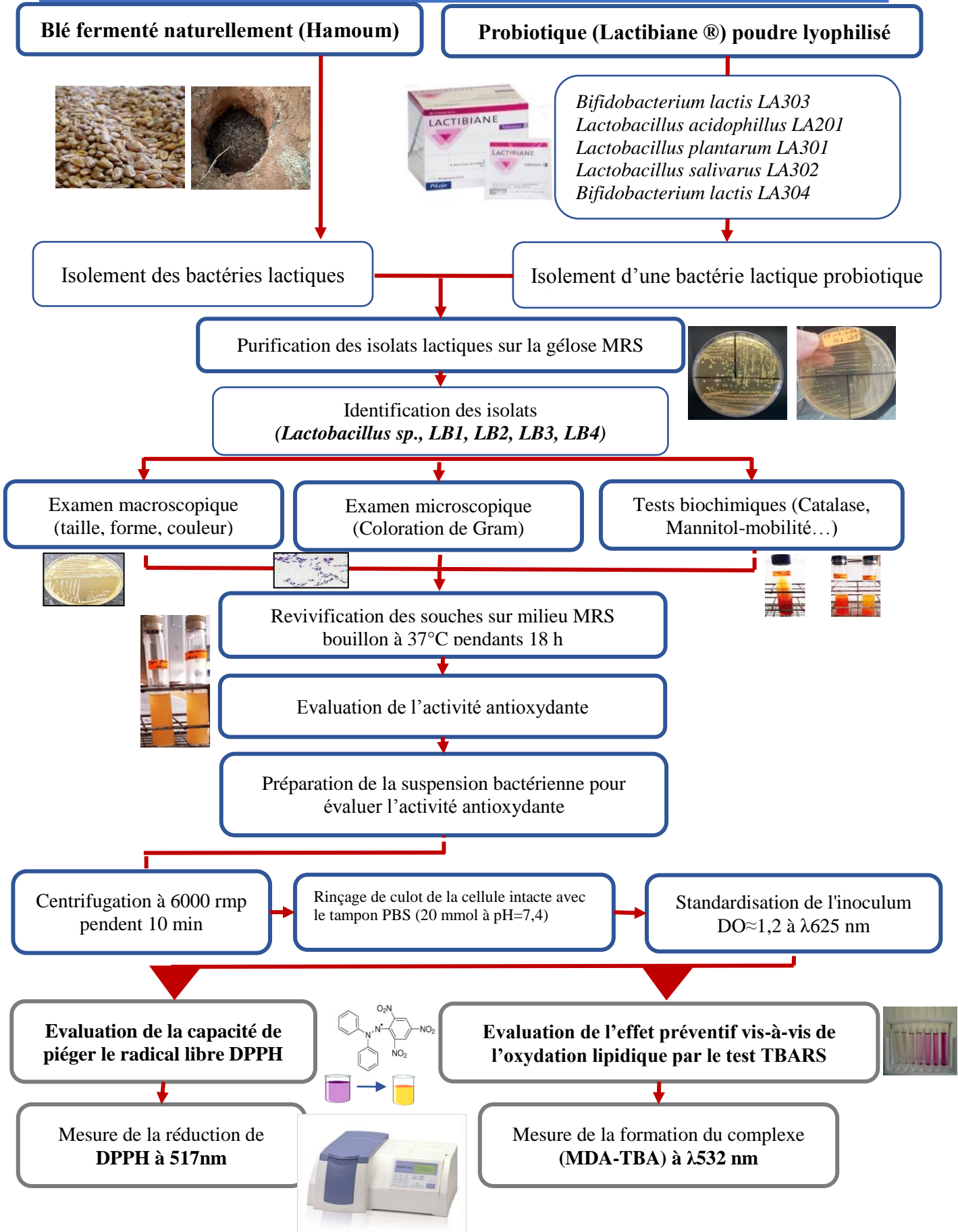


Figure n° 1 : Organigramme récapitulatif du protocole expérimental

I.6 Isolement, purification et réidentification 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 « Etude de l'interaction entre bactérie probiotique 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 négatif 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 paramètres biochimiques (catalase, mannitol-mobilité, citrate de Simmons, type fermentaire...), (**Voir annexe n°3**).

I.7 Revivification des isolats lactiques

A partir des cultures précédemment conservées dans le milieu MRS incliné, des prélèvements des isolats ont été inoculé 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.8 Evaluation de l'activité antioxydante des isolats lactiques**I.8.1 Préparation des suspensions des isolats lactiques (cellules intactes)**

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 **Su et al 2015** (à 20 mM, pH 7,4), (**voir annexe n°04**). 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 10⁹ UFC/ml ce qui correspond à une densité optique de 1,2 mesurée à une longueur d'onde de 625 nm. Cette concentration est largement utilisée dans les différents tests d'évaluation des propriétés probiotiques *in vitro* (**Wang .et al., 2015**).

I.8.2 Capacité des isolats lactiques à piéger le radical libre 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH)

➤ Principe

Le radical 2,2-Diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical libre et la simplicité de l'analyse par rapport aux autres méthodes (Blois, 1958 ; Brand *et al.*, 1995). A température ambiante, Le radical libre DPPH[•] présente une forte coloration violette dans les solutions alcooliques et disparaît au contact des substances donneuses de protons. Cette décoloration met en évidence le pouvoir antiradicalaire de suspension bactérienne grâce à sa capacité à piéger le radical libre et entraîne une diminution de l'absorbance à 517 nm

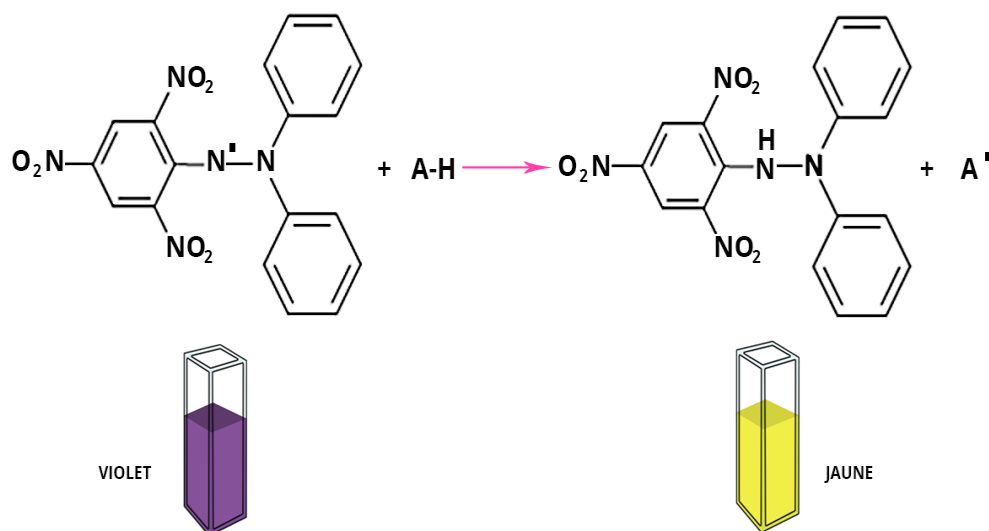


Figure n° 2 : Réaction chimique relative à la réduction du radical DPPH[•]

➤ Technique

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH[•]). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. L'effet de chaque substance antioxydante sur le DPPH[•] est mesuré par la procédure décrite par Sanchez-Moreno *et al.*, (1998).

Un volume de 750µl de chaque suspension bactérienne préparé comme décrit précédemment a été additionné à 750 µl de la solution méthanolique du DPPH[•] fraîchement préparée à 4 mg/ml (voir annexe n°5). Le mélange réactionnel a été incubé à une température ambiante et à

l'obscurité pendant 50 min, une lecture de l'absorbance a été effectuée à 517 nm. La capacité de des isolats bactériens à piger le radical DPPH a été exprimée en pourcentage d'inhibition celui-ci est calculé selon la formule suivants

$$\% \text{ d'inhibition du radical DPPH} = [(A1 - A2) / A1] * 100$$

Où

A1 : absorbance du contrôle

A2 : absorbance de l'échantillon

I.8.3 Effet préventif, *in vitro*, des isolats lactiques vis à vis de la peroxydation lipidique induite

I.8.3.1 Induction de la peroxydation lipidique *in vitro*

L'induction de la peroxydation lipidique a été effectuée selon la méthode décrite par **Bekkouche et al (2019)** avec une légère modification. 160 µl des différents isolats lactiques à tester ou de l'antioxydant de référence (acide gallique), (**voir annexe n°7**), ont été ajoutés à un mélange réactionnel constitué de 40 µl d'une solution de sulfate de cuivre, CuSO₄, préparée à 0,33mg/ml et 160 µl de plasma humain. L'ensemble a été incubé à 50 °C, après 12 h d'incubation, les échantillons ont été laissés à température ambiante pendant 60 minutes. On note que deux contrôles, négatif et positif, ont été préparés dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons. Le contrôle négatif correspond à 160 µl de plasma additionné à 160 µl d'eau distillée,

le contrôle positifs quant a lui a été composé de 160 µl de plasma additionné à 160 µl d'eau distillée et 40 µl de CuSo4 (0,33 mg/ml).

I.8.3.2 Evaluation de la peroxydation lipidique

➤ Principe

Le test TBARS quantifie le stress oxydatif en mesurant les dommages oxydatifs lipidique dues aux radicaux libres. Les réactions oxydatives en chaine sur les lipides induites par les radicaux libres et essentiellement les espèces réactives de l'oxygène, conduisent à la production de malondialdehyde (MDA produit final issu de l'oxydation lipidique), capable de réagir avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Le principe de ce dosage repose donc sur la réaction entre un mole de MDA et deux moles de TBA en milieu acide et dans des conditions thermiques, et la formation ainsi d'un pigment de couleur rose absorbant à 532 nm (**Noury, 2016**).

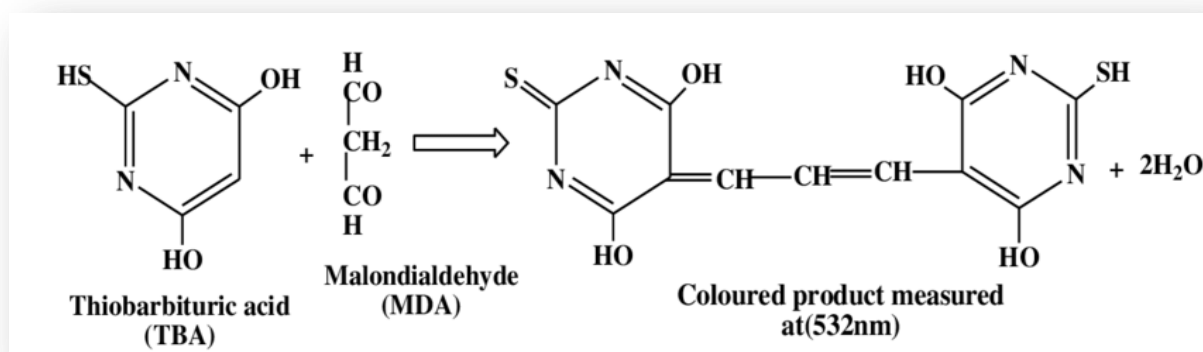


Figure n° 3 : Formation du complexe malondialdeyde/ Acide thiobarbiturique de couleur rose

➤ **Technique**

L'évaluation des teneurs en MDA a été réalisée selon le protocole décrit par **Yagi en 1976** elle est effectuée comme suite : un volume de 800 µL d'un mélange TBA à 0,375 % (p/v), TCA (20 %), BHT (0,01 %) et du HCL (1N) ont été ajoutés à 200 ml des solutions précédemment préparées (isolats et les contrôles, voir paragraphe précédent). Après agitation de 2 min, l'ensemble a été incubé au bain marie à 100°C pendant 15 minutes. Durant cette étape, les fonctions aldéhydiques du dialdéhyde malonique (MDA) sont libérées par l'hydrolyse acide à 100°C. Elles réagissent avec le TBA en formant un complexe coloré en rose (MDA-TBA). Pour arrêter la réaction, les tubes ont été placés dans la glace, le complexe ainsi formé a été extrait avec 2 ml de butanol-1 pendant 2 minutes. Après centrifugation à 4000 tours/minute pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant a été récolté et l'absorbance du chromogène rose obtenue a été mesurée à 532 nm en utilisant le spectrophotomètre. La concentration en MDA formé a été calculée à l'aide d'une courbe linéaire de TEP (**voir annexe N0°06**), et le pourcentage d'inhibition des MDA a été déterminé selon la formule suivante :

$$MDA (\%) = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Où

A₀ : la concentration en MDA du contrôle positif

A₁ : la concentration en MDA de l'échantillon a testé

I.9 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 Statistique 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 discussion

II.1. Evaluation de capacité de Piégeage des radicaux libres par 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)

Outre leurs propriétés immunostimulantes, les souches probiotiques connaissent aujourd'hui un regain d'intérêt de la part de la communauté scientifique elles peuvent être considérées comme des souches ayant un potentielles antioxydantes à vertus thérapeutiques, c'est pour cette raison que les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante d'une cellule bactérienne intact ou dans son lysat cellulaire, les plus utilisées sont celles basées sur la capacité de souches bactériennes d'agir comme piègeurs des radicaux ou de donneurs d'hydrogène (**Tang et al., 2016 ; Kouassi, 2017 ; Wang et al., 2017; Zhao et al., 2017**).

Au cours de cette étude pour évaluer le pouvoir scavenger de nos cellules bactériennes, nous avons opté pour la technique du piégeage du radical DPPH° car il s'agit d'une méthode rapide, simple, cohérente reproductible et précise. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure n°4. Elle présente les différents pourcentages d'inhibition du radical DPPH° correspondants aux différentes souches Lactiques (isolats et la souche probiotique de références). Ces résultats indiquent que l'ensemble des souches étudiées possèdent des taux d'inhibition élevés et divergents, ils varient entre $62,78 \pm 1,19 \%$ et $86,75 \pm 0,65\%$. Ceci reflète leur forte capacité antioxydante. Cependant la souche probiotique de référence affiche une capacité d'inhibition du radical DPPH° significativement inférieure aux pourcentages d'inhibition des isolats LB1, LB3 et LB4 on note $80,58\% \pm 0,15$ *versus* $84,45 \pm 0,42$ et $86,75 \pm 0,65\%$ et $86,48 \pm 0,75$ respectivement, les souches LB1, LB3 et LB4 présentent des activités de piégeage quasi-identique et les plus élevées, par contre la bactérie LB2 enregistre l'activité antioxydante, déterminée par le piégeage du radical DPPH° , la plus faible avec un pourcentage évalué à $62,78 \pm 0,19\%$.

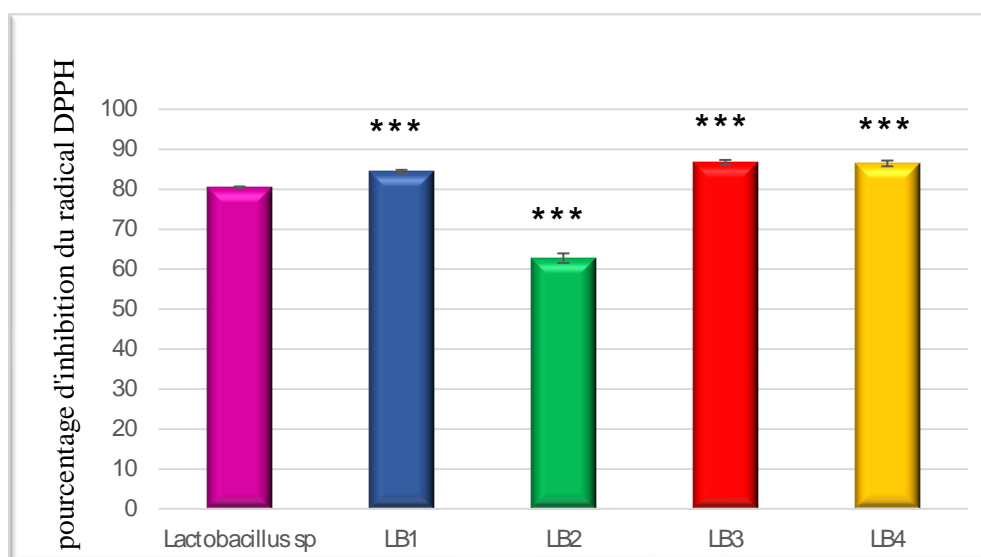


Figure n° 4 : Activité du piégeage du radical DPPH° par la souche de référence *Lactobacillus spp* et les isolats lactiques LB1, LB2, LB3, LB4.

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne \pm ES de trois essais indépendants)
 (***) Différence hautement significative LB1, LB2, LB3, LB4 vs *Lactobacillus sp*

Nos résultats corroborent avec ceux obtenus par **Riane et al., (2019)**, au cours de leur étude ces chercheurs ont montré que les activités de piégeage du radical DPPH° des souches bactériennes lactiques isolées du lait fermenté varient entre et 72,21% et 82,65%. Parmi ces cellules *Lb. Plantarum 15*, caractérisée par une forte résistance à l'acidité et aux sels biliaries, celle-ci exhibe une activité antioxydante importante par rapport aux autres bactéries isolées. Il va de même pour l'étude **Duz et al. (2020)**, leurs résultats montrent que les activités de piégeage du radical DPPH° des souches de bactéries lactiques varient entre 58,38 % et 90,34 %, la souche *Lb. Plantarum IH14L* présente l'activité la plus élevée avec un pourcentage évalué à $90,34 \pm 0,40\%$. (**Duz et al., 2020**). Cependant l'investigation réalisée par Su et ses collaborateurs (**2015**) indique des pourcentages de piégeage du radical DPPH° relativement faibles se situant entre 21,13% et 40,53 % et ils précisent que la souche probiotique de référence utilisée au cours de leur étude, *Lb. Bulgaricus 6032*, présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé en comparaison avec les autres souches, ce pourcentage est évalué à 48,45 %.

Aussi une étude plus récente s'est intéressée à l'activité antioxydante de plusieurs souches probiotiques à savoir : de *Lactobacillus brevis* KU15151, *Pediococcus pentosaceus* SC28 et *Lactobacillus rhamnosus* GG en utilisant le test de piégeage des radicaux DPPH°. Parmi ces dernières la souche *Lb. brevis* KU15151 a montré un taux maximal de piégeage radicalaire de 31,14% par rapport aux autres souches (**Yang et al., 2020**).

Les souches lactiques isolées du blé fermenté au cours de notre étude présentent une capacité de piégeage le radical DPPH° largement supérieure à celles rapportées par Su et ses collaborateurs et yang et son équipe. Ce qui confirme le potentiel antioxydant considérable de ces souches. Toutefois, il est admis que les activités antiradicalaires varient d'une bactérie à une autre (**Zhao et al., 2018**).

Il reste difficile d'effectuer une comparaison entre les espèces. Les divergences constatées entre nos résultats, les souches isolées entre elles, et entre celles de la littérature, peuvent être tributaires de certains facteurs susceptibles d'influencer de manière significative le pouvoir antioxydant de chaque souche. Ce dernier est dépendant du milieu et les conditions de culture, la concentration des cellules bactériennes, l'état cellulaire (cellules intactes au lysat cellulaire), l'activité antioxydante intrinsèque (les enzymes antioxydantes, telles que la SOD, la GPx, la NADH oxydase ainsi que le Glutathion réduit, le NADH, ...) et à la présence de molécules aux propriétés antioxydantes dans la membrane cellulaire externe (**Arasu et Al-Dhabi, 2020**) tels que les peptides et les exopolysaccharides (EPS) (**Song et al., 2019 ; Yang et al., 2020**). En effet des études antérieures ont démontré que l'activité antioxydante de certaines espèces de *Lactobacillus*, telles que *Lb.rhamnosus*, *Lb. helveticus*, *Lb. sakei* et *Lb. plantarum*, pourrait être associée à la production des composés de la surface cellulaire tels que EPS (**Wang et al., 2017 ; Wang, 2020**). L'effet antioxydant des EPS peut être dû à leur capacité de piéger les radicaux libres soit par la libération de l'hydrogène actif de la fonction hydroxyle de l'EPS ou par leur combinaison avec ce dernier ce qui donnera donc une forme stable (**Pan et al., 2010 ; Li et al., 2014**).

II.2 Evaluation de l'effet préventif des souches isolées vis à vis de la peroxydation lipidique

:

Au cours de cette étude nous avons choisi le dosage du MDA pour évaluer l'effet préventif des isolats bactériennes contre un stress induit par le CuSO₄ au niveau d'un plasma humain. Cet effet préventif vis-à-vis de la formation du MDA a été déterminé par les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique plasmatique. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure n°05.

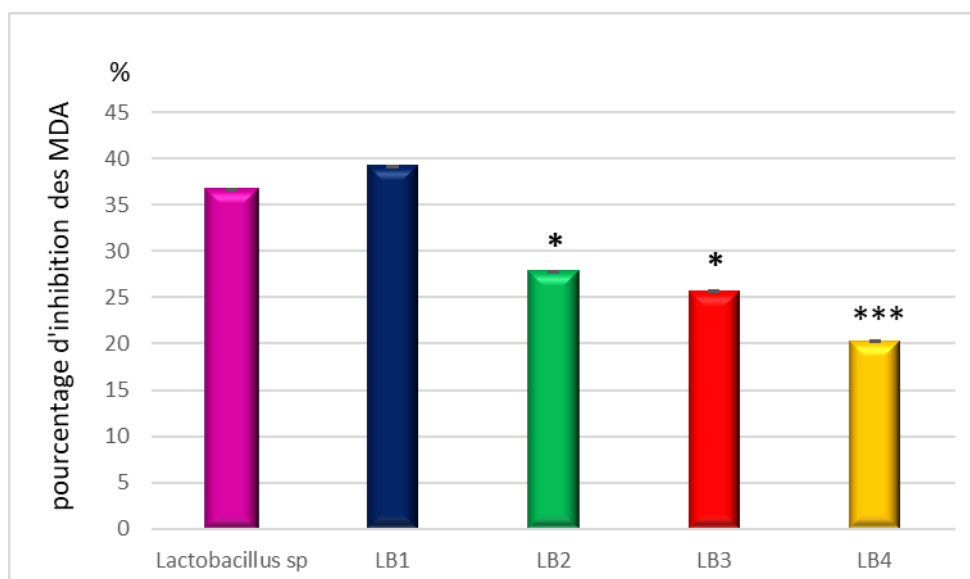


Figure n° 5 : Pourcentage d'inhibition des MDA par les bactéries lactiques *Lactobacillus* et les isolats lactiques LB1, LB2, LB3, LB4

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

(***) Différence hautement significative LB1, LB2, LB3, LB4 vs *Lactobacillus sp*

(*) Différence significative LB1, LB2, LB3, LB4 vs *Lactobacillus sp*.

De ces résultats, il ressort que les quatre souches bactériennes (LB1, LB2, LB3 et LB4) ainsi que la souche de référence sont dotées d'une capacité antioxydante protectrice contre la peroxydation des lipides plasmatiques. Ce taux d'inhibition varie considérablement entre les cinq souches testées, les valeurs sont situées entre $20\% \pm 0,005$ et $39\% \pm 0,002$. On constate que la souche probiotique de référence (*Lactobacillus sp*) inhibe la peroxydation lipidique avec un pourcentage évalué à $36\% \pm 0,001$, la souche LB1 est la souche la plus active avec un pourcentage de l'ordre de $39,18 \pm 0,002$. Ce taux est quasi identique à celui de la souche de référence. Cependant les souches LB2, LB3 et LB4 montrent des faibles activités antioxydantes en comparaison avec la souche de référence et la souche LB1. Leur pourcentage d'inhibition est évalué à $27,83 \pm 0,0025$, $25,63 \pm 0,0027$, $20,22 \pm 0,005$ respectivement. Cette différence est significative.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par **Lin et al., (2000)**. Ils ont démontré l'effet préventif de *Bifidobacterium longum* et *Lactobacillus acidophilus* vis à vis de l'inhibition de la peroxydation des lipides plasmatiques en utilisant les extraits cellulaires de *Bifidobacterium longum* et *Lactobacillus acidophilus* ainsi que les cellules intactes. Leurs résultats dévoilent que l'effet préventif évalué par les taux d'inhibition de la peroxydation lipidique du lysat cellulaire est plus important à celui des cellules intactes, les taux d'inhibition obtenus varient entre 11 et 29% pour une concentration bactériennes testées à 10^9 UFC/ml pour les deux souches (**Lin et**

al.,2000). Toutefois **Zhang et al.**, (2017) ont constaté une forte capacité antioxydante des souches *Lb. Curvatus* SR6 et *L. paracasei* SR10-1 en comparaison avec la capacité antioxydante de nos souches LB1, LB2, LB3, LB4 et la souche référentielle *Lactobacillus sp.* Les activités antioxydantes de *Lb. curvatus* SR6 et *Lb. paracasei* SR10-évaluées par le biais du pourcentage d'inhibition lipidique sont estimées à $55 \% \pm 5,19$, $64\% \pm 0,93$, respectivement.

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés quelle que soit leur origine (huiles végétales, huiles de poissons, graisses animales, membranes cellulaires, lipoprotéines) sont concernés. Ce phénomène est une conséquence du stress oxydant et aussi un relais pour sa propagation. Ils existent de nombreux marqueurs de la peroxydation lipidique. Le plus connu qui a été le plus utilisé est le dialdéhyde malonique (MDA). Il résulte de la dégradation des hydroperoxydes formés au cours de la peroxydation des acides gras polyinsaturés. Cependant, il peut aussi être formé lors de l'activation de la voie de la cyclo-oxygénase.

Plusieurs études ont évoqué la capacité des bactéries lactiques d'exercer une activité antioxydante contre les altérations oxydatives lipidiques et ce en utilisant différents mécanismes et processus adaptatifs (**Virtanen et al.**, 2007 ; **Zhang et al.**, 2017). En général, le processus le plus commun se base sur l'aptitude des bactéries lactiques, envers le stress oxydatif et particulièrement la peroxydation lipidique, à déclencher un mécanisme d'induction de l'expression des gènes codants pour les enzymes de détoxification et antioxydantes comme la SOD Mn, ceci permet aux bactéries de s'adapter et coexister en présence des radicaux libres et de tolérer ainsi les conditions difficiles de stress, telle qu'une augmentation de la concentration des métaux de transition essentiellement le cuivre et le fer qui peuvent être une source de formation des radicaux libres capables d'induire une oxydation lipidique en catalysant le transfert d'électrons, ces réactions ont lieu *in vivo* et *in vitro*. Les systèmes biologiques (cellules, plasma) contiennent du fer sous forme humique (hémoglobine, myoglobine) et non humique. Ce dernier est souvent lié à des petites molécules (ADP, ATP, citrate) et est appelé fer de bas poids moléculaire. Il joue le rôle de catalyseur dans le transfert d'électrons sur l'oxygène selon les réactions de Fenton (**Burkitt et Gilbert**, 1991). Le cuivre peut également jouer le même rôle que le fer comme catalyseur dans le transfert d'électrons. L'effet préventif des bactéries lactiques peut être expliqué par la capacité chélatrice des métaux de transition (**Miyoshi et al.**, 2003) ; c'est l'un des mécanismes le plus proposé dans l'inhibition de la peroxydation lipidique. Elles sont aussi capables, à l'instar de *Lactobacillus spp.*, de diminuer l'accumulation des espèces réactifs de l'oxygène.

Les EPS sont aussi impliquées dans l'inhibition de la formation des MDA. L'activité de chélation des métaux est également envisagée comme propriété antioxydante par laquelle les EPS peuvent exercer leur pouvoir antioxydant (**Li et al., 2014 ; Trabelsi et al., 2017**). Selon l'étude **Li et al., (2014)**, les EPS isolés à partir de *Lactobacillus plantarum LP6* ont la capacité de renforcer les activités enzymatiques antioxydantes, de maintenir l'intégrité cellulaire et d'inhiber l'oxydation lipidique des cellules PC12 exposées au H₂O₂. L'effet protecteur des EPS s'est traduit par une diminution de 52,80 % du niveau du MDA intracellulaire formé sous l'action du H₂O₂. Aussi l'effet inhibiteur de la formation des MDA par les bactéries lactiques peut être associé à la présence de différents constituants propres à chaque bactérie (le GSH, les enzymes antioxydantes, les vitamines, les acides aminés ...) et les différentes réactions redox associées.

Conclusion et Perspectives

Depuis des millénaires, localement et à l'échelle internationale, il existe dans notre diète une famille d'aliments particuliers : les aliments fermentés. Ces aliments ont des caractéristiques uniques, sur le plan biochimique et microbiologique. Parmi les microorganismes qui les composent, ceux qui retiennent l'attention de par leurs propriétés bénéfiques sur le microbiote intestinal sont les bactéries lactiques, essentiellement *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium*. Ces dernières présentent un grand intérêt pour le domaine de l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique.

Actuellement elles sont supposées exercer une activité antioxydante. Cependant le lien entre cette propriété et leur effet préventif ou curatif contre les pathologies à stress oxydatif est rarement élucidé. Dans ce contexte, l'objectif de notre travail s'intéresse à évaluer l'activité antioxydante des bactéries lactiques isolées à partir du blé fermenté. Les résultats obtenus indiquent que l'ensemble des souches isolées possèdent des taux d'inhibition élevés et divergents, ils varient entre $62,78\% \pm 1,19$ et $86,75\% \pm 0,65$. La souche probiotique de référence affiche une capacité d'inhibition du radical DPPH° significativement inférieure aux pourcentages d'inhibition des isolats LB1, LB3 et LB4 on note $80,58\% \pm 0,15$ versus $84,45 \pm 0,42$ et $86,75 \pm 0,65$ et $86,48\% \pm 0,75$ respectivement. Par contre la bactérie LB2 enregistre l'activité antioxydante, la plus faible avec un pourcentage évalué à $62,78 \pm 0,19\%$.

Les quatre souches bactériennes (LB1, LB2, LB3 et LB4) ainsi que la souche de référence présentent des taux d'inhibition contre la peroxydation lipidique importants et varient entre les cinq souches testées, les valeurs se situent entre $20\% \pm 0,005$ et $39\% \pm 0,002$. On constate que la souche probiotique de référence (*Lactobacillus sp*) inhibe la peroxydation lipidique avec un pourcentage évalué à $36\% \pm 0,001$, la souche LB1 est la souche la plus active avec un pourcentage de l'ordre de $39,18\% \pm 0,002$. Ce taux est quasi identique à celui de la souche de référence. Cependant les souches LB2, LB3 et LB4 montrent des faibles activités antioxydantes en comparaison avec la souche de référence et la souche LB1.

Ces résultats, indiquent que les quatre souches bactériennes (LB1, LB2, LB3 et LB4) sont dotées d'une capacité antioxydante elles devraient trouver une application autant que nouvelle formule nutraceutique. Elles peuvent être indiquées aussi bien dans la prévention des pathologies causées par le stress oxydatif et comme une solution alternative aux antioxydants synthétiques cependant pour confirmer cette suggestion et dans la continuité de ce présent travail les perspectives suivantes peuvent être envisagées :

- ✓ Evaluer l'activité antioxydante des isolats lactiques par la mesure de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD , GPx...).
- ✓ Identifier les isolats lactiques par le biais des galeries api 50 CH et par les techniques moléculaires
- ✓ Etudier leur capacité d'agir comme des probiotiques.
- ✓ Evaluer leurs propriétés biologiques *in vivo*, telles que leur activité antioxydante, anti-inflammatoire et leur effet sur la dysbiose intestinale.
- ✓ Les utilisés dans une association symbiotique (en association avec les polyphénols par exemple) et ce dans un concept de prévention vis-à-vis des pathologies chroniques à stress oxydatif.

References bibliographies

A

Arasu. M. V et Al- Dhabi. N. A.,2017. In vitro antifungal, probiotic, and antioxidant functional properties of a novel *Lactobacillus paraplantarum* isolated from fermented dates in Saudi Arabia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(15), 5287-5295.

B

Blois.M.S.,1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181, p1199-1200

Benmehel, S; Bousbahi, P. Gérard; Bousbahi.S.,2019. Impact nutritionnel d'un blé fermenté type Hamoum sur la translocation bactérienne intestinale chez le rat malnutri en phase de réalimentation.

Brand-Williams. W; Cuvelier. M. E; Berset. C.,1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), p25-30.

Burkitt. Mj; Gilbert. Bc.,1991. The autoxidation of iron (II) in aqueous systems: the effects of iron chelation by physiological, non-physiological and therapeutic chelators on the generation of reactive oxygen species and the inducement of biomolecular damage. *Free Radic Res Commun*; 14: p107-23.

D

Das. D et 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.

Delarras. C.,2014. Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures-moisissures Lavoisier-Tec & Doc P :476.

Drouault-Holowacz. S; Foligné. B; Dennin. V ; Goudercourt. D ; Terpend.K; Burckel. A et 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.

Düz. M; Nil. Y; Doğan. A et Doğan. I.,2020. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus curvatus* strains isolated from fermented Turkish Sucuk.

F

Felis. G; Salvetti. S; Torriani. S.,2015. Systematics of Lactic Acid Bacteria: Current Status. *Biotechnol Lact Acid Bact.*

Feng. T et Wang. J.,2020. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes.* 12(1) : 1-24.

K

Kechagia. M ; Basoulis. D ; Konstantopoulou. S ; Dimitriadi. D ; Gyftopoulou. K ; Skarmoutsou. N et Fakiri. E. M.,2013. Health benefits of probiotics. *International Scholarly Research Notices.* 1: 1-7.

Kohen.R et Nyska.A., 2002.**Oxidation** of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *TOXICOLOGIC PATHOLOGY*, vol 30, no 6, p 620–650.

Kouassi.M.,2017. Polysaccharides fonctionnalisés par des composés d'origine naturelle aux propriétés antioxydantes et antibactériennes. Thèse de Doctorat. Dissertation, Normandie Université.p297.

L

Le Lay. S; Simard. G ; Martinez.M. C et Andriantsitohaina.R.,2014. Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxidative medicine and cellular longevity.*

Li.W; Ji. J; Chen.X; Jiang. M ; Rui. X et Dong.M.,2014. Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers.*p351-359.

Lin. M. Y et Chang. F. J.,2000. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive diseases and sciences*, 45(8), p1617-1622.

Lortal. S ; El Mecherfi. K. E ; Mariotti.F ; Eutamène. H ; Rul.F ; Champomier-Vergès. M. C et Savary-Auzeloux. I.,2020. Aliments fermentés & bénéfiques santé : un défi pour la recherche. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 55(3), 136-148.

M

Messaid. S et Moussaoui. C.,2019. L'effet d'*Origanum majorana*. L sur l'induction ovulatoire chez les rattes albinos wistar.

Miyoshi. A ; Rochat.T ; Gratadaux. F ; le loir. Y ; Costa oliveira. S ; Langella. P ; Azevedo. V.,2003. Oxidative stress in *Lactococcus lactic*. Genetics and Molecular Research. 2(4), 348-359.

N

Noury.P.,2016. Dosage en microplaque des substances réagissant à l'acide Thiobarbiturique (Tbars). P 4-10.

P

Pan. D et Mei. X.,2010. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. Carbohydrate Polymères, 80(3), p908-914.

Q

Quinto. E. J; Jiménez. P; Caro. I; Tejero. J ; Mateo. J et Girbés. T.,2014. Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 5(18), 1765.

R

Riane. K; Sifour. M; Ouled-Haddar. H ; Idoui. T ; Bounar. S et Boussebt. S.,2021. Probiotic properties and antioxidant efficiency of *Lactobacillus plantarum* 15 isolated from milk. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 516-520.

S

Sanchez-Moreno. C ; Larrauri Jose. A; Saura-Calixto.F.,1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (2), p 270-276.

Shi. L. H; Balakrishnan. K; Thiagarajah. K; Ismail. N. I. M et Yin. O. S., 2016. Beneficial properties of probiotics. *Tropical Life Sciences Research*. 27(2): 73-90.

Song. M. W ; Jang. H. J ; Kim. K. T et Paik. H. D., 2019. Probiotic and antioxidant properties of novel *Lactobacillus brevis* KCCM 12203P isolated from kimchi and evaluation of immune-stimulating activities of its heat-killed cells in RAW 264.7 cells. *Journal of microbiology and biotechnology*. 29(12) : 1894-1903.

Su. J ; Wang. T ; Li. YY ; Li. J ; Zhang. Y ; Wang. Y ; Wang. H; Li. H.,2015. Antioxidant properties of wine lactic acid bacteria: *Oenococcus oeni*. *Appl Microbiol Biotechnol* .99, p5189–5202.

T

Tahlaïti. H ; Dalache. F ; Homrani.A et Nemmiche. S.,2017. Characterization and screening for probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented wheat" Hamoum". *South Asian Journal of Experimental Biology*, 7(4), 181-190.

Tamang. JP; Kailasapathy. K.,2010. Fermented Foods and Beverages of the World. CRC 534 Press.

Tang. W; Xing. Z; Li. C; Wang.J et Wang. Y.,2016. Molecular mechanisms and *in vitro* antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. *Food Chemistry*. 221, 1642-1649.

Trabelsi. I; Ktari. N; Slima. S. B; Triki. M; Bardaa. S; Mnif. H et Salah. R. B.,2017. Evaluation of dermal wound healing activity and *in vitro* antibacterial and antioxidant activities of a new exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, p194-201.

V

Virtanen. T ; Pihlanto.A; Akkanen.S et Korhonen. H.,2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology*, 102(1), p106-115.

W

Wang.Y; Wu. Y ; Wang. Y ; Xu. H ; Mei. X ; Yu. D et Li. W.,2017. Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(5), 521- 525.

Wang. Y ; Chen. Y ; Zhang .X ; Lu. Y et Chen.H.,2020. New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. *Journal of Functional Foods*. 75: p1-17.

Y

Yang. S. J ; Kim. K. T ; Kim. T. Y et Paik. H. D.,2020. Probiotic Properties and Antioxidant Activities of *Pediococcus pentosaceus* SC28 and *Levilactobacillus brevis* KU15151 in Fermented Black Gamju. *Foods*, 9(9) : 1154-1166.

Z

Zhang. Y ; Hu. P ; Lou. L ; Zhan. J ; Fan. M ; Li. D et Liao. Q.,2017. Antioxidant activities of lactic acid bacteria for quality improvement of fermented sausage. *Journal of Food science*, 82(12), p2960-2967.

Zhao. J; Tian. F; Yan. S; Zhai. Q; Zhang. H; Chen. W., 2018. Evaluation of antioxidative effects of lactobacillus plantarum with fuzzy synthetic models. *J microbio Biotechnol* 28 :1052-1060.

Zhao. Y ; Wang. Y ; Song. Z; Shan. C ; Zhu. R et Liu. F., 2016. Development of a simple, lowcost and eurytopic medium based on *Pleurotuseryngii* for lactic acid bacteria. *AMB Express*.

Zendeboodi. F; Khorshidian. N; Mortazavian. A et da Cruz A.G.,2020. Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*. 32 : 103-123.

Annexes

- **Annexe n°1 : Description et composition du LACTIBIANE Tolérance**

Le LACTIBIANE Tolérance est un complément alimentaire composé de 5 souches microbiennes probiotiques dosé à 4×10^9 UFC / g de poudre lyophilisée :

<i>Bifidobacteriumlactis LA 303</i>
<i>Lactobacillus acidophilus LA 201</i>
<i>Lactobacillus plantarum LA 301</i>
<i>Lacobacillussalivarius LA 302</i>
<i>Bifidobacteriumlactis LA 304</i>







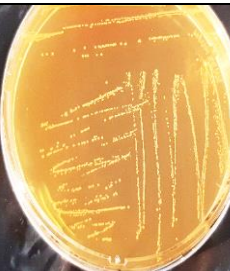
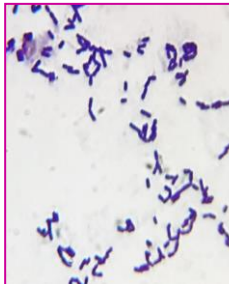
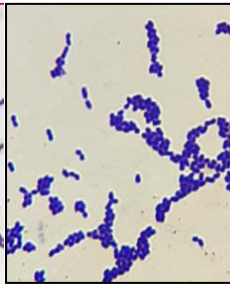
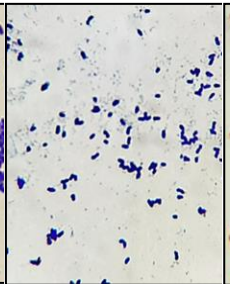
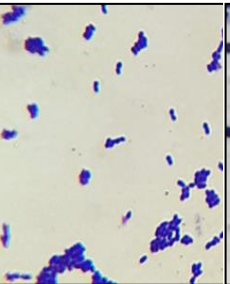
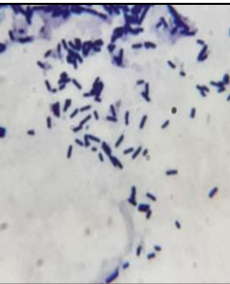
Figure n°1 : LACTIBIANE tolérance® (Pileje)

- **Annexe n°2 : Composition du milieu MRS liquide (de De Man Rogosa et Sharpe ,1960)**

Péptone 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

Le milieu a subi une stérilisation à 121°C pendant 15min le a été ajusté à pH 6.2

Annexe n°3 : Aspects macroscopique et microscopique des isolats lactiques issus de blé fermenté sur gélose MRS après coloration de Gram (Objectifx100).

Isolats	<i>Lactobacillus</i> <i>sp</i>	LB1	LB2	LB3	LB4
Incubation	Anaérobie	Aérobie	Aérobie	Anaérobie	Anaérobie
Aspect macroscopique					
Aspect microscopique					

• **Annexe n°4 : Préparation de 250 ml de solution de tampon PBS (1X)**

- KH₂PO₄0,25g
- NaCl3,65g
- Na₂HPO₄0,8g
- Kcl.....0,29 g

La solution a été ajustée à pH 7,4.

• **Annexe n°5 : Préparation de 50 ml de la solution de DPPH**

- DPPH.....0.002g
- Méthanol pur 50ml

- Agitation jusqu'à solubilité de la solution

- **Annexe n°6 : Courbe d'étalonnage pour l'évaluation de l'activité antioxydante par le biais de la technique TBARS**

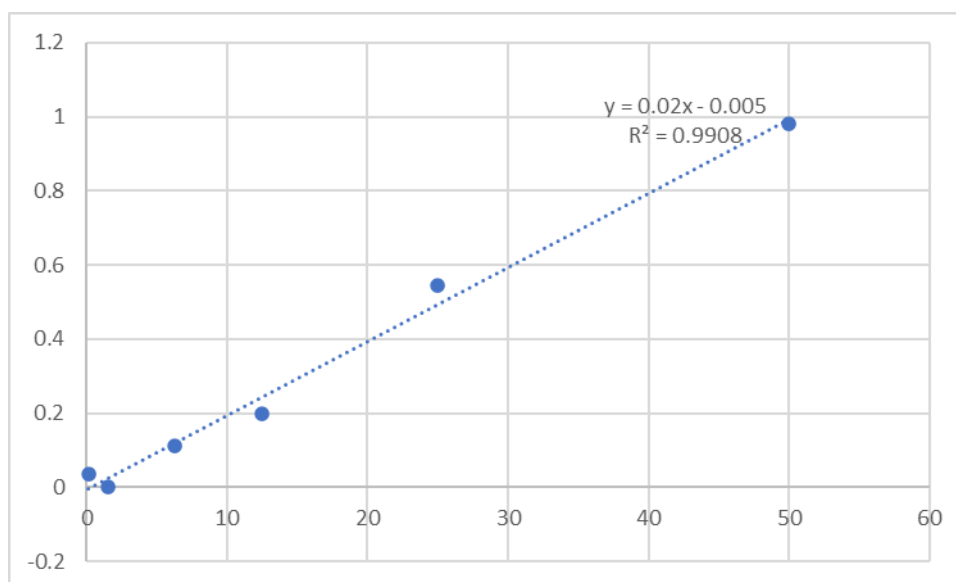


Figure n°3 : Courbe d'étalonnage du MDA (TEP 1 mM), .DO 535 nm

- **Annexe n°7 : Représentation graphique de l'évaluation de l'acide gallique**

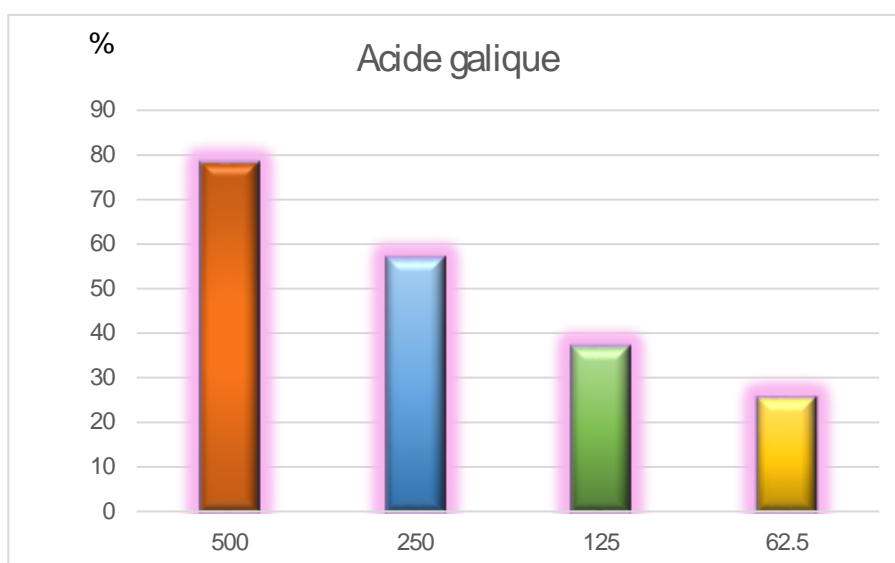


Figure N°4 : Représentation graphique de l'évaluation de l'acide gallique

- **Annexe n°8 : Représentation graphique l'évaluation de concentration de MDA**

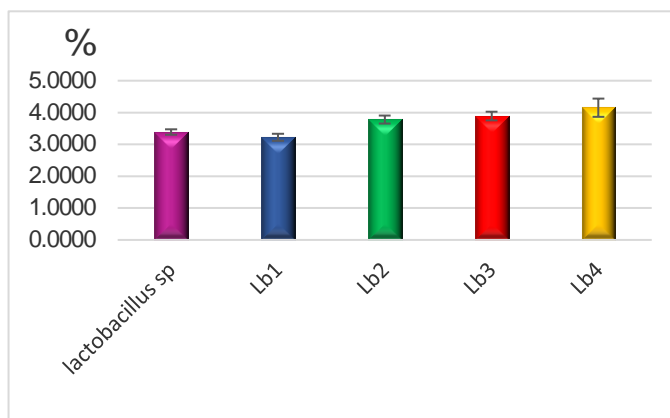


Figure N°5 : Représentation graphique l'évaluation de concentration de MDA

Résumé

Les bactéries lactiques constituent l'un des groupes de microorganismes le plus largement utilisé dans la production de divers types d'aliments fermentés, ces microorganismes sont très convoités pour leur capacité modulatrice du microbiote intestinale et leur effet bénéfique et préventif contre les complications gastro-intestinales. Outre ces deux propriétés les bactéries lactiques sont suspectées d'exercer une activité antioxydante. Cependant ce potentiel antioxydant et lié de la souche bactérienne en question et de l'environnement d'où elle a été isolée.

Dans cette optique l'objectif de cette présente étude vise à déterminer le pouvoir antioxydant de quatre isolats lactiques issus du blé fermenté. La capacité antioxydante de ces isolats a été appréciées par le biais du pouvoir antiradicalaire et l'effet préventif vis-à-vis de la peroxydation lipidique plasmatiques.

Les résultats obtenus indiquent que les quatre souches possèdent une excellente activité de piégeage du radical DPPH°, les taux variaient entre 62,78 et 86,75%. Aussi elles sont capables d'exercer un effet protecteur contre la peroxydation lipidique plasmatique avec des taux d'inhibition allant de 20,29% à 39,23%. Ces résultats laissent envisageable l'utilisation de ces isolats comme des antioxydants biologiques naturels dans l'industrie agro-alimentaire et renforcent l'idée de leur utilisation dans les stratégies nutritionnelles préventives vis à vis des pathologies chroniques à stress oxydatif.

Mots clés : Bactéries lactiques, probiotiques, blé fermenté, stress oxydant, activité antioxydante.

المخلص

بكتيريا حمض اللاكتيك هي واحدة من مجموعات الكائنات الحية الدقيقة الأكثر استخداما على نطاق واسع في إنتاج أنواع مختلفة من الأطعمة المخمرة، وهذه الكائنات الحية الدقيقة مرغوبة للغاية لقدرتها على تعديل الميكروبات المعوية وتأثيرها المفيد والوقائي ضد مضاعفات الجهاز الهضمي بالإضافة إلى هاتين الخاصيتين يشته في أن بكتيريا حمض اللاكتيك تمارس نشاطا مضادا للأكسدة ومع ذلك، تعتمد هذه الإمكانيات المضادة للأكسدة على السلالة البكتيرية المعنية والبيئة التي تم عزلها منها، فإن الهدف من هذه الدراسة هو تحديد القوة المضادة للأكسدة لأربعة سلالات لبنية معزولة من القمح المخمر. تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة لهذه السلالات المعزولة من خلال القوة المضادة للجنور والتأثير الوقائي ضد أكسدة دهون البلازما.. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن السلالات الأربع تمتلك نشاطا ممتازا لإزالة جذور DPPH°، وتراوحت المعدلات بين 62.78 و 86.75%. كما أنها قادرة على ممارسة تأثير وقائي ضد أكسدة دهون البلازما مع معدلات تثبيط تتراوح بين 20.29 % إلى 39.23 %. تشير هذه النتائج إلى إمكانية استخدام هذه السلالات المعزولة كمضادات أكسدة بيولوجية طبيعية في ميدان صناعة الأغذية وتعزيز فكرة استخدامها في الاستراتيجيات الغذائية الوقائية فيما يتعلق بالأمراض المزمنة ذات الإجهاد التأكسدي.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك، البر وبيوتيك، القمح المخمر، الإجهاد التأكسدي، النشاط المضاد للأكسدة.