

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILALI LIABES
FACULTE DES SCIENCES
DE LA NATURE ET DE LA VIE
SIDI BEL ABBES

THESE DE DOCTORAT

Présentée par :

Mr. MEBREK Saad

Spécialité : Sciences biologiques

Option : Biochimie-Immunologie

Intitulé

Etude des propriétés biologiques de l'association du bêta-glucane de l'orge et des bactéries lactiques isolées du lait de chamelle chez les rats Wistar

Soutenue le 31.01.2019

Devant le jury composé de :

Président :	<i>Pr. ABBOUNI Bouziane</i>	<i>Université de Sidi Bel-Abbès</i>
Examineurs :	<i>Pr. RIAZI Ali</i>	<i>Université de Mostaganem</i>
	<i>Pr. MERZOUK Hafida</i>	<i>Université de Tlemcen</i>
	<i>Pr. BABA AHMED F/Z</i>	<i>Université de Tlemcen</i>
	<i>Dr. DIAF Mustapha</i>	<i>Université de Sidi Bel-Abbès</i>
Rapporteur	<i>Pr. BENALI Mohammed</i>	<i>Université de Sidi Bel-Abbès</i>

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche de Biotoxicologie (Université de Sidi Bel-Abbès) sous la direction du Pr. BENALI M., laboratoires de Biochimie et Bactériologie du Centre de recherche en biotechnologie (CRBt, Constantine) sous la direction du Dr. AZIOUNE A. et l'animalerie de l'université de Constantine 1 sous la direction de Mr. BAHRI L. je tiens à leur exprimer mes remerciements, ma reconnaissance et ma gratitude.

J'exprime mes profonds remerciements à mon directeur de thèse, le Pr. BENALI Mohammed, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a offert l'opportunité de réaliser mon projet de thèse dans une ambiance très agréable. Je vous remercie d'avoir participé à ma formation scientifique et de m'avoir donné tant de conseils qui m'ont aidé à mener à terme ce travail. Vous trouverez ici l'expression de mon admiration et de ma reconnaissance.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr. ABBOUNI Bouziane, Professeur à l'université de Sidi Bel-Abbes, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse et d'évaluer ce travail.

Je tiens aussi à remercier vivement Mr. RIAZI Ali, Professeur à l'Université de Mostaganem, Mme. MERZOUK Hafida, Professeur à l'Université de Tlemcen, Mme. BABA AHMED Fatima zohra, Professeur à l'Université de Tlemcen et Mr DIAF Mustapha, Maître de Conférence (A) à l'Université de Sidi Bel-Abbes, qui m'ont fait un grand honneur en acceptant d'examiner cette thèse et de m'avoir accordé de leur temps si précieux pour apprécier et juger ce travail. Trouvez ici l'expression de mes sentiments les plus respectueux et de toute ma considération.

Un spécial remerciement pour, Dr. AZIOUNE Ammar, le Directeur du CRBt, qui m'a offert l'occasion de réaliser une partie de la thèse au niveau de son établissement. Je tiens à remercier aussi Hanène et Esmâ pour leur aide.

Un grand remerciement pour Mr. BAHRI Laid, responsable de l'animalerie, Faculté des SNV, Université de Constantine 1, pour sa collaboration et son soutien durant la réalisation de la partie *in vivo*.

Mes vifs remerciements vont également à Mr. BELAOUNI Hadj Ahmed, pour sa collaboration qui a permis la réalisation de la partie microbiologie. Merci Ahmed.

Je remercie aussi mes "binômes non officiels" : Ahmed, Hanène, Amina.

J'exprime mes vifs remerciements à Mr. Djamil, Amina, Sihem, Kheira, Mustapha, et Djihene, nos aimables ingénieurs, pour leur aide précieuse.

Un spécial thanks à Boubekour pour son aide matérielle et morale.

Un remerciement et une gratitude très spéciale aux membres de ma famille.

Enfin, je remercie tous ceux qui sans rien vouloir en retour m'ont aidé à finaliser ce travail. Je vous serais reconnaissant pour la vie.

Résumé

La prévalence mondiale du diabète sucré est en hausse. On sait que le stress oxydatif induit par le diabète affecte le foie, le pancréas, les reins et les organes reproducteurs pathologiquement. Il a été suggéré que les probiotiques et les fibres alimentaires en tant que prébiotiques jouent un rôle important dans la gestion du diabète et de ses complications. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de l'administration de bêta-glucane extrait de l'orge (BBG) et trois souches de bactéries lactiques (LAB) isolées du lait de chamelle, seuls ou associés, sur l'équilibre glycémique et le métabolisme lipidique ainsi que des paramètres biochimiques sur des rats mâles Wistar normaux ou rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine. Trente-six rats mâles sont répartis en 06 groupes : contrôle négatif (rats non diabétiques non traités), contrôle positif (rats diabétiques sans traitement), groupe metformine (rats diabétiques traités avec 200 mg/kg P.C. de metformine), groupe LAB (rats diabétiques traités avec 10^{+8} UFC/mL), groupe de BBG (rats diabétiques traités avec 50 mg/kg P.C.), et groupe COMB traité par les deux composés (rats diabétiques traités avec 50 mg/Kg P.C. + 10^{+8} UFC/mL) pendant quatre semaines. A la fin de l'expérimentation, les rats sont sacrifiés et le sang est récupéré. Les résultats montrent que tous les traitements ont entraîné une diminution de l'hyperglycémie à environ 02 g/L au bout de 04 semaines. Le BBG a un effet très significatif sur le bilan lipidique en augmentant le HDL-CHL et en diminuant le taux du cholestérol total, les triglycérides et le LDL-CHL et par conséquent le risque des maladies cardiovasculaires. Le même effet positif est observé pour le dosage sanguin de l'urée et la créatinine. Le groupe traité par les LAB et le groupe COMB ont connu aussi un effet positif sur tous les paramètres lipidiques ainsi que les taux sériques de l'urée et la créatinine. Un effet positif sur les enzymes hépatiques (ASAT et ALAT) est également observé chez tous les groupes traités sans aucune différence statistiquement significative. Le groupe COMB enregistre une diminution significative dans la concentration du complément-C3 ainsi que le rapport Neutrophiles/lymphocytes (N/L) contrairement aux LAB qui n'ont aucun effet significatif sur ces deux paramètres. Le dosage sérique du peptide-C ne révèle aucun effet des différents traitements sur ce paramètre et par conséquent aucun effet sur les fonctions des cellules bêta du pancréas. En conclusion, le BBG et les LAB ont des effets sur l'hyperglycémie chez les rats diabétiques ainsi que sur d'autres complications, alors que leur association ne montre aucun effet synergique significatif sur les paramètres étudiés.

Mots clés : Bêta-glucane de l'orge, bactéries lactiques, lait de chamelle, diabète, effet synergique, rat Wistar, streptozotocine

Abstract

The global prevalence of diabetes mellitus is rising. It is known that the oxidative stress induced by diabetes affects the liver, pancreas, kidneys and reproductive organs pathologically. It has been suggested that probiotics and dietary fiber as prebiotics play an important role in the management of diabetes and their complications. In this context, the objective of this study is to evaluate the effect of the administration of beta-glucan extracted from barley (BBG) and three strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from camel milk, alone or associated, on glycemic and lipid metabolism as well as biochemical parameters on normal Wistar male rats or streptozotocine induced diabetic rats. Thirty-six male rats were divided into 06 groups: negative control (non-diabetic rats untreated), positive control (diabetic rats without treatment), metformin group (diabetic rats treated with 200 mg/kg BW of metformin), LAB group (diabetic rats treated with 10^{+8} CFU/mL), BBG group (diabetic rats treated with 50 mg/kg BW), and COMB group (diabetic rats treated with both compounds (diabetic rats treated with 50 mg/kg BW + 10^{+8} CFU/mL) for four weeks. At the end of the experiment, the rats are sacrificed and the blood is removed. The results show that all treatments decreased hyperglycemia to about 02 g/L after 4 weeks. BBG had a very significant effect on lipid status by increasing HDL-CHL and decreasing total cholesterol, triglycerides and LDL-CHL and therefore the risk of cardiovascular disease, the same positive effect is observed for blood dosage of urea and creatinine. The group treated with LAB and the COMB group also had a positive effect on all lipid parameters as well as serum urea and creatinine levels. A positive effect on liver enzymes (ASAT and ALAT) is also observed in all treated groups without any statistically significant difference. The COMB group recorded a significant decrease in the C3 complement concentration and the Neutrophils/lymphocytes (N/L) ratio, unlike LABs, which have no significant effect on these two parameters. The serum determination of the C-peptide reveals no effect of the different treatments on this parameter and consequently no effect on the functions of the beta cells of the pancreas. In conclusion, BBG and LAB have effects on hyperglycemia in diabetic rats as well as other complications, whereas their association shows no significant synergistic effect on the studied parameters.

Key words: Barley beta-glucans, lactic acid bacteria, camel milk, diabetes, synergetic effect, rat Wistar, streptozotocine

الملخص

ان انتشار مرض السكري أخذ في الارتفاع على المستوى العالمي. ومن المعروف أن الإجهاد التأكسدي الناجم عن مرض السكري يؤثر على الكبد والبنكرياس والكلية والأعضاء التناسلية بشكل مرضي. وقد اثبتت عدة دراسات سابقة أن البروبيوتيك والألياف الغذائية (البريبوتك) دورا هاما في علاج مرض السكري ومضاعفاته. في هذا السياق، فإن الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تأثير مركب بيتا جلوكان المستخرج من الشعير (BBG) وثلاث سلالات من الخمائر اللبنية (LAB) المعزولة من حليب الإبل كل على حدا أو مع بعضها على نسبة السكر في الدم والدهون، فضلا عن المعلمات البيوكيميائية على ذكور الجرذان الطبيعية لسلالة Wistar أو الجرذان المصابة بمرض السكري من جراء حقن الجرذان بمادة الستربتوزوتوسين. تم تقسيم ستة وثلاثون جرذ إلى ستة مجموعات كالاتي : المجموعة السلبية الشاهدة (الجرذان غير المصابة بداء السكري دون علاج) ، المجموعة الايجابية الشاهدة (الجرذان المصابة بداء السكري دون علاج) ، مجموعة الميتفورمين (الجرذان المصابة بداء السكري المعالجة بـ 200 ملغم/كغم من وزن الجسم من الميتفورمين) ، مجموعة الجرذان المصابة بداء السكري المعالجة بـ LAB (10^{+8} CFU/mL) ، المجموعة BBG (الجرذان المصابة بداء السكري المعالجة بـ 50 مجم/كغم من وزن الجسم) ، ومجموعة COMB المعالجة مع كلا المركبين (الجرذان المصابة بداء السكري المعالجة بـ 50 مجم / كجم من وزن الجسم + 10^{+8} CFU/mL) لمدة أربعة أسابيع. في نهاية التجربة، تتم التضحية بالجرذان واخذ عينات من الدم لإجراء التحاليل. أظهرت النتائج أن جميع العلاجات قد خفضت من نسبة السكر في الدم إلى حوالي 02 غم/لتر بعد 4 أسابيع من العلاج. كان لعلاج BBG تأثير مهم جدا على الحالة الدهنية من خلال زيادة HDL-CHL وخفض الكوليسترول الكلي والدهون الثلاثية والدهون LDL-CHL وبالتالي خفض خطر الإصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية، لوحظ نفس التأثير الإيجابي لنسبة اليوريا والكرياتينين في الدم. المجموعة التي عولجت مع LAB ومجموعة COMB كان لها أيضا تأثير إيجابي على جميع المواد الدهنية وكذلك نسبة اليوريا في الدم ومستويات الكرياتينين. ويلاحظ أيضا وجود تأثير إيجابي على أنزيمات الكبد (ASAT و ALAT) ولكن من دون أي تأثير ذو دلالة إحصائية. سجلت مجموعة COMB انخفاضا ملحوظا في تركيز C3 ونسبة N/L ، على عكس LAB، التي ليس لها تأثير كبير على هذين المتغيرين. لا يكشف تحليل نسبة الببتيد C عن أي تأثير للعلاجات المختلفة على هذا المعامل وبالتالي لا يؤثر على وظائف خلايا بيتا في البنكرياس. في الختام، لدى BBG و LAB تأثيرات على نسبة السكر في الدم للجرذان المصابة بداء السكري بالإضافة إلى المضاعفات الأخرى، في حين أن ارتباطها لا يُظهر أي تأثير تآزري كبير على التحاليل المدروسة.

الكلمات المفتاحية : بيتا-جلوكان الشعير، الخمائر اللبنية، حليب الإبل، داء السكري، تأثير تآزري، ستربتوزوتوسين، جرذان سلالة Wistar

Liste des abréviations

Abs	: Absorbance
ABTS	: Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ACHE	: Acétylcholinestérase
ACHI	: Acétylthiocholine iodide
ADA	: American Diabetes Association
ALAT	: Alanine aminotransférase
ALP	: Phosphatase alcaline
AOAC	: Association of Official Agricultural Chemists
API 50 CH	: Analytical profile index
ASAT	: Aspartate aminotransférase
AVC	: Accident Vasculaire Cérébral
BBG	: Bêta-glucanes de l'orge
BCHC	: Chlorure de butyrylthiocholine
BCHE	: Butyrylcholinestérase
BG	: Bêta glucanes
BHA	: Butylated hydroxyanisole
BHT	: Butylated hydroxytoluene
CD	: Cluster de différenciation
CRP	: C-reactive protein
CUPRAC	: Cupric reducing antioxidant capacity
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DT1	: Diabète de type I
DT2	: Diabète de type II
DTNB	: 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EFSA	: European Food Safety Authority
FID	: Fédération Internationale du Diabète
GLP-1	: Glucagon Like Peptide-1
GLUT2	: Transporteur de glucose
HbA1c	: Hémoglobine glyquée
HDL	: High density lipoprotein
HOMA	: Homeostasis Model Assessment
HOMA-BF	: Homeostasis Model Assessment-Beta cell function
HOMA-IR	: Homeostasis Model Assessment-Insulin resistance

HPLC	: High-performance liquid chromatography
IA	: Indice athérogénique
IPA	: Institut Pasteur d'Alger
IRC	: Indice de risque coronarien
IRCV	: Indice de risque cardiovasculaire
ITGC	: Institut technique des grandes cultures
LAB	: Bactéries lactiques
LDL	: Low density lipoprotein
MA	: Maladie d'Alzheimer
MCV	: Maladies cardiovasculaires
MRS	: Gélose de Man, Rogosa, Sharpe
MSPRH	: Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière
N/L	: Rapport Neutrophile/lymphocyte
NBT	: Nitro blue tetrazolium
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
ONU	: Organisation des Nations Unies
P.C	: Poids corporel
PI3K/Akt	: Phosphoinositide 3-kinase/Protein kinase B
p-PNP	: p-nitrophényl-a-d-glucopyranoside
PYY	: Peptide tyrosine tyrosine
QUICKI	: Quantitative insulin sensitivity check index
ROS	: Espèces réactives d'oxygène
SCFA	: Acides gras à chaîne courte
STZ	: Streptozotocine
Syk	: Spleen tyrosine kinase
TC	: Cholestérol total
TG	: Triglycérides
TLR	: Toll-like receptor
UFC	: Unité formant colonie
USDA	: United States Department of Agriculture
VLDL	: Very Low Density Lipoprotein

Liste des Figures

Etude Bibliographique

Figure II.1	Nombre de personnes atteintes de diabète par région	09
Figure II.2	Les principales complications du diabète	13
Figure II.3	Structure moléculaire des BG (1,3/1,4) des céréales	16
Figure II.4	Structure moléculaire des BG (1,3/1,6) des levures	16
Figure II.5	Illustration de la propriété de barrière potentielle des fibres alimentaires solubles dans l'intestin grêle	19
Figure II.6	Modes d'action des BG sur les cellules immunitaires	20
Figure II.7	Rôle du microbiote intestinal dans le développement et le contrôle du diabète de type 2	23
Figure II.8	Mécanismes d'actions probiotiques dans les DT1 et DT2	26
Figure II.9	Mécanismes d'action des symbioses et leurs effets	29

Matériel et Méthodes

Figure III.1	Protocole d'extraction du bêta-glucane à partir de l'orge	32
Figure III.2	Principe de dosage des bêta-glucanes dans les céréales	32
Figure III.3	Standardisation de l'inoculum des bactéries lactiques	43
Figure III.4	Organigramme représentant les différents groupes de rats soumis aux différents traitements.	45

Résultats et Discussion

Figure IV.1	Observation de la macromorphologie des souches lactiques sur gélose MRS	60
Figure IV.2	Observation microscopique des isolats après coloration de Gram (x100).	60
Figure IV.3	Croissance microbienne après 24 h de culture sur milieu MRS avec différents pH (de 2 à 3). Valeurs exprimées en moyenne de la $DO_{600} \pm SD$.	61
Figure IV.4	Croissance bactérienne dans un milieu de culture additionné avec 0.15 % de sels biliaires	62
Figure IV.5	Croissance bactérienne dans un milieu de culture additionné avec 0.3 % de sels biliaires	62
Figure IV.6	Résultats du test de mobilité sur gélose mannitol mobilité	63
Figure IV.7	Courbe de croissance bactérienne de la souche CHM1.2 sur bouillon MRS selon les données observées (DO_{600})	64
Figure IV.8	Courbe de croissance bactérienne de la souche CHM2.5 sur bouillon MRS selon les données observées (DO_{600})	64

Figure IV.9	Courbe de croissance bactérienne de la souche CHM3.3 sur bouillon MRS selon les données observées (DO ₆₀₀)	65
Figure IV.10	Courbe de croissance bactérienne de la souche CHM4.1 sur bouillon MRS selon les données observées (DO ₆₀₀)	65
Figure IV.11	Evolution du gain de poids des différents groupes expérimentaux	75
Figure IV.12	Poids relatif du foie des rats de différents groupes expérimentaux	76
Figure IV.13	Poids relatif des reins des rats des différents groupes expérimentaux	77
Figure IV.14	Evolution de la glycémie à jeun des différents groupes expérimentaux	78
Figure IV.15	Dosage l'HbA1c des différents groupes expérimentaux	78
Figure IV.16	Dosage de l'urée et de la créatinine des différents groupes expérimentaux	79
Figure IV.17	Dosage de l'ASAT et l'ALAT des différents groupes expérimentaux	80
Figure IV.18	Dosage du cholestérol total des différents groupes expérimentaux	81
Figure IV.19	Dosage de triglycérides des différents groupes expérimentaux	82
Figure IV.20	Dosage de l'HDL-CHL des différents groupes expérimentaux	82
Figure IV.21	Détermination du LDL-CHL des différents groupes expérimentaux	83
Figure IV.22	Détermination des VLDL des différents groupes expérimentaux	84
Figure IV.23	Indice IA des différents groupes expérimentaux	84
Figure IV.24	CRI des différents groupes expérimentaux	85
Figure IV.25	CVRI des différents groupes expérimentaux	86
Figure IV.26	Dosage de LDH des différents groupes expérimentaux	86
Figure IV.27	Dosage des protéines sériques des différents groupes expérimentaux	88
Figure IV.28	Dosage du complément-C3 des différents groupes expérimentaux	88
Figure IV.29	Le rapport Neutrophiles/Lymphocytes des différents groupes expérimentaux	89
Figure IV.30	Dosage du peptide-C des différents groupes expérimentaux	89
Figure IV.31	Indice HOMA-BF des différents groupes expérimentaux	90
Figure IV.32	Indice Quicki des différents groupes expérimentaux	91
Figure IV.33	Indice de l'activité d'insuline des différents groupes expérimentaux	91

Liste des tableaux

Rappel Bibliographiques

Tableau II.1	Prévalence du diabète en Algérie	08
Tableau II.2	Schéma des structures des β -glucanes de différentes sources	16
Tableau II.3	Critères de sélection des souches probiotiques	25

Matériel et Méthodes

Tableau III.1	La composition de l'aliment des rats	45
----------------------	--------------------------------------	-----------

Résultats et Discussion

Tableau IV.1	Résultats des différentes activités antioxydantes du BBG	55
Tableau IV.2	Résultats des activités enzymatiques du BBG	57
Tableau IV.3	Potentiel prébiotique <i>in vitro</i> du BBG	59
Tableau IV.4	Résultats du test de mobilité des souches lactiques sur gélose "mannitol-mobilité"	63
Tableau IV.5	Paramètres de croissance des souches lactiques selon les modèles "D Model" et "Gompertz"	66
Tableau IV.6	Résultats de l'évaluation de l'antibiorésistance des souches lactiques testées.	68
Tableau IV.7	Résultats du test d'antagonisme	69
Tableau IV.8	Profil de fermentation des hydrates de carbone des 04 souches après 48 heures	70

Table des matières

Remerciements	
Liste des Abréviations	
Liste des Figures	
Liste des Tableaux	
Introduction	01

Etude Bibliographique

Chapitre I : Le diabète sucré

I.1. Définition	06
I.2. Le diabète de type I	06
I.3. Le diabète de type II	07
I.4. La prévalence du diabète	07
I.5. Les caractéristiques métabolique du diabète	09
I.5.1. L'hyperglycémie	09
I.5.2. L'acidose et l'Hypercétonémie	10
I.5.3. Les pertes hydro-électrolytiques	10
I.6. Les complications du diabète	10
I.6.1. Les complications micro-vasculaire	11
I.6.1.1 Rétinopathie	11
I.6.1.2. Néphropathie	11
I.6.1.3. Neuropathie	11
I.6.2. Les complications macro-vasculaires	11
I.6.2.1. Les complications vasculaires coronariennes	11
I.6.2.2. Les complications vasculaires cérébrales	12
I.6.2.3. Les complications vasculaires périphériques	12
I.7. Les diabète expérimental	12
I.7.1. Diabète induit par l'Alloxane	12
I.7.1.1 Définition	12
I.7.1.2. Mode d'action	13
I.7.2. Diabète induit par la streptozotocine	14

Chapitre II : Les fibres alimentaires

II.1. Définition	14
II.2. Les Bêta-glucanes	15

II.2.1. Définition	15
II.2.2. Structure des β -glucanes	15
II.2.3. Les Origines des β -glucanes	17
II.2.4. Propriétés physicochimiques des β -glucanes	17
II.2.4.1. Viscosité	17
II.2.4.2. Solubilités	17
II.2.4.3. La capacité de la rétention d'eau	18
II.2.5. Effets physiologiques des β -glucanes	18
II.2.5.1. La glycémie	18
II.2.5.2. La cholestérolémie	18
II.2.5.3. Le système immunitaire	19

Chapitre III : Les bactéries lactiques

III.1. Définition	20
III.2. Origines des bactéries lactiques	21
III.3. Métabolisme fermentaire	21
III.3.1. Métabolisme des sucres	21
III.3.2. Métabolisme azoté	21
III.4. Les aptitudes biotechnologiques des LAB	22

Chapitre IV : Probiotiques, Prébiotiques et symbiose

IV.1. Microbiote intestinal et diabète	22
IV.2. Probiotiques	23
IV.2.1. Définition	23
IV.2.2. Critères de sélection et exigences pour les souches probiotiques	24
IV.2.3. Mécanisme d'action des probiotiques	24
IV.3. Prébiotiques	27
IV.3.1. Définition	27
IV.3.2. Critères de sélection prébiotiques	27
IV.3.3. Mécanisme d'action des prébiotiques	27
IV.4. Symbiose (probiotiques et prébiotiques)	28
IV.4.1. Critères de sélection des symbioses	28
IV.4.2. Mécanisme d'action des symbioses	28

Partie Expérimentale

Chapitre 01 : Matériel et Méthodes

I. Extraction de bêta-glucane à partir de l'orge	31
I.1. Matériel biologique	31
I.2. Extraction du bêta-glucane	31
I.2.1. Détermination de la quantité du BBG	31
I.3. Etude des propriétés antioxydantes du BBG	33
I.3.1. Détermination de la concentration des phénols totaux	33
I.3.2. Détermination de la concentration des flavonoïdes totaux	33
I.3.3. Activité de piégeage du radical libre DPPH ^{•+}	33
I.3.4. Activité de piégeage du radical libre ABTS ^{•+}	34
I.3.5. Activité antioxydante avec la méthode de blanchiment du β -carotène	34
I.3.6. Activité antioxydante par la technique CUPRAC	34
I.3.7. Réduction du Fer	35
I.3.8. Le piégeage du radical superoxyde par la méthode DMSO alcalin	35
I.3.9. Activité de piégeage du radical hydroxyl (OH [•])	35
I.3.10. Détermination de l'activité anticholinestérasique	36
I.3.11. Pouvoir inhibiteur de l'enzyme α -glucosidase	36
II. Isolement et caractérisation des bactéries lactiques à partir du lait de chamelle	37
II.1. Collecte des échantillons du lait	37
II.2. Préparation des cultures	37
II.3. Purification des souches	37
II.4. Type fermentaire	37
II.5. Conservation longue durée	38
II.6. Identification de l'espèce par les galeries Api 50 CH	38
II.7. Caractérisation partielle du potentiel probiotique des LAB isolées	38
II.7.1. La croissance à différents pH	38
II.7.2. Test de résistance aux sels biliaires	39
II.7.3. Test de mobilité	39
II.7.4. Suivre de la cinétique de croissance bactérienne et estimation des paramètres de croissance	40
II.7.5. Evaluation de l'antibiorésistance	40
II.7.6. Test de l'antagonisme	41
II.8. Propriété prébiotique du BBG <i>in vitro</i>	42
II.9. Standardisation de l'inoculum des bactéries lactiques	42
III. Etude <i>in vivo</i>	44
III.1. Choix de l'animal	44

III.2. Induction du diabète expérimental chez les rates	44
III.3. Mesure de la glycémie	46
III.4. Dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c)	46
III.5. Détermination des paramètres biochimiques	46
III.6. Dosage du complément C3	47
III.7. Dosage du peptide-C	47
III.8. Calcul de l'indice de la sensibilité des cellules à l'insuline	48
III.9. Evaluation de la fonction des cellules bêta pancréatiques (HOMA-BF)	48
III.10. Analyses statistiques	48

Chapitre 02 : Résultats et Discussion

I. Le bêta-glucane de l'orge	50
I.1. Extraction des bêta-glucanes à partir de l'orge	50
I.2. Les activités biologiques du BBG	51
I.2.1. Détermination des teneurs des composés phénoliques et des flavonoïdes	51
I.2.2. Piégeage du radical libre DPPH ^{•+}	52
I.2.3. Piégeage du radical libre ABTS ^{•+}	52
I.2.4. Activité antioxydante avec la méthode de blanchiment au β -carotène	53
I.2.5. Le Test de Capacité de Réduction du Cuivre (CUPRAC)	53
I.2.6. Pouvoir réducteur de BBG	54
I.2.7. Piégeage du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) par la méthode DMSO alcalin	54
I.2.8. Test de piégeage du radical hydroxyle ($HO\bullet$)	55
I.2.9. Détermination de l'activité anticholinestérasique	56
I.2.10. Essai d'inhibition de l' α -glucosidase de levure <i>in vitro</i>	57
I.2.11. Potentiel prébiotique <i>in vitro</i> de BBG	58
II. Isolement, caractérisation et identification des bactéries lactiques isolées	59
II.1. Examen macroscopique et microscopique des isolats	59
II.2. Caractérisation partielle du potentiel probiotique des LAB isolées	60
II.2.1. La croissance à différents pH acides	60
II.2.2. Test de résistance aux sels biliaires	61
II.2.3. Test de mobilité	62
II.2.4. Suivi de la cinétique de croissance bactérienne et estimation des paramètres de croissance	63
II.2.5. Evaluation de l'antibiorésistance	66
II.2.6. Test de l'antagonisme	68
II.2.7. Identification par galerie API 50 CH	69

II.3. Discussion	71
III. Etude in vivo	75
III.1. Induction du Diabète	75
III.2. Evolution du poids corporel des rats	75
III.3. Poids relatif du foie	76
III.4. Poids relatif des reins	76
III.5. Evolution de la glycémie à jeun	77
III.6. Dosage de l'hémoglobine glyquée	77
III.7. Paramètres de la fonction rénale	78
III.8. Paramètres hépatiques	80
III.9. Paramètres lipidiques	81
III.10. Paramètres cardiovasculaires	84
III.11. Les protéines sériques	87
III.12. Paramètres immunologiques	87
III.13. Dosage du peptide-C	89
III.14. L'évaluation des fonctions des cellules bêta du pancréas	90
III.15. La sensibilité des cellules de l'organisme à l'action de l'insuline	90
III.16. Discussion	92
Conclusion	105
Références bibliographiques	109
Annexes	

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

Le diabète est une maladie chronique multisystémique caractérisée par des complications majeures largement influencées par l'hyperglycémie, il est devenu un problème de santé international et la prévalence du diabète a augmenté à une vitesse alarmante et a été considéré comme l'une des cinq causes mondiales de mortalité. La prévalence du prédiabète dans le monde est supérieure à 25% et présente un risque plus élevé de développer un diabète de type 2 (DT2) que chez les personnes ayant une tolérance normale au glucose (Moslehi et Libby, 2012). Le plus récent rapport statistique sur le diabète, publié en 2017, montre que 1.782 (1.251-2.452) millions d'Algériens sont diagnostiqués diabétiques. L'Algérie est parmi les pays Top 10 (8^o place) en nombre de nouveaux cas de diabète de type 1 (enfants et adolescents moins de 20 ans) par an, et la 6^o place en nombre d'enfants et adolescents (moins de 20 ans) chez qui un diabète de type 1 est diagnostiqué (Atlas, 2017). Outre la vitesse de développement notable, le diabète a également provoqué une douleur énorme chez les patients diabétiques et un stress énorme pour le système médical. Les patients atteints de diabète souffrent également de nombreuses complications, telles que l'hypertension, la dyslipidémie, les maladies cardiovasculaires (MCV), les crises cardiaques, les accidents vasculaires cérébraux, la cécité et les maladies rénales (Shakeri et *al.*, 2014).

Selon les directives nutritionnelles pour les patients diabétiques, publiées par l'Association Américaine du Diabète (ADA), les aliments à faible indice glycémique riches en fibres sont fortement recommandés. D'autre part, le Département américain de l'Agriculture (USDA) a recommandé 25 à 38 g de fibres par jour pour l'adulte et au moins la moitié des céréales devraient être à graines entières (Bantle et *al.*, 2008).

Depuis la fin des années 1970, il a été démontré que les fibres alimentaires ont de nombreux effets métaboliques positifs chez les patients diabétiques (Anderson et *al.*, 2009). Au cours des trois dernières décennies, les scientifiques ont mené de nombreuses études sur les mécanismes par lesquels les fibres alimentaires améliorent le diabète. De nombreux effets métaboliques ont été confirmés comme étant associés à différents types de fibres alimentaires, notamment une satiété accrue et une diminution de l'appétit (Clark et Slavin, 2013), une sensibilité accrue à l'insuline (Weickert et *al.*, 2006), un cholestérol sérique plus faible (Queenan et *al.*, 2007), une stimulation sélective de la microflore intestinale, diminution des marqueurs inflammatoires et fermentation intestinale améliorée pour produire des acides gras à chaîne courte dans l'intestin (Wannamethee et *al.*, 2009). Cependant, les fibres alimentaires ont des caractéristiques physiques et chimiques différentes, qui peuvent jouer différents rôles

dans l'amélioration du diabète. Les fibres visqueuses sont plus susceptibles d'être associées à un abaissement du cholestérol et à un contrôle glycémique amélioré, tandis que les fibres fermentées sont considérées comme plus bénéfiques pour la promotion d'une microflore intestinale saine (Chutkan et *al.*, 2012). On pense que les fibres insolubles améliorent la sensibilité à l'insuline (Weickert et *al.*, 2006).

La consommation d'une variété d'aliments contenant des fibres est encouragée pour les diabétiques, pour réduire la réponse glycémique postprandiale et parvenir à une alimentation équilibrée avec tous les groupes alimentaires (Bantle et *al.*, 2008). Les aliments naturellement riches en fibres ont généralement des fibres multiples de proportions variables. Par conséquent, afin de comprendre l'action d'un type de fibre spécifique, il est plus facile d'étudier une fibre spécifique plutôt qu'un aliment contenant divers types de fibres sur le diabète.

L'un des types de fibres les plus controversés est les bêta-glucanes, qui peuvent être obtenus à partir de sources végétales (avoine, orge) ou de sources fongiques (levure, champignons). Les bêta-glucanes constituent un composant important de la paroi cellulaire de l'avoine, de l'orge, de la levure et des champignons (Bell et *al.*, 1999). Les bêta-glucanes de l'avoine et de l'orge augmentent la viscosité de la nourriture et de l'environnement intestinal (Brennan et Cleary, 2005). Les liaisons bêta-glucanes sont différentes chez les plantes et les levures, de sorte que les bêta-glucanes provenant de différentes sources ont des propriétés physiques différentes (Bell et *al.*, 1999) et peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé. De nombreuses études ont examiné le mécanisme d'action des bêta-glucanes à base de plantes en ce qui concerne sa capacité à améliorer le contrôle de la glycémie et à produire un abaissement des lipides sanguins (Brennan et Cleary, 2005 ; Cavallero et *al.*, 2002 ; Choi et *al.*, 2010 ; Wannamethee et *al.*, 2009).

Le tractus gastro-intestinal humain contient en moyenne 10^{14} micro-organismes/mL et comprend plus de 5000 espèces bactériennes. La microflore intestinale commensale est maintenue de façon stable chez les individus et représente leurs empreintes microbiennes distinctes pour une fonctionnalité intestinale optimale. Cependant, toute perturbation de la structure, de la composition et de la proportion du microbiote intestinal indique une rupture de l'état de santé de l'individu en raison des changements de mode de vie, d'habitudes alimentaires, d'exposition au stress (conditions environnementales hostiles et usage abusif de médicaments), prédisposition génétique et dysfonctionnement du système immunitaire résultant dans l'apparition de certaines conditions médicales. Dans ces situations, la restauration de la microflore intestinale perturbée en appliquant des stratégies alimentaires innovantes semble

être la proposition viable pour réduire la gravité de ces conditions médicales. Dans ce contexte, les interventions probiotiques sous forme de nouvelles formulations alimentaires enrichies de souches probiotiques éprouvées pourraient constituer une stratégie alimentaire très efficace pour gérer les maladies intestinales chroniques et les troubles inflammatoires métaboliques tels que le DT2, l'obésité et les MCV. Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent à l'hôte un bénéfice spécifique pour la santé (Panwar et *al.*, 2013). Ils sont actuellement le centre d'attention majeur à travers le monde en raison de leurs énormes effets sur la santé humaine. Les Lactobacilles et les Bifidobactéries - les deux membres clés de ce groupe largement utilisés dans le développement de nouveaux aliments santé fonctionnels et d'autres formulations - sont maintenant explorés en tant que biothérapeutiques dans la prise en charge de plusieurs maladies (Ritchie et Romanuk, 2012).

Sur la base d'études antérieures, les prébiotiques entraînent des changements spécifiques dans l'activité et/ou la composition du microbiote intestinal, principalement dans les modèles de rongeurs, ce qui peut être bénéfique pour la santé humaine. La plupart des aspects santé des prébiotiques ont été dirigés vers l'obésité et l'inflammation (Rastall et Gibson, 2015). En outre, il a été démontré que la supplémentation en probiotiques réduit l'endotoxémie métabolique et améliore le contrôle de la glycémie chez les rongeurs (Hulston et *al.*, 2015).

Par conséquent, dans cette étude, il est supposé que la supplémentation prébiotique et/ou probiotique peut être une stratégie utile pour améliorer la santé métabolique, la résistance à l'insuline et prévenir le diabète de type 2, qui pourrait être intéressant dans la gestion des troubles métaboliques du diabète. Par conséquent, cette étude a été conçue pour étudier l'efficacité de l'administration des bêta-glucanes de l'orge (BBG) et/ou des bactéries lactiques (LAB) isolées du lait de chamelle sur un modèle animal de diabète, dans lequel le diabète a été induit chez des rats Wistar en utilisant la streptozotocine (STZ) et des complications métaboliques qui l'accompagnent. Les objectifs spécifiques de cette étude sont :

Objectif 1 : Déterminer si la supplémentation en BBG, LAB ou symbiotique améliorera la glycémie à jeun, la résistance à l'insuline (issue primaire) et la fonction des cellules bêta pancréatiques. Nous émettons l'hypothèse que la supplémentation en probiotiques et en symbiotiques améliorera la glycémie à jeun, la sensibilité à l'insuline et la fonction des cellules bêta.

Objectif 2 : Déterminer si la supplémentation en BBG, LAB ou symbiotique améliorera les profils lipidiques, les paramètres hépatiques et rénales chez les rats diabétiques. Nous émettons l'hypothèse que la supplémentation en BBG, LAB ou symbiotique réduira les triglycérides sériques, le cholestérol total (CHOL), le niveau des enzymes hépatiques (ASAT et ALAT), la teneur sérique de l'urée et la créatinine, augmentera lipoprotéines de haute densité HDL et améliorera les lipoprotéines de basse densité LDL et VLDL.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Le Diabète sucré

I.1. Définition

Le diabète est un désordre métabolique chronique caractérisé par une hyperglycémie à jeun $\geq 1.26 \text{ g.L}^{-1}$ (7 mmol.L^{-1}), qui résulte d'un défaut de sécrétion et/ou d'action d'insuline (Chaudhary et *al.*, 2017).

A l'origine, le terme « diabète » désignait diverses maladies caractérisées par une élimination importante d'urines, une déshydratation et une soif intense. Cette pathologie se distinguait par la saveur sucrée des urines et fut nommée diabète sucré (Sharma et *al.*, 2008). Chronique expose à des complications à long terme affectant de nombreux organes dont les reins, les yeux, les nerfs (microangiopathie), le cœur et les vaisseaux sanguins (macroangiopathie) (Karaca et *al.*, 2010).

Bien qu'aucun médicament ou autre traitement peut guérir le diabète complètement, certains traitements sont efficaces pour contrôler la glycémie ou ralentir les complications de la maladie (Pincus et *al.*, 2002). La prise en charge du diabète comprend des agents hypoglycémisants, un contrôle du poids corporel, une activité physique régulière et des habitudes alimentaires saines. Selon l'organisation Mondiale de la Santé (OMS), le diabète se manifeste sous deux formes majeures :

I.2. Le diabète de type I

Connu auparavant sous le nom du diabète insulino-dépendant ou diabète juvénile, il se caractérise par une carence absolue en insuline. Représente environ 5 à 10 % des diabétiques, il est causé par une destruction totale des cellules β pancréatiques sécrétant l'insuline. C'est une maladie auto-immune en forte relation avec la génétique. Une réponse immunitaire exagérée induit une attaque auto-immune contre les cellules β pancréatiques, ce qui provoque des dommages à ces dernières entraînant ainsi une déficience absolue de la sécrétion d'insuline (Devendra et *al.*, 2004). L'âge moyen d'apparition du diabète de type I (DT1) est beaucoup plus jeune (moins de 20 ans) que le diabète de type II (à partir de 40 ans), et les facteurs qui déclenchent l'apparition de cette maladie restent mal connus (Daneman, 2006).

Au début du DT1, les taux de glycémie sont encore normaux. Il est difficile de détecter le développement de la maladie jusqu'à ce que la destruction massive des cellules β dans le pancréas ait lieu et que la sécrétion d'insuline a diminué, ce qui rend difficile d'éviter la maladie (Kahn, 2003). La prise en charge implique une surveillance continue de la glycémie et des

injections régulières d'insuline. Les patients atteints de la maladie sont dépendants de l'injection d'insuline tout au long de leur vie (Miller et *al.*, 2015).

I.3. Le diabète de type II

Comparé au DT1, le type II du diabète comporte une pathogénèse beaucoup plus compliquée. La génétique, l'obésité, les dysfonctionnements de cellules β pancréatiques et le stress oxydatif sont tous des facteurs de risque qui contribuent à l'apparition de la maladie (Bellamy et *al.*, 2009). Il se caractérise à la fois par la résistance à l'insuline et par un défaut de sa sécrétion. Le degré de résistance à l'insuline et la carence en insuline varie selon le stade de développement. Au début de la maladie, la résistance à l'insuline commence à se produire alors que la sécrétion d'insuline augmente pour compenser la résistance. Dans ce stade précoce, les patients diabétiques ont habituellement une glycémie normale mais sont hyper-insulinémiques (Weir et Bonner-Weir, 2004). Plus tard, la sécrétion d'insuline ne permet pas de compenser la résistance à l'insuline et le taux de glycémie commence à augmenter jusqu'à une concentration anormalement élevée. Si l'hyperglycémie n'est pas bien contrôlée à long terme, éventuellement, la masse de cellules β pancréatiques diminuera en raison d'un dysfonctionnement (Weir et Bonner-Weir, 2004 ; Weir et Bonner-Weir, 2013). Avant la perte dramatique de cellules β dans la dernière étape, la progression du diabète peut être inversée, et la rémission se retrouve dans les patients atteints de DT2 avec des traitements efficaces (Weir et Bonner-Weir, 2004). Bien que le DT2 soit également associé à des facteurs génétiques, de nombreuses études antérieures ont montré que ce type peut être retardé ou même empêché dans certaines populations à haut risque (Knowler et *al.*, 2002).

I.4. La prévalence du diabète

Selon OMS, l'épidémie mondiale du diabète a explosé pour toucher en 2014 ; 422 millions d'adultes comparée à 108 millions en 1980. Le taux de prévalence mondiale du diabète a presque doublé depuis 1980 ; passant de 4.7 à 8.5%.

En 2012, le diabète a provoqué 1.5 million de mort. Une glycémie anormale peut entraîner des maladies cardiovasculaires et d'autres pathologies, qui ont causé 2.2 millions de décès supplémentaires. Pas moins de 43 % de ces 3.7 millions de décès surviennent chez des personnes âgées de moins de 70 ans. La prévalence du diabète a progressé plus rapidement dans les pays à revenu faible ou intermédiaire que dans les pays à revenu élevé (OMS, 2016).

En Algérie, le diabète pose un vrai problème de santé publique de par sa prévalence et le poids de ses complications chroniques dominées par les complications cardiovasculaires, le

ped diabétique, l'insuffisance rénale chronique et la rétinopathie. La prévalence du diabète a considérablement augmenté pour passer de 8% en 1998 à 16% en 2013, une étude nationale menée par le ministère de la sante en collaboration avec l'office national des Statistiques et des représentations des nations unies (ONU) à Alger, classe quand elle, la pathologie du diabète en 2^{ème} position derrière l'hypertension artérielle. Selon ces données, près de 4 millions d'Algériens sont atteints du diabète (Tab. II.I). La région centrale du pays compte parmi les plus diabétiques avec 2.3%, suivi par la région de l'Ouest avec 2.1%. Elle est passée à 0.3% chez les sujets âgés de moins de 35 ans, à 4.1% chez les personnes entre 35 à 59 ans et à 12.5% chez les personnes de plus de 60 ans (Chakib, 2011). Chez la population des Touaregs dans la même tranche d'âge, elle n'est que de 1.3% ce qui confirme l'influence du mode de vie et de l'activité physique sur le développement de la maladie (Chakib, 2011).

La prévalence du diabète dans le monde est représentée dans la (Fig. II.1). D'après la Fédération Internationale du Diabète (FID), L'épidémie mondiale du diabète fait exploser dans le monde entier, et il existe des régions géographiques qui mettent l'accent sur cette situation telle que les pays émergents comme la Chine et l'Inde. Dans certaines régions du monde, le nombre absolu de personnes atteintes de diabète est massif, d'autres la proportion d'adultes atteints de diabète est énorme et, dans d'autres encore, le taux d'augmentation attendu au cours des 20 prochaines années est intimidant et pourrait dépasser les 590 millions en 2035 (Atlas, 2013).

Tableau II.1 : prévalence du diabète en Algérie (Atlas, 2017)

Catégorie	Classement	Nombre de cas
Top 10 des pays en nombre d'enfants et adolescents chez qui un DT1 est diagnostiqué (<20 ans), 2017	06	42500 enfants et d'adolescents (<20) atteint de DT1
Top 10 des pays en matière de taux d'incidence (par 100.000 habitants par an) pour DT1 (<20 ans), 2017	06	26 taux d'incidence (par 100.000 habitants par an)
Top 10 des pays en nombre de nouveaux cas de DT1 (enfants et adolescents <20 ans) par an	08	3800 nouveaux cas
Top 10 des pays en nombre de nouveaux cas de DT1 (enfants et adolescents <15 ans) par an	07	2900 nouveaux cas

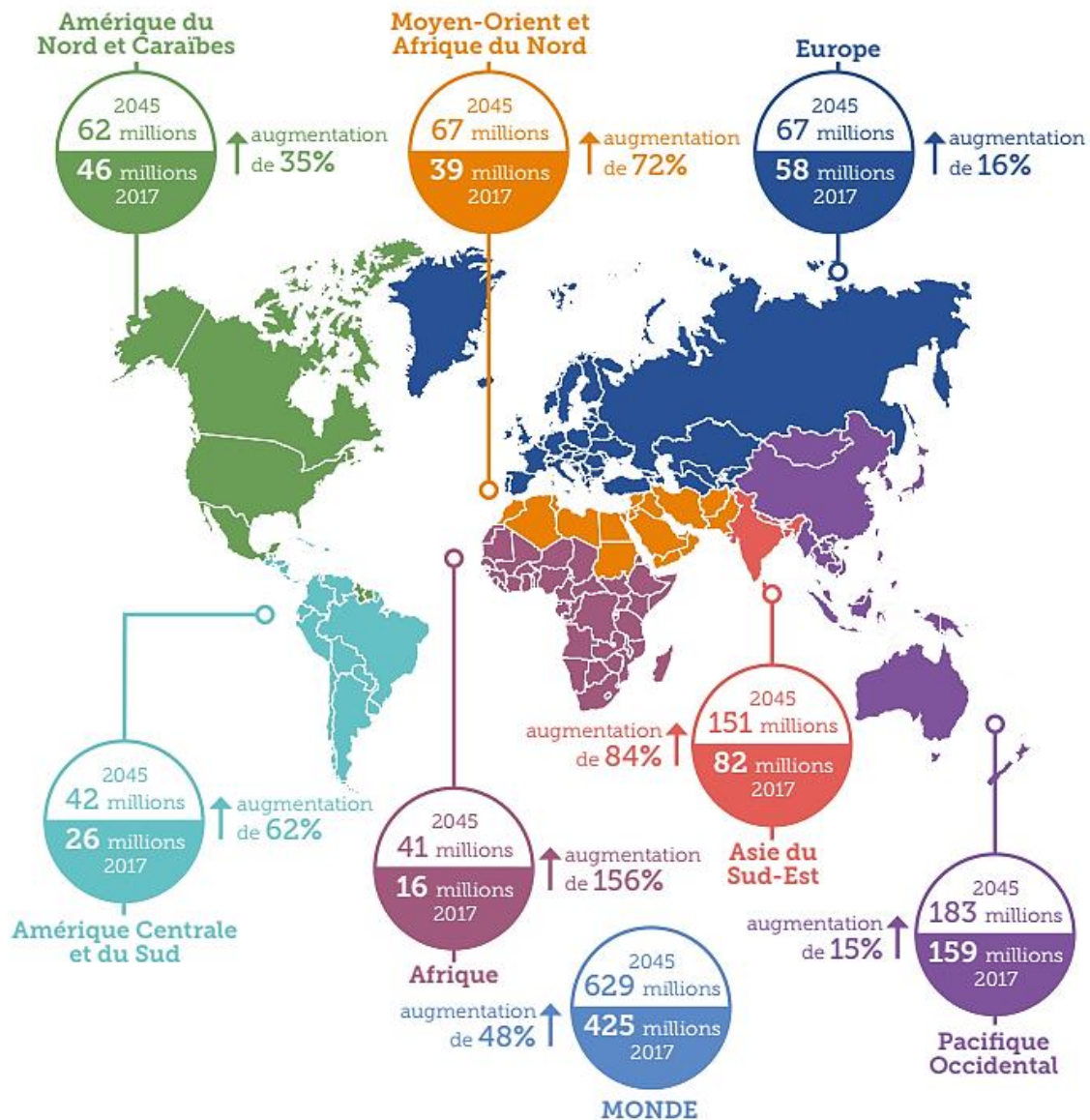


Figure II.1 : Nombre de personnes atteintes de diabète par région (Atlas, 2017).

I.5. Les caractéristiques métaboliques du diabète

I.5.1. L'hyperglycémie

L'insulinopénie absolue ou relative est reliée à l'augmentation des hormones de contre-régulation (glucagon, catécholamines, cortisol et hormone de croissance) est responsable d'une hyperglycémie par l'intermédiaire de trois mécanismes :

- Une accélération de la glycolyse ;
- Une diminution de l'utilisation tissulaire du glucose ;
- Une augmentation de la néoglucogenèse (Meyer et *al.*, 1998).

Cette dernière est la principale cause de l'hyperglycémie et est facilitée par l'augmentation des précurseurs de la néoglucogenèse (acides aminés, lactate et glycérol) due aux hormones de contre-régulation. L'hyperglycémie entraîne une glycosurie avec diurèse osmotique, déshydratation et diminution de la perfusion rénale. Cela aboutit à la diminution de l'excrétion rénale du glucose qui est un mécanisme majeur de défense contre l'hyperglycémie (English et Williams, 2004).

I.5.2. L'Acidose et l'hypercétonémie

A cause de carence insulinique et d'activation des hormones de contre-régulation glycémique, la lipase hormonosensible est activée en augmentant la lipolyse. Il y a alors production de grandes quantités de glycérol et d'acides gras libres. Ces derniers sont oxydés dans les mitochondries hépatiques engendrant la formation de corps cétoniques (acéto-acétate et acide 3-hydroxybutyrate). De plus, l'hypercétonémie est favorisée par la diminution du catabolisme et de l'élimination urinaire des corps cétoniques. En tant qu'acides forts leur accumulation provoque une acidose métabolique organique, (Yang et *al.*, 2007).

I.5.3. Les pertes hydro-électrolytiques

Les pertes hydriques sont majeures dans les complications hyperglycémiques du diabète. Elles sont dues majoritairement à la diurèse osmotique secondaire à la glycosurie et la cétonurie, mais aussi aux vomissements, à la fièvre et à l'hyperventilation dans le cas de l'acidocétose (Kitabchi et *al.*, 2001). Les déficits électrolytiques sont fréquents par plusieurs mécanismes :

- Les pertes de sodium sont dues à la diurèse osmotique, au déficit en insuline qui stimule sa réabsorption rénale et à l'excès de glucagon ;
- Le déficit en potassium et en phosphate est généré par la diurèse osmotique, les vomissements et l'hyperaldostéronisme secondaire à la déshydratation (English et Williams, 2004).

I.6. Les complications du diabète

Le diabète est un groupe des maladies chroniques caractérisées par une hyperglycémie. L'hyperglycémie peut entraîner des complications qui affectent plusieurs parties de l'organisme, l'une des principales lésions découlant de l'hyperglycémie est la lésion de la vascularisation (Fowler, 2011). Les complications résultantes sont regroupées aux maladies micro-vasculaires, qui touchent les petits vaisseaux sanguins (Lotfy et *al.*, 2017) et concernent plusieurs organes tels que le rein (Néphropathie diabétique), l'œil (Rétinopathie diabétique), ou

les nerfs (Neuropathie diabétique) (Nouwen et *al.*, 2011) et maladies macro-vasculaires qui touchent les gros vaisseaux (Fowler, 2011), tels que les vaisseaux du cœur (complications vasculaires coronariennes), du cerveau (complications vasculaires cérébrales) et des jambes (complications vasculaires périphérique) (Nouwen et *al.*, 2011). Les principales complications du diabète sont représentées dans la Fig. II.2.

I.6.1. Les complications micro-vasculaires

I.6.1.1 Rétinopathie

La rétinopathie est une complication fréquente qui touche plus de 50% des diabétiques (Monnier et Thuan, 2007). C'est la principale cause de cécité chez les adultes de 20 à 74 ans (Hirai et *al.*, 2011). La rétinopathie diabétique se manifeste par des lésions des petits vaisseaux irriguant la rétine. Le risque accroît avec l'évolution du diabète puisque plus de 75% des sujets présentent les symptômes après 20 ans de déclenchement de diabète (Gæde et *al.*, 2003).

I.6.1.2. Néphropathie

La néphropathie touche environ de 20 à 30% des patients diabétiques (de type 1 ou 2) (Association American du diabète (ADA), 2002). Elle est devenue la première cause d'insuffisance rénale terminale (Kurokawa et *al.*, 2002). Caractérisée par des anomalies fonctionnelles de la fonction rénale (hyper-filtration glomérulaire, excrétion augmentée de l'albumine), la néphropathie peut conduire à l'insuffisance rénale jusqu'au stade terminal qui nécessite la dialyse (Collart, 2003 ; Nektaria Papadopoulou-Marketou et *al.*, 2017).

I.6.1.3. Neuropathie

La neuropathie périphérique est une des complications les plus courantes du diabète qui touchent les nerfs, elle atteint 26% à 47% des patients (Barrett et *al.*, 2007 ; Davies et *al.*, 2006 ; Selvarajah et *al.*, 2006). Elle est caractérisée par des symptômes moteurs ou sensitifs tels que des pertes de sensibilité et des douleurs qui se manifestent d'abord au bout des pieds, des jambes et des bras. La neuropathie peut aussi toucher les nerfs qui contrôlent la digestion, la pression sanguine, le rythme cardiaque et les organes sexuels (Pop-Busui et *al.*, 2017).

I.6.2. Les complications macro-vasculaires

I.6.2.1. Les complications vasculaires coronariennes

Le risque de développer une coronaropathie ou une insuffisance cardiaque est plus élevé chez les diabétiques (Dailey et Wang, 2014). Une caractéristique majeure des complications cardiovasculaires est l'athérosclérose diabétique (Martín-Timón et *al.*, 2014). Cette dernière est

caractérisée par le dépôt d'une plaque essentiellement composée de lipides (on parle d'athérome) sur la paroi des artères. À terme, ces plaques peuvent entraîner la lésion de la paroi artérielle (sclérose), entraînant l'obstruction du vaisseau (Polovina et Potpara, 2014). Les complications vasculaires coronariennes sont la cause principale du décès chez les patients diabétiques (Mellbin et *al.*, 2010 ; Riddle, 2011).

I.6.2.2. Les complications vasculaires cérébrales

Le risque d'Accident Vasculaire Cérébral (AVC) est de même ordre que l'infarctus cardiaque. Ces incidents surviennent suite à l'obstruction d'une artère cervicale ou conduisant au cerveau, ou par la rupture d'un vaisseau sanguin dans le cerveau. Un diabétique sur deux décède d'une cardiopathie ou d'un accident vasculaire cérébral (Gæde et *al.*, 2003).

I.6.2.3. Les complications vasculaires périphériques

Les diabétiques ont un risque accru de développer une maladie vasculaire périphérique (Wémeau et *al.*, 2014). Dans les jambes, les pieds et les orteils, les artères durcissent et se rétrécissent. La circulation sanguine se trouve alors très réduite, ce qui prépare le terrain ischémique. Le risque relatif pour l'artérite des membres inférieurs se situe entre 5 et 10 avec une prédisposition masculine plus prononcée (Lotfy et *al.*, 2013).

I.7. Le diabète expérimental

Les modèles animaux de diabète représentent un outil important dans la recherche sur le diabète qui nous aide à éviter des études inutiles et éthiquement difficiles chez les sujets humains, ainsi qu'à obtenir un point de vue scientifique complet de cette maladie. Bien qu'il existe plusieurs méthodes par lesquelles le diabète peut être induit (chimiques, chirurgicales et génétiques), les méthodes chimiques du diabète induit par l'alloxane et la streptozotocine (STZ) représentent les modèles expérimentaux les plus importants et les plus préférables pour cette pathologie (Radenković et *al.*, 2016).

I.7.1. Le diabète induit par l'Alloxane

I.7.1.1 Définition

L'Alloxane est un dérivé de pyrimidine qui est synthétisé par oxydation de l'acide urique, c'est un composé hydrophile instable avec une structure similaire à celle du glucose (Lenzen, 2008). L'Alloxane est un agent diabétogène bien connu, est largement utilisé pour induire le diabète de type 2 chez les animaux (Viana et *al.*, 2004).

I.7.1.2. Mode d'action

L'Alloxane est un analogue toxique du glucose qui s'accumule préférentiellement dans les cellules bêta pancréatiques via le transporteur de glucose GLUT2, En présence de thiols intracellulaires, en particulier de glutathion, l'Alloxane est réduit en acide dialurique. L'autoxydation de l'acide dialurique génère des radicaux superoxydes, du peroxyde d'hydrogène et, dans une étape de réaction finale catalysée par le fer, des radicaux hydroxyles. Ces radicaux hydroxyles sont finalement responsables de la mort des cellules bêta (Lenzen, 2008).

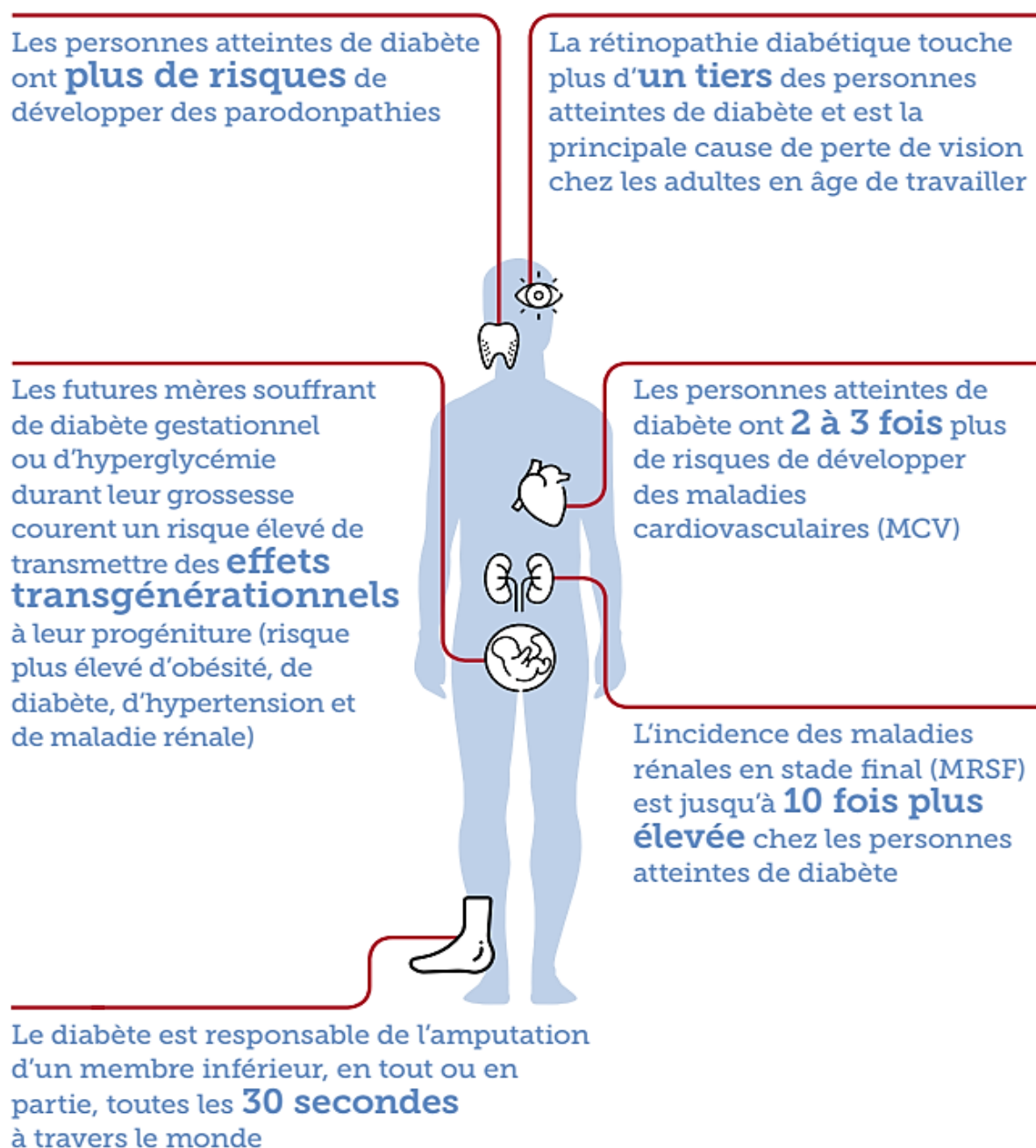


Figure II.2 : Les principales complications du diabète (Atlas, 2017)

I.7.2. Diabète induit par la streptozotocine

Comme l'Alloxane, la streptozotocine est également un composé hydrophile, et elle peut traverser la membrane cellulaire par l'intermédiaire des transporteurs GLUT2 (Lenzen, 2008). C'est une molécule qui a été identifiée pour la première fois en 1960 comme un antibiotique produit par la *Streptomyces achromogenes* (Bell et Hye, 1983). En 1967, ils ont constaté des effets diabétogènes chez les chiens et les rats en endommageant massivement les cellules β du pancréas, entraînant une réduction du taux d'insuline plasmatique à $\leq 5\%$ dans les 24 heures suivant l'injection. On pense que la STZ induit des dommages génétiques intracellulaires par alkylation d'acide désoxyribonucléique (ADN) dans les cellules β (Elsner et al., 2000). Un deuxième mécanisme proposé est dépendant de la structure chimique de la STZ ; la STZ contient le groupe nitroso qui peut libérer de l'oxyde nitrique au cours de son action. Pourtant, la libération intracellulaire d'oxyde nitrique n'est pas considérée comme le principal mécanisme de l'action de la STZ, elle peut être considérée comme un mécanisme alternatif ou supplémentaire de son action. Enfin, la génération des espèces réactives d'oxygène (ROS) contribue aux effets diabétogènes STZ. Néanmoins, la voie pathologique de la production des ROS ne joue pas un rôle central dans ce modèle de diabète expérimental (Radenković et al., 2016).

Chapitre II : Les fibres alimentaires

II.1. Définition

Les fibres alimentaires sont des mélanges des polymères glucidiques et de polysaccharides non amylacés résistant à la digestion par les enzymes du tractus gastro-intestinale des mammifères. Elles sont principalement des composants des parois cellulaires végétales (Fuentes-Zaragoza et al., 2010). Les fibres alimentaires sont classées en fibres solubles et insolubles ; Les fibres insolubles incluant la cellulose et la lignine...etc., elles sont légèrement fermentées et sont peu ou pas visqueuses, alors que les fibres solubles regroupent les oligosaccharides, les pectines et les bêta glucanes (BG), ces dernières sont bien fermentées par la flore intestinale et elles ont une bonne viscosité (Dikeman et Fahey Jr, 2006 ; Roberfroid, 1993).

En plus de leur résistance à la digestion, à l'absorption et l'hydrolyse dans l'intestin grêle, les fibres alimentaires sont également impliquées dans l'augmentation du volume fécal, la stimulation de la fermentation colique et la réduction des taux sérique de cholestérol préprandiale et des taux de glycémie postprandiale dans l'organisme (Gómez et al., 2010). Elles

sont actuellement considérées comme un ingrédient essentiel dans les produits alimentaires (Bae et Lee, 2014).

II.2. Les Bêta-glucanes

II.2.1. Définition

Les Bêta-glucanes (BG) sont des polysaccharides non amylacés de monomères de D-glucose liés par des liaisons β -glycosidiques linéaires et/ou ramifiée. Elles présentent une source de fibres alimentaires précieuses qui se trouvent dans les grains les céréales telles que l'orge et l'avoine et dans les parois cellulaires des levures, des champignons, des algues et certaines bactéries (Zhu et *al.*, 2015).

Plusieurs effets des BG sur la santé sont rapportés dans la littérature, y compris une activité contre le cancer du côlon (Dongowski et *al.*, 2002). La réduction du taux de glucose postprandial (Hallfrisch et Behall, 2003). La réduction du cholestérol sérique (Ahmad, 2009) et la prévention des maladies coronariennes (Wang et *al.*, 2002).

II.2.2. Structure des β -glucanes

Les BG chimiquement sont des homopolysaccharide avec des unités de glucoses répétés, ces unités de glucose peuvent se ramifier de plusieurs façons selon la source à partir de laquelle elle est extraite (Gardiner, 2000). Ils sont synthétisés par la polymérisation des monomères β -D-glucopyranosyle par le premier carbone d'un monomère avec le troisième, quatrième ou sixième carbone d'un autre. Les BG provenant de dérivés de céréales se composent d'un squelette de molécules de glycopyranosyle reliées par des liaisons β (1-3), à partir de ce squelette, des chaînes latérales sont jointes avec des liaisons β (1-4), avec un degré de polymérisation entre 300 et 1850 résidus (Fig. II.3) (Burton et Fincher, 2009 ; Stone et Fincher, 2004). Alors que les BG provenant de levures et de champignons se composent des liaisons β (1-3) et β (1-6) (Fig.II.4) (Du et *al.*, 2014). Cependant, les BG bactériens, d'une part, sont non ramifiés se compose seulement de liaisons β (1-3). Ces différences structurales sont reflétées dans les différences dans leur fonctionnalité (Johansson et *al.*, 2008).

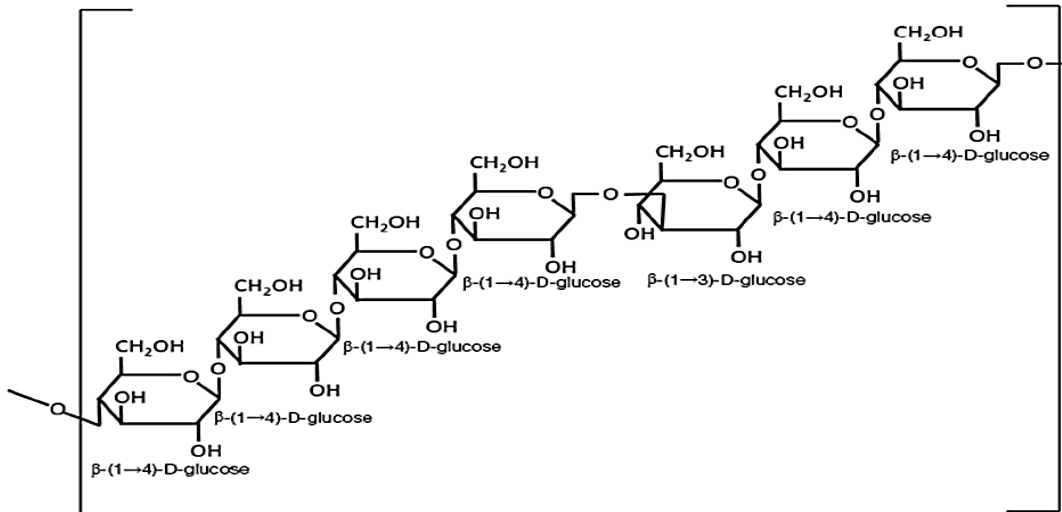


Figure II.3 : Structure moléculaire des BG (1,3/1,4) des céréales (Jacob et Pescatore, 2014).

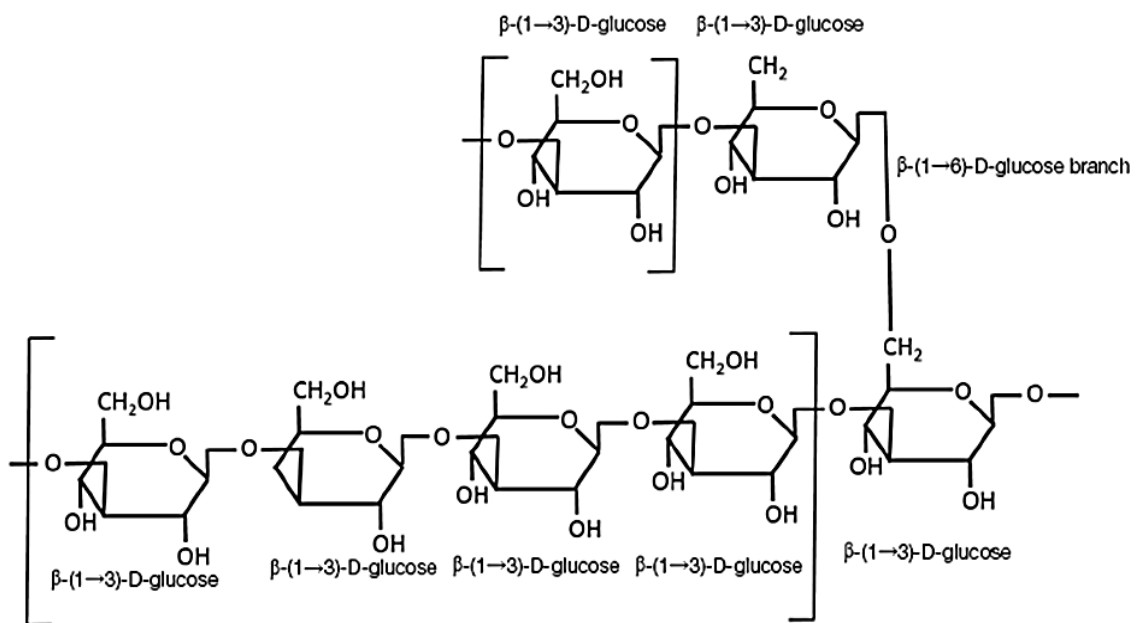


Figure II.4 : Structure moléculaire des BG (1,3/1,6) des levures (Jacob et Pescatore, 2014).

Tableau II.2 : Schéma des structures des BG de différentes sources (Volman *et al.*, 2008)

Type de bêta-glucane	Structure	Description
Bactérie		β1,3 glucane linéaire Ex. Curdlan
Champignon		β1,3 glucane avec des branchements courts de type β1,6 Ex. Schizophyllan
Levure		β1,3 glucane avec des branchements longs de type β1,6 Ex. Betafectin™
Céréale		β-glucane linéaire β1,3/β1,4 Ex. Avoine, Orge

II.2.3. Les Origines des Bêta-glucanes

Les sources de BG sont assez diversifiées. Les principales sources de cet ingrédient fonctionnel proviennent de céréales, en particulier de l'avoine et de l'orge, qui présentent une teneur élevée en BG ; l'orge (2 à 11%) et l'avoine (2 à 7.5%), tandis que pour le blé et le seigle les BGs constituent de 0.5 à 1% et 1.4 à 2.6% respectivement (Henry, 1987 ; Nilsson et al., 1997). Ils peuvent également être extraits du riz (Inglett et al., 2004). Ils sont obtenus aussi à partir de certaines bactéries pathogènes comme *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans* (Tokunaka et al., 2002).

Les champignons sont également une bonne source des BG de structure β (1,3/1,6). Parmi eux, les chercheurs se concentrent sur les champignons comestibles. Les sources de champignons les plus célèbres incluent *Agaricus brasiliensis* (Mizuno et al., 2003) *Pleurotus tuberregiu* (Zhang et al., 2004), *Grifola frondosa* (Kodama et al., 2003), *Pleurotus eryngii* et *Pleurotus ostreatoroseus* (Carbonero et al., 2006). Et Parmi les levures, on trouve la levure de boulangère, *Sacchromyces cerevisiae* qui représente une source importante de BG. D'autres levures incluant *Zygosaccharomyces bailii* et *Debaryomyces* (Nguyen et al., 1998).

II.2.4. Propriétés physicochimiques des bêta-glucanes

II.2.4.1. Viscosité

La viscosité est une propriété physico-chimique associée aux fibres alimentaires, en particulier les fibres alimentaires solubles. Les fibres alimentaires visqueuses épaississant ou former des gels lorsqu'ils sont mélangés avec des liquides résultant d'une intrication physique entre les molécules de polysaccharides dans le liquide ou la solution (Guillon et Champ, 2000). La viscosité des BG dépend de plusieurs facteurs dans les solutions. Ces facteurs comprennent le taux de cisaillement, la température, l'humidité, le temps, le poids moléculaire, la composition et la structure chimiques, et les conditions acides et alcalines (Bourne, 2002 ; Guillon et Champ, 2000 ; Lam et Flores, 2003).

Les BG de poids moléculaire élevé forment des solutions visqueuses, alors que les BG de poids moléculaire inférieur peuvent former des gels doux à des concentrations plus élevées (Doublier et woods, 1995).

II.2.4.2. Solubilités

La solubilité est le principal facteur dans les propriétés nutritionnelles des BG, les BG sont généralement hydratées dans l'eau leur structure irrégulière empêche la formation de

structures cristallines ordonnées, de sorte que ces polysaccharides ont tendance à être solubles dans l'eau (Roubroeks et *al.*, 2000).

II.2.4.3. La capacité de la rétention d'eau

Les BG ont une grande capacité de retenir d'eau, Les polysaccharides sont des molécules hydrophiles, ils ont de nombreux groupes hydroxyle, qui peuvent former des liaisons hydrogène avec de l'eau, L'eau est maintenue dans la matrice polysaccharide, incapable d'écouler, ce qui entraîne la formation d'un gel (Collar et Angioloni, 2014).

II.2.5. Effets physiologiques des β -glucanes

II.2.5.1. La glycémie

Les BG ont été utilisés dans plusieurs essais cliniques pour réduire le taux de glucose dans le sang. Plusieurs auteurs ont montré que les BG forment une solution visqueuse dans l'intestin en protégeant la muqueuse intestinale et prolonge la digestion des macronutriments en retardant la vidange gastrique et ralentissant le transport/mélange des enzymes digestives (Salas-Salvadó et *al.*, 2006). La conséquence directe est que l'absorption de glucose et d'autres macronutriments est réduite (Queenan et *al.*, 2007). Et par conséquent un ralentissement de la montée de la glycémie et l'amélioration de l'insulinémie. Ces changements réduisent aussi la sensation de faim causée par une diminution rapide de la glycémie (Ludwig, 2003 ; Saris, 2003). Ainsi, les BG peuvent diminuer l'appétit et réduire la prise de nourriture (Chen et Raymond, 2008).

II.2.5.2. La cholestérolémie

Les taux élevés de cholestérol des lipoprotéines de faible densité (LDL) sont considérés comme des facteurs de risque majeurs pour les MCV. Les BG ont été montré pour diminuer le cholestérol total (TC), les triglycérides et les LDL-CHL et augmenter les HDL-CHL pour atténuer éventuellement la dyslipidémie et réduire le risque des maladies cardio-vasculaires (Gunniss et Gidley, 2010). Les BG peuvent également abaisser les niveaux du TC et de LDL-CHL grâce à des effets sur la glycémie postprandiale.

Le mécanisme de l'action hypocholestérolémiant des BG et les facteurs influençant ce mécanisme ne sont pas encore complètement établi. Deux mécanismes d'action possibles proposés sont résumés :

- Les BG forment une couche visqueuse dans l'intestin grêle. La couche visqueuse atténue l'absorption intestinale du cholestérol alimentaire ainsi que la réabsorption des acides

biliaires (Fig. II.6). En réponse, le corps s'appuie sur le cholestérol circulant pour produire de nouveaux acides biliaires entraîne ainsi une réduction des taux de cholestérol dans le sang (Erkkila et Lichtenstein, 2006). Il est possible que la réduction des taux d'insuline puisse entraîner une diminution de la synthèse du cholestérol (Juntunen et *al.*, 2003).

➤ Des études ont montré que les BG entraînent une augmentation des acides gras à chaîne courte (SCFA) tels que l'acétate, le propionate et le butyrate, produits de leur fermentation bactérienne dans le colon. Ces SCFA, en particulier propionate, peuvent aussi entraîner indirectement une diminution du taux de cholestérol sanguin par l'inhibition de la HMG-CoA réductase (Levrat et *al.*, 1994).

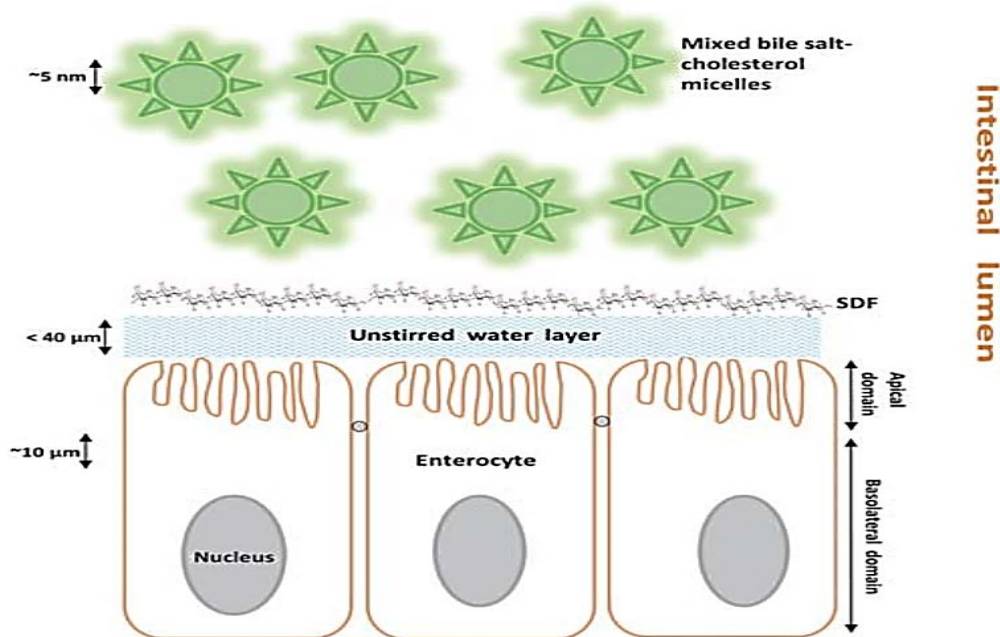


Figure II.5 : Illustration de la propriété de barrière potentielle des fibres alimentaires solubles dans l'intestin grêle (Gunniss et Gidley, 2010).

II.2.5.3 Le système immunitaire

Les BG sont reconnus par le système immunitaire inné. Cette reconnaissance joue un rôle important dans la défense de l'hôte et présente des possibilités spécifiques de modulation clinique de la réponse immunitaire de l'hôte. Les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques, entre autres, expriment plusieurs récepteurs capables de reconnaître les BG sous leurs différentes formes. Les BG sont reconnus par plusieurs récepteurs de système immunitaire, dont le récepteur du complément (CR3), les Toll Like Receptors (TLR-2/6), et plus particulièrement la dectine-1 (Fig. II.5), ce récepteur clé des BG traduit la reconnaissance en signalisation intracellulaire (Goodridge et *al.*, 2009), stimule les réponses cellulaires et participe à l'orchestration de la réponse immunitaire adaptative (la phagocytose , la production

de facteurs pro-inflammatoires entraînant l'élimination d'agents infectieux (Brown, 2006 ; Schorey et Lawrence, 2008)).

Les BG sont capturés par les macrophages via le récepteur Dectine-1 avec ou sans TLR-2/6. Les grosses molécules de BG sont ensuite internalisées et fragmentées en petites molécules puis ils sont transportés dans le système réticulaire de la moelle et de l'endothélium où ils seront ensuite relâchés. Ces petits fragments de BG sont finalement pris en charge par les granulocytes circulants, via le récepteur du complément (CR3). La réponse immunitaire sera alors activée, l'une des actions est la phagocytose des cellules tumorales marquées par un anticorps monoclonal (Chan et *al.*, 2009).

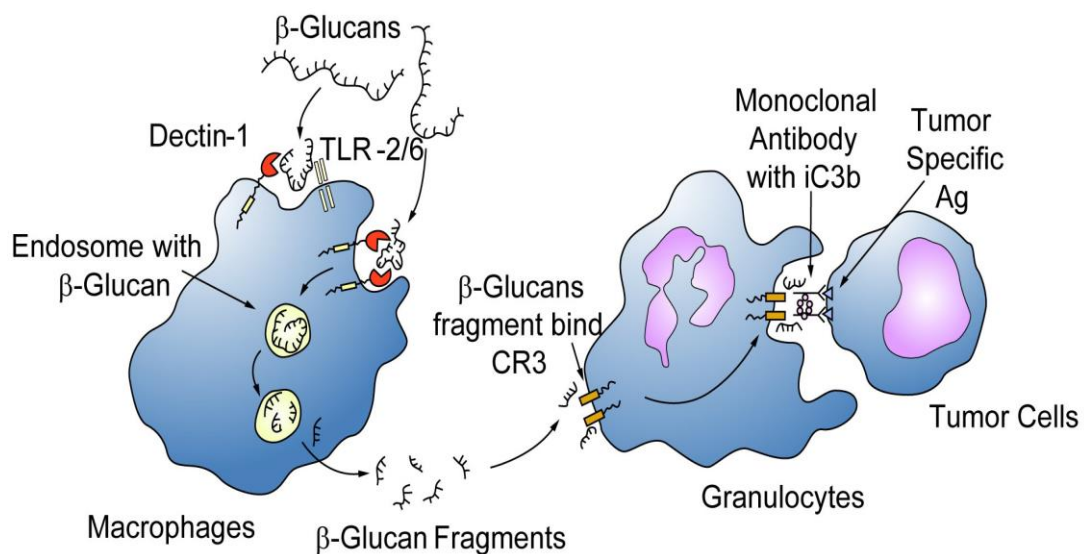


Figure II.6 : Modes d'action des BG sur les cellules immunitaires (Chan et *al.*, 2009).

Chapitre III : Les bactéries lactiques

III.1. Définition

Les LAB sont des cellules procaryotes, organotrophes, formant un groupe de 12 genres dont *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* *Bifidobacterium* et *Streptococcus*. C'est un groupe hétérogène constitué de Cocci et de Bacilles (Badis et *al.*, 2005). Ce sont des bactéries à Gram positif, non sporulantes, aéro-anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, généralement immobiles, acido-tolérantes et capable de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C (Axelsson, 2004).

Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminées, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles ; c'est la raison qui explique leur abondance dans le lait (Axelsson, 2004 ; Leveau et Bouix, 1993). Elles sont toutes

considérées comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe), excepté certaines espèces ont obtenu le statut QPS (Quality Presumption of safety) (Leveau et Bouix, 1993).

III.2. Origines des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont ubiquistes, elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande et des végétaux (plantes et fruits) (König et *al.*, 2009).

Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et on peut les trouver aussi dans les cavités buccales, vaginales et dans les fèces (Leveau et Bouix, 1993).

III.3. Métabolisme fermentaire

III.3.1. Métabolisme des sucres

Les LAB utilisent principalement l'une des trois voies majeures du métabolisme des sucres (Axelsson, 2004) :

- **La voie homofermentaire** : où les LAB convertissent presque quantitativement le glucose en acide lactique (90 à 95%). En dehors du glucose, les bactéries homolactiques ont la capacité de fermenter d'autres mono ou disaccharides.
- **La voie hétérofermentaire facultative** : où Les LAB appartenant à cette classe sont les leuconostocs et certains lactobacilles produisent de l'acide lactique et de l'acide acétique.
- **La voie hétérofermentaire stricte** : dans cette voie, les bactéries produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et de CO₂.

III.3.2. Métabolisme azoté

De fait de leurs nombreuses auxotrophies pour les acides aminés, la croissance des LAB repose sur leur système protéolytique. Ces systèmes sont remarquablement similaires chez les lactocoques et des lactobacilles, en ce qui concerne leurs composants et leurs modes d'action. Il comporte des protéases ancrées à la surface bactérienne et des peptidases cytoplasmiques (Atlan et *al.*, 2008 ; Picon et *al.*, 2010 ; Savijoki et *al.*, 2006). Le catabolisme des acides aminés est une voie majeure de formation de molécules aromatiques (alcool, aldéhydes, acides organiques, ...), comme il peut être une source d'énergie pour certaines bactéries lactiques en cas de limitation en nutriments (Williams et *al.*, 2001).

III.4. Les aptitudes biotechnologiques des LAB

Les LAB présentent des activités métaboliques et des propriétés technologiques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle. Les aptitudes fonctionnelles et technologiques recouvrent les propriétés suivantes : activité acidifiante, propriétés enzymatiques (activités protéolytiques, peptidasiqyes et lipolytiques), production de métabolites d'intérêt (domaine médicale et alimentaire) telle que le peroxyde d'hydrogène, les acides organiques et les bactériocines (Makhloufi, 2011).

D'autres avantages sont associées aux LAB lorsqu'elles sont utilisées dans le domaine de technologie alimentaire, tels que l'augmentation des valeurs nutritionnelles des aliments, la réduction de la production des toxines et les propriétés probiotiques. En plus de leur propriété entant que bioconservateurs, les LAB peuvent jouer un rôle dans la diminution des gaz issus de la fermentation ainsi qu'à l'amélioration du goût des aliments (Heenan et *al.*, 2002).

Chapitre IV : Probiotiques, Prébiotiques et symbiose

IV.1. Microbiote intestinal et diabète

Le microbiote intestinal est maintenant reconnu comme un organe entier complexe comprenant une quantité incroyable d'au moins 10^{14} bactéries appartenant à des milliers d'espèces. Le génome collectif de tout le microbiote intestinal désigné par (microbiome) dépasse le génome humain d'au moins 100 fois. Au cours des cinq dernières années, diverses études métagénomiques et métabolomiques ont fait l'objet de plusieurs recherches pour comprendre le rôle crucial du microbiote intestinal dans la santé humaine (Fig. II.7). Il a également été signalé que le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans la pathogenèse du DT2, de l'obésité et des troubles métaboliques inflammatoires associés. Les preuves accumulées appuient la nouvelle hypothèse selon laquelle des maladies métaboliques telles que l'obésité et le DT2 se développeraient en raison d'une inflammation modérée, systémique et chronique provoquée par une perturbation de la microflore intestinale normale induite par l'apport alimentaire d'un régime riche en graisses et en fructose (Panwar et al., 2013).

La muqueuse intestinale est un site majeur pour l'invasion d'agents pathogènes : lorsqu'elle est non endommagée, elle constitue la première ligne de défense contre les antigènes. Une perméabilité intestinale accrue peut faciliter l'absorption d'antigènes susceptibles de nuire aux cellules β du pancréas. Les patients DT1 montrent des perturbations dans la structure des jonctions serrées à la suite d'une diminution de l'expression de la zonuline, une protéine liée à

la régulation de la perméabilité intestinale. Les antigènes d'origine alimentaire ou pathogène, facilités par une augmentation de la perméabilité intestinale, déclenchent une inflammation et des réponses immunitaires, pouvant conduire à la destruction des cellules β du pancréas. L'insuline bovine, par exemple, que l'on trouve dans le lait de vache, semble avoir un rôle dans la destruction auto-immune des cellules β pancréatiques par les lymphocytes T intestinaux. En outre, des modifications du microbiote intestinal peuvent entraîner une altération des réponses inflammatoires, un événement important dans la pathogenèse du DT1. Les enfants atteints de DT1 ont présenté des nombres plus élevés de Clostridium, Bacteroides et Veillonella et des nombres plus faibles de Bifidobacterium et de Lactobacillus, contrairement aux enfants en bonne santé (Gomes et al., 2014)

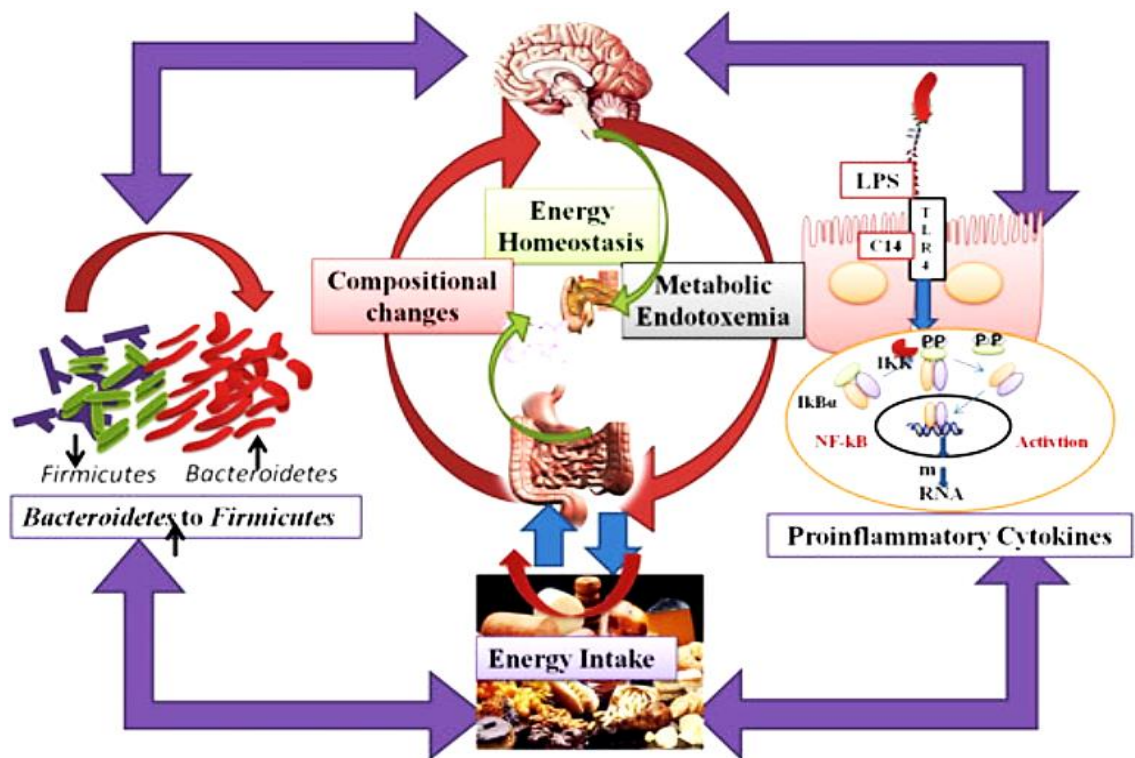


Figure II.7 : Rôle du microbiote intestinal dans le développement et le contrôle du DT2 (Panwar et al., 2013)

IV.2. Probiotiques

IV.2.1. Définition : un probiotique est un complément alimentaire microbien vivant qui, lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante, exerce des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels. Le concept initial de probiotiques est issu des travaux de Metchnikoff au début du XX^{ème} siècle. Par la suite, Shaper et al. (1963) et plus tard, Mann (1974) ont observé une réduction du cholestérol sérique après la consommation de quantités abondantes de lait fermenté avec *Lactobacillus* et/ou *Bifidobacterium* sauvages. Les

probiotiques ont été étudiés en tant que complément alimentaire potentiel pouvant contribuer positivement à la santé d'un individu. Ces avantages pour la santé ne se limitent pas au tractus intestinal, mais incluent également l'amélioration des troubles métaboliques systémiques, tels que le DT2 et les MCV (Nagpal et *al.*, 2012).

IV.2.2. Critères de sélection et exigences pour les souches probiotiques

Selon les recommandations de l'OMS, de la FAO et de l'EFSA, les souches probiotiques doivent respecter les critères de sécurité et de fonctionnalité, ainsi que celle liées à leur utilité technologique (Tab. II.3). Les caractéristiques probiotiques ne sont pas associées au genre ou à l'espèce d'un microorganisme, mais à peu de souches spécialement sélectionnées d'une espèce particulière. Les probiotiques devraient également avoir des effets documentés sur la santé compatible avec les caractéristiques de la souche présente dans un produit commercialisé (Markowiak et Slizewska, 2017).

IV.2.3. Mécanisme d'action des probiotiques

Pour que les LAB puissent avoir un rôle bénéfique sur la santé humaine, il faut qu'elles gardent une certaine activité, voire une viabilité lors du transit intestinal. Ainsi, les bactéries elles-mêmes ou les enzymes doivent passer sans dommage irréversible la barrière acide de l'estomac, puis l'effet inhibiteur éventuel des sels biliaires.

Chez l'homme, ces bactéries jouent un rôle inhibiteur contre les bactéries pathogènes et améliorent la digestion. L'effet bénéfique est dû à plusieurs mécanismes :

- La production d'acides organiques (acide lactique, acide acétique), de peroxyde d'hydrogène, et de bactériocines qui limitent le développement des entérobactéries.
- Certaines souches ont la capacité de déconjuguer les sels biliaires qui sont alors plus inhibiteurs sur le développement des bactéries pathogènes que les formes conjuguées.
- Les souches peuvent inhiber l'implantation des germes pathogènes par compétition pour l'adhésion aux cellules intestinales, ce qui permet une colonisation rapide et dirigée du tube digestif.
- Ces bactéries peuvent réduire l'absorption de substances toxiques (ammoniac, amines, indole) et peuvent ainsi diminuer les biotransformations des sels biliaires et des acides gras en produits toxiques.

Tableau II.3 : Critères de sélection des souches probiotiques (Markowiak et Slizewska,2017)

Critères	Propriétés requises
sécurité	D'origine humaine ou animale
	Isoler du tractus gastro-intestinal d'individus en bonne santé.
	Antécédents d'utilisation en toute sécurité.
	Identification précise (phénotype et de génotype).
	Absence de données concernant une association avec une maladie infectieuse.
	Absence de capacité à dégrader les sels d'acide biliaire.
	Aucun effet indésirable.
	Absence de gènes responsables de résistance aux antibiotiques
Fonctionnalité	Compétitivité vis-à-vis du microbiote vivant dans l'écosystème intestinal.
	Capacité à survivre et à maintenir l'activité métabolique et à se développer sur le site cible.
	Résistance aux sels biliaires et aux enzymes.
	Résistance au faible pH dans l'estomac.
	Compétitivité vis-à-vis des espèces microbiennes habitant l'écosystème intestinal (y compris les espèces étroitement apparentées).
	Activité antagoniste vis-à-vis des agents pathogènes (Ex. <i>H. pylori</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium difficile</i>).
	Adhérence et capacité à coloniser certains sites particuliers de l'organisme hôte et taux de survie approprié dans le système gastro-intestinal.
Convivialité technologique	Production facile de quantités élevées de biomasse et productivité élevée des cultures.
	Viabilité et stabilité des propriétés souhaitées des bactéries probiotiques au cours du processus de fixation (congélation, lyophilisation), de la préparation et de la distribution des produits probiotiques.
	Taux de survie au stockage élevé dans les produits finis (en conditions aérobies et micro-aérophiles).
	Garantie des propriétés sensorielles souhaitées des produits finis (dans le cas de l'industrie alimentaire).
	Stabilité génétique.
	Résistance aux bactériophages

- Les probiotiques peuvent également produire des métabolites susceptibles de neutraliser « in situ » certaines toxines bactériennes.
- Ils peuvent stimuler les cellules du système immunitaire et favoriser la production d'anticorps qui inhibent ainsi les bactéries pathogènes à la surface des muqueuses intestinales.
- Certaines souches peuvent posséder une activité anti-cancérogène dont les propriétés peuvent se répartir en deux catégories
- La prévention de l'initiation d'un cancer, soit en détruisant des substances Pré-cancérogènes présentes dans l'organisme, soit en inhibant les bactéries présentes dans le tractus digestif, productrices d'enzymes catalysant la conversion de substances cancérogènes.

- La suppression de cellules tumorales, soit directement, soit de façon indirecte, en favorisant l'activité phagocytaire des macrophages.
- Les Lactobacilles excrètent la bêta-galactosidase, souvent déficiente dans le tractus digestif de l'hôte et facilite donc la digestion du lactose.
- Les probiotiques peuvent stimuler l'activité enzymatique de micro-organismes endogènes permettant ainsi une meilleure assimilation des aliments (Brigidi et *al.*, 2001).

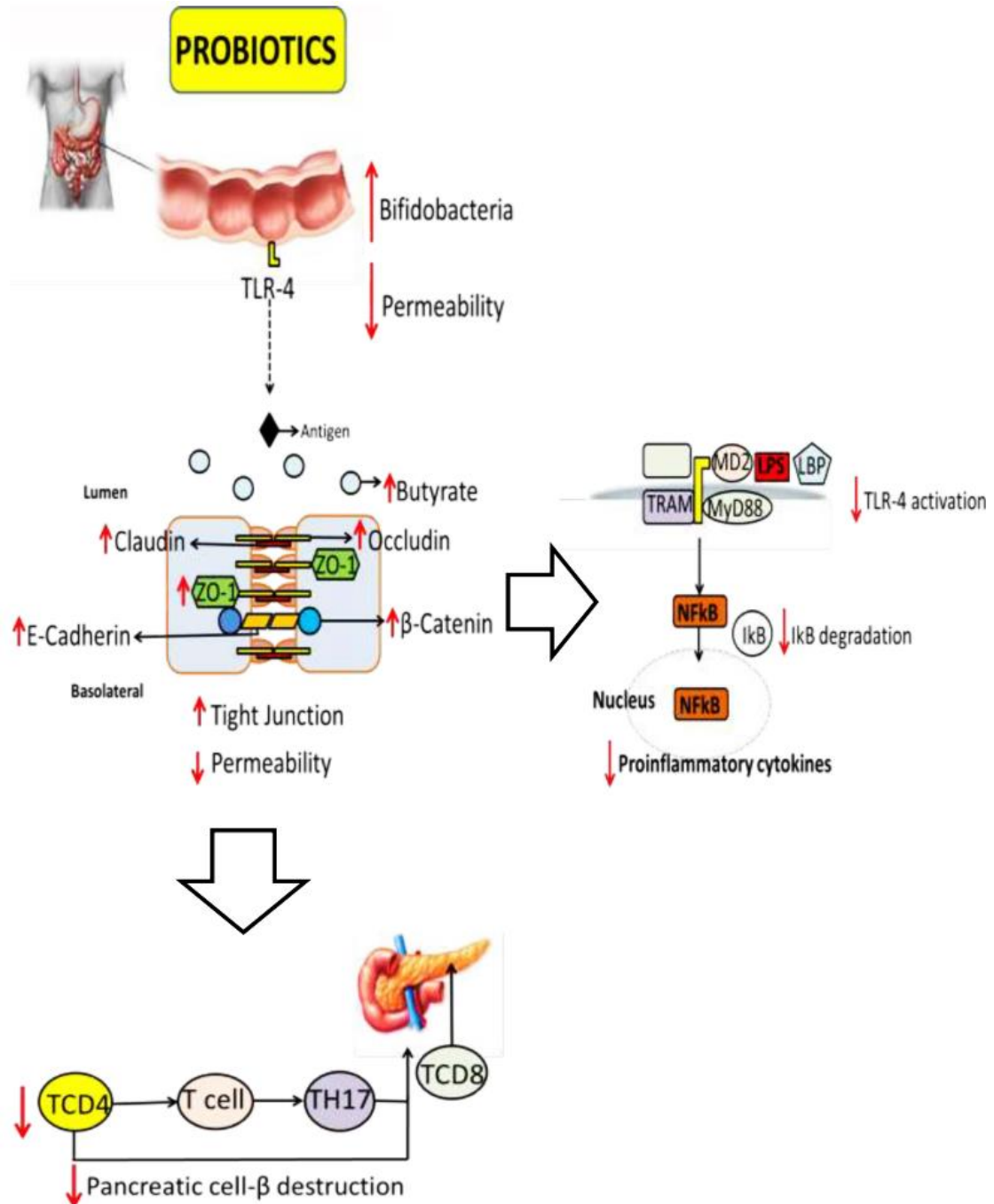


Figure II.8 : Mécanismes d'actions probiotiques dans les DT1 et DT2 (Gomes et *al.*, 2014)

IV.3. Prébiotiques

IV.3.1. Définition : Un prébiotique a d'abord été défini comme un ingrédient alimentaire non digestible qui affecte avantageusement l'hôte en stimulant de manière sélective la croissance et/ou l'activité d'une ou de plusieurs bactéries dans le côlon et améliore ainsi la santé de l'hôte. Par la suite, Roberfroid a déclaré qu'un prébiotique est un ingrédient fermenté sélectivement qui permet des changements spécifiques, à la fois dans la composition et/ou l'activité de la microflore gastro-intestinale, qui confère des avantages pour le bien-être et la santé de l'hôte (Gibson et Roberfroid, 1995).

IV.3.2. Critères de sélection prébiotiques

Selon Wang (2009), il existe cinq critères de base pour la classification des prébiotiques. Un prébiotique doit être :

- Non digéré (ou seulement partiellement digéré) ;
- Non absorbé dans l'intestin grêle ;
- Mal fermenté par des bactéries dans la cavité buccale ;
- Bien fermenté par des bactéries intestinales bénéfiques ;
- Faiblement fermenté par des pathogènes potentiels dans l'intestin.

IV.3.3. Mécanisme d'action des prébiotiques

L'objectif principal des prébiotiques est de stimuler spécifiquement la croissance et l'activité de bactéries bénéfiques dans le tractus gastro-intestinal, ce qui confère un avantage pour la santé de l'hôte. Les SCFA, tels que l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique, sont les produits finaux essentiels du métabolisme des glucides. Les SCFA, qui sont ensuite utilisés par l'hôte comme source d'énergie, réduisent le développement de troubles gastro-intestinaux, de maladies cardiovasculaires et de cancers en induisant l'apoptose (Slavin, 2013). En outre, les prébiotiques pourraient stimuler le système immunitaire, produire de la vitamine B, inhiber la croissance des agents pathogènes et réduire le taux d'ammoniac dans le sang. Ils diminuent également les taux de glucagon en fonction de la dose, améliorent la tolérance au glucose et activent le glucagon like peptide-1 (GLP-1), qui peut stimuler l'augmentation de la production d'insuline et augmenter la sensibilité à l'insuline. Ainsi, l'administration de prébiotiques joue probablement un rôle régulateur dans la modulation du métabolisme endogène (Parnell et Reimer, 2012).

IV.4. Symbiose (probiotiques et prébiotiques)

Les symbioses sont utilisées non seulement pour améliorer la survie des microorganismes bénéfiques ajoutés aux aliments, mais également pour stimuler la prolifération de souches bactériennes natives spécifiques présentes dans le tractus gastro-intestinal. L'effet des symbioses sur le métabolisme de l'hôte reste incertain. Il convient de mentionner que l'effet des symbioses sur la santé est probablement associé à la combinaison individuelle d'un probiotique et d'un prébiotique. Considérant un très grand nombre de combinaisons possibles, l'application de symbioses à la modulation du microbiote intestinal chez l'homme semble prometteuse (Markowiak et Slizewska, 2017).

IV.4.1. Critères de sélection des symbioses

Le premier aspect à prendre en compte lors de la composition d'une formule symbiotique doit être la sélection d'un probiotique et d'un prébiotique approprié, exerçant un effet positif sur la santé de l'hôte s'il est utilisé séparément. La détermination des propriétés spécifiques que doit posséder un prébiotique pour avoir un effet favorable sur le probiotique semble être la méthode la plus appropriée. Un prébiotique doit stimuler sélectivement la croissance des microorganismes, ayant un effet bénéfique sur la santé, avec une stimulation simultanée absente (ou limitée) des autres microorganismes.

IV.4.2. Mécanisme d'action des symbioses

Étant donné qu'un probiotique est essentiellement actif dans le petit et le gros intestin et que l'effet d'un prébiotique est observé principalement dans le gros intestin, la combinaison des deux peut avoir un effet synergique. Les prébiotiques sont principalement utilisés comme milieu sélectif pour la croissance d'une souche probiotique, la fermentation et le passage intestinal. Il existe des indications dans la littérature selon lesquelles, en raison de l'utilisation de prébiotiques, les microorganismes probiotiques acquièrent une tolérance plus élevée aux conditions environnementales, notamment à l'oxygénation, au pH et à la température dans l'intestin d'un organisme particulier (Sekhon et Jairath, 2010). Cette combinaison de composants conduit à la création de compléments alimentaires microbiologiques viables et la garantie d'un environnement approprié permet d'avoir un impact positif sur la santé de l'hôte. Deux modes d'action synbiotique sont connus (Manigandan *et al.*, 2012) :

- Action grâce à la viabilité améliorée des microorganismes probiotiques ;
- Action par la fourniture d'effets spécifiques sur la santé.

La stimulation des probiotiques avec les prébiotiques entraîne la modulation de l'activité métabolique dans l'intestin avec le maintien de la biostructure intestinale, le développement d'un microbiote équilibré et l'inhibition des agents pathogènes potentiels présents dans le tractus gastro-intestinal (De Vrese et Schrezenmeir, 2008). Les symbioses entraînent une réduction des concentrations de métabolites indésirables, ainsi que l'inactivation des nitrosamines et des substances cancérigènes. Leur utilisation entraîne une augmentation significative des niveaux des SCFA, de cétones, de sulfure de carbone et d'acétates de méthyle, ce qui peut avoir un effet positif sur la santé de l'hôte (Manigandan et al., 2012). En ce qui concerne leur efficacité thérapeutique, les propriétés souhaitables des symbioses comprennent les effets antibactériens, anticancérigènes et anti-allergiques. Il s'avère que les symbioses peuvent être très efficaces dans la prévention de l'ostéoporose, la réduction des taux de graisses et de glucose dans le sang, l'immunomodulation et le traitement des troubles cérébraux (Pandey et al., 2015).

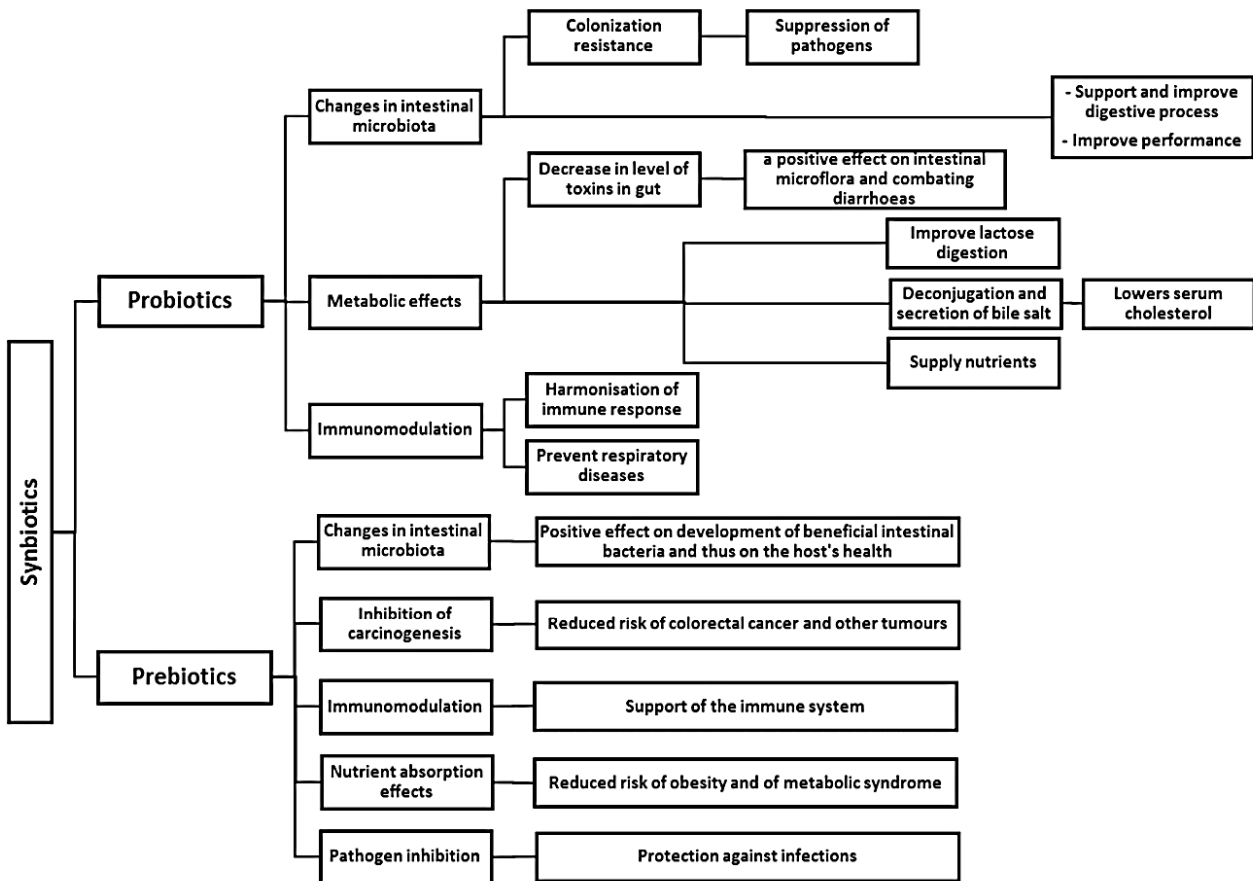


Figure II.9 : Mécanismes d'action des symbioses et leurs effets (Markowiak et Slizewska, 2017)

MATERIEL ET METHODES

Chapitre 01 : Matériel et méthodes

I. Extraction du bêta-glucane à partir de l'orge

I.1. Matériel biologique

Les échantillons de grains d'orge utilisés dans cette étude appartiennent à la variété locale SAIDA 183 (voir annexe I). Les échantillons de grains d'orge nous sont fournis par l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de Constantine et de Sidi Bel-Abbes. Au laboratoire, les échantillons ont subi un nettoyage afin d'éliminer les matières étrangères ainsi que les parties non comestibles, ils sont ensuite séchés à l'air libre et conservés. L'orge est ensuite broyée en utilisant le broyeur MF 10 (IKA) équipé de tamis de 0.5 mm de diamètre.

I.2. Protocole d'extraction du bêta-glucane

Pour l'extraction de BBG, la méthode décrite par Wood et *al.* (1978) et adaptée par Temelli (1997) est utilisée avec quelques modifications (Fig. III.1).

Pour la précipitation de l'amidon, 50 g de l'échantillon de farine d'orge sont ajoutés à 500 mL d'eau distillée à pH 07, ajustés avec du NaCO₃ à 20%, et réchauffés à la température de 55°C sur une plaque chauffante avec agitation pendant 30 min. La solution est centrifugée à 4940g/30 min et à +4 °C. Le résidu est éliminé et le pH du surnageant ajusté à 4.5 avec de l'HCl 2M ensuite centrifugé à 5000 g/30 min à +04°C pour séparer les protéines précipitées. Le pH est ajusté à 4.5 parce que, selon Yalçın et Çelik (2007), la solubilité des protéines de la farine d'orge à des pH acides diminue autour de pH 4 et 6 et augmente à pH basiques. Un volume égal d'éthanol est ajouté au surnageant pour précipiter le BBG. Après 12 h à +04 °C, la solution est centrifugée à 3800 g/10 min. Le précipité est remis en suspension dans de l'éthanol, filtré, rincé avec de l'éthanol et séché dans une étuve à +25 °C avec circulation d'air forcée pendant 90 min. l'extrait de BBG est par la suite lyophilisé puis conservé à +04 °C.

I.2.1. Détermination de la quantité du BBG

Les teneurs en BBG de l'échantillon sont déterminées par la méthode AOAC 995.15 (McClea et Glennie-Holmes, 1985) en utilisant un kit de dosage (Megazyme, Irlande). La méthode permet d'analyser de manière fiable des échantillons à faible teneur en β-glucane. La méthode repose sur la dispersion des échantillons dans un tampon phosphate (04 ml, 20 mM, pH 6.5) et l'incubation avec la lichénase (EC 3.2.1.73) à 50 °C pendant 60 min. Une seconde étape avec la β-glucosidase (EC 3.2.1.21) à 50 °C pendant 20 min permet d'hydrolyser les

oligosaccharides en glucose. Le glucose est ensuite dérivé en une substance colorée (Fig.III.2) et analysé par spectrophotométrie à 510 nm contre le blanc.

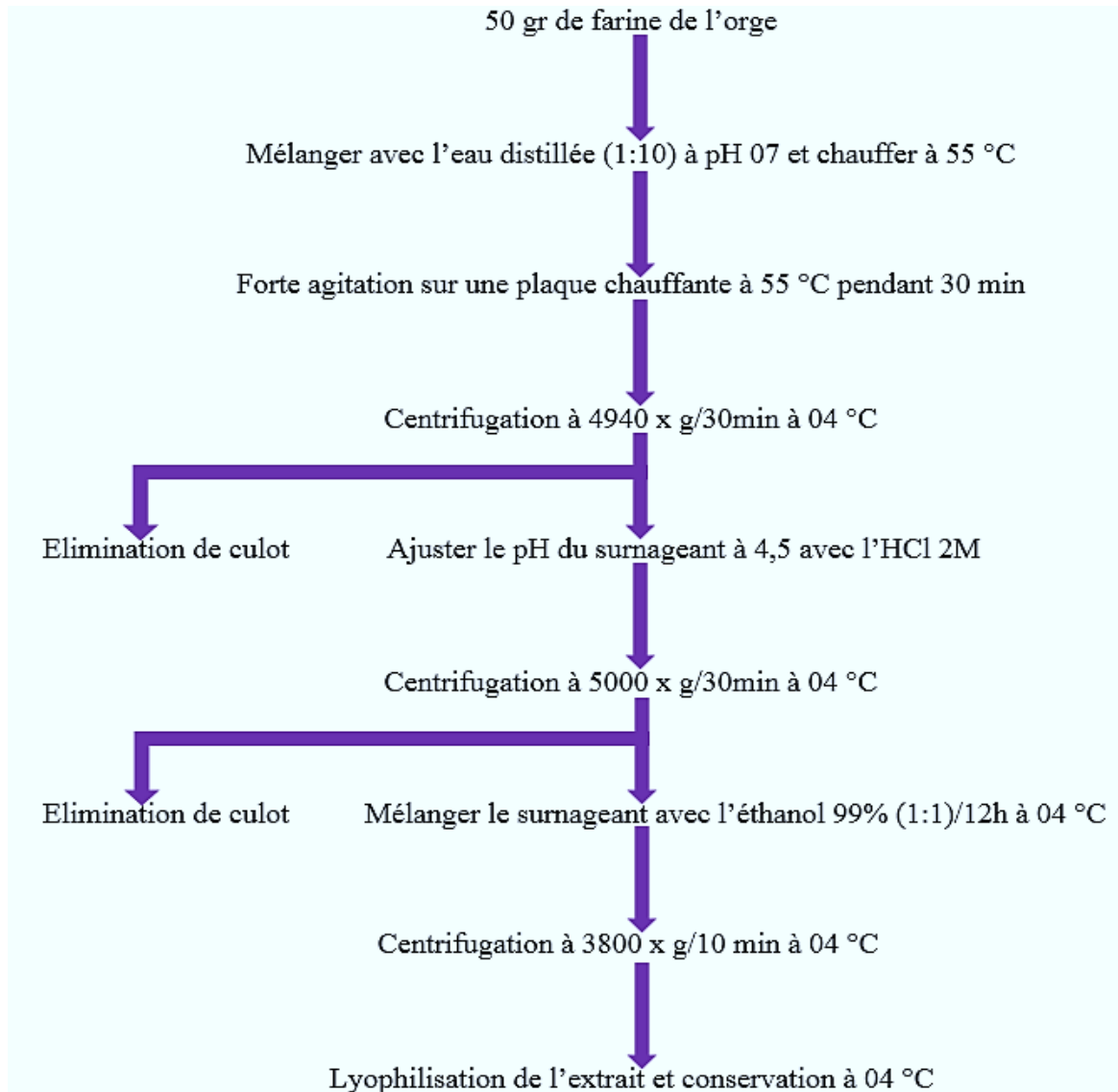


Figure III.1 : Protocole d'extraction des bêta-glucanes à partir de l'orge (Temelli, 1997)

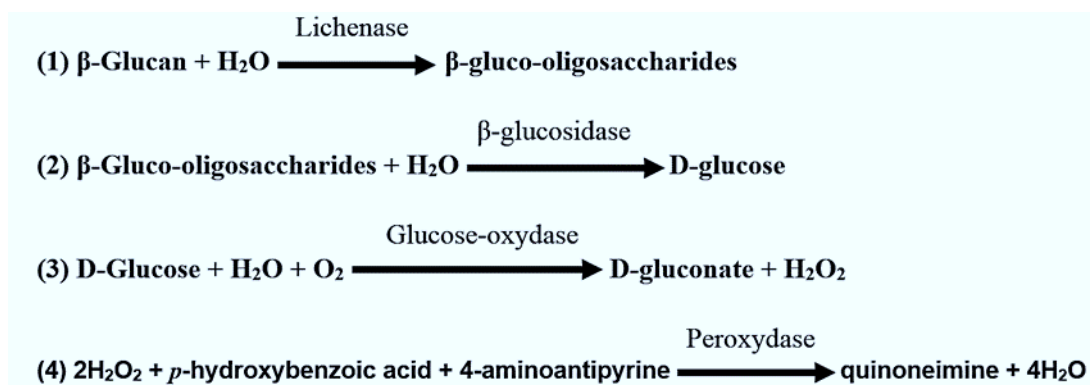


Figure III.2 : Principe de dosage des bêta-glucanes dans les céréales (McClea et Glennie-Holmes, 1985)

I.3. Etude des propriétés antioxydantes du BBG

I.3.1. Détermination de la concentration des polyphénols totaux

La concentration des polyphénols totaux de BBG est déterminée par la technique qui utilise le Folin-Ciocalteu (Kim et *al.*, 2003, Slinkard et Singleton, 1977). Tout d'abord, 250 μL de BBG (1mg/mL) ou le standard (acide gallique) sont ajoutés à 1.25 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué (0.2N). Après 05 min à température ambiante, 1 mL de solution de Na_2CO_3 à 7% (P/V) est ajouté. Après 60 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 750 nm. Huit (08) concentrations (10-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de solutions d'acide gallique dans le méthanol sont préparées et utilisées pour la courbe d'étalonnage. La concentration phénolique est exprimée en μg équivalent acide gallique (GAE)/mg d'échantillon.

I.3.2. Détermination de la concentration de flavonoïdes totaux

La quantité de flavonoïdes est déterminée selon la méthode colorimétrique décrite par Öztürk et *al.* (2011). La teneur en flavonoïdes du BBG est basée sur la complexation avec Al_3^+ . 500 μL de solution de BBG dans le méthanol sont ajoutés à des tubes à essai contenant 1.9 mL de méthanol, 50 μL d'acétate de potassium (1 M) et 50 μL de nitrate d'aluminium (10%). Après incubation à température ambiante pendant 40 min, l'absorbance est déterminée à 415 nm. La quercétine est utilisée comme étalon à diverses concentrations (0-200 μg). La teneur en flavonoïdes est exprimée en μg équivalent quercétine/mg d'échantillon.

I.3.3. Activité de piégeage du radical libre DPPH⁺

L'activité de piégeage radicalaire de BBG est déterminée en utilisant le test DPPH selon Chang et *al.* (2001). La diminution de l'absorption de la solution de DPPH après l'addition d'un antioxydant est mesurée à 517 nm. La réaction nécessite la préparation d'un mélange de 40 μL de BBG à diverses concentrations (0.0625-4 mg/mL préparées dans le DMSO) avec 160 μL de solution de DPPH avec une DO de 0.5 (préparé dans du DMSO). Pour chaque concentration, un blanc est préparé en mélangeant 40 μL d'échantillons avec 160 DMSO. Un contrôle contenant 40 μL de DMSO et 160 μL de DPPH est également préparé. L' α -tocophérol (4 mg/ml) est utilisé comme standard. Après incubation pendant 30 min à l'obscurité, la diminution de l'absorption de la solution de DPPH est mesurée à 517 nm en utilisant un lecteur de microplaque à 96 puits (lecteur de plaque Enspire multimode, Perkin Elmer). L'activité de piégeage est exprimée en IC_{50} (Concentration en $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BBG qui réduit l'absorbance de DPPH de 50%). L'activité anti-radicalaire est déterminée en utilisant la formule :

$$\text{Activité de piégeage du DPPH (\%)} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

I.3.4. Activité de piégeage du radical libre ABTS^{•+}

Le test de décoloration des cations de radicaux libres de l'acide 2,2'-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS) est effectué en utilisant la méthode de Re et *al.* (1999) avec de légères modifications. ABTS^{•+} est produit par oxydation de ABTS 7 mM dans l'eau et 2.5 mM de persulfate de potassium pendant 16 h dans l'obscurité à température ambiante. Après 16 h, la solution ABTS^{•+} est diluée avec de l'eau à une absorbance comprise entre 0.70-0.72 à 734 nm. Ensuite, 160 µL de solution ABTS^{•+} sont ajoutés à 40 µL de BBG dans le DMSO à différentes concentrations. Après 10 min, l'absorbance est contrôlée à 734 nm par spectrophotomètre. Le DMSO est utilisé comme témoin, tandis que le BHA est utilisé comme standard. Les résultats sont exprimés en IC₅₀. La capacité à piéger le radical ABTS^{•+} est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Activité de piégeage de l'ABTS}^{\bullet+} (\%) = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

I.3.5. Activité antioxydante par la méthode de blanchiment du β-carotène

L'activité antioxydante de BBG est évaluée en utilisant le protocole de blanchiment du bêta-carotène selon la méthode de Marco (1968) et Miller (1971) avec de légères modifications. 0.5 mg de β-carotène est solubilisé dans 1 mL de chloroforme, puis 25 µL d'acide linoléique et 200 µL de Tween 40 sont ajoutés. Le chloroforme est par la suite évaporé, 50 ml de H₂O₂ à 30% sont ajoutés sous agitation vigoureuse. A 40 µL de l'échantillon à différentes concentrations, 160 µL de mélange β-carotène/acide linoléique sont ajoutés, puis l'absorbance initiale à 470 nm est mesurée en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits. Après incubation de la plaque pendant 2 h à 45 °C, l'absorbance est mesurée de nouveau. Le DMSO est utilisé comme témoin. Le BHT est utilisé comme standard. En utilisant l'équation suivante, l'activité anti-oxydante des β-glucanes est calculée en termes de pourcentage d'inhibition :

$$\text{Activité antioxydante} (\%) = [1 - (\text{AS}_{t=0} - \text{AS}_{t=120} / \text{Ac}_{t=0} - \text{Ac}_{t=120})] \times 100$$

Où AS_{t=0}: absorbance de l'échantillon à t = 0, AS_{t=120}: absorbance de l'échantillon à t = 120 min, AC_{t=0}: absorbance du contrôle à t = 0 et AC_{t=120}: Absorbance du contrôle à t = 120 min.

I.3.6. Activité antioxydante par la technique CUPRAC

Pour mesurer la capacité antioxydante réductrice de BBG, la méthode des ions cupriques (Cu²⁺) est utilisée selon Apak et *al.* (2004) et Özyürek et *al.* (2011) avec une légère modification. Les solutions de CuCl₂ 10 mM et de NH₄CH₃COO 1 M sont préparées dans l'eau bidistillée, tandis que la solution de Neocuproïne (Nc) à une concentration de 7.5 mM est

préparée dans l'éthanol absolu. 40 μL de solution de BBG à différentes concentrations sont ajoutés au mélange réactionnel constitué de 60 μL de Cu(II) , de 50 μL de Nc et de 50 μL de solutions de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. Ensuite, le mélange réactionnel est laissé au repos pendant 60 min pour atteindre l'équilibre. L'absorbance du complexe cupreux-néocuproïne est mesurée à 450 nm contre un blanc réactif. La concentration de BBG qui donne 0.5 d'absorbance (EC_{50}) est calculée graphiquement. BHA et BHT sont utilisés comme standards.

I.3.7. Réduction du Fer

La capacité de réduire Fe^{3+} est estimée par la méthode décrite par Oyaizu (1986) et Rodrigues et *al.* (2015), qui est basée sur la capacité des molécules de BBG à convertir la forme oxydée du fer (Fe^{3+}) en son état réduit Fe^{2+} . 10 μL de solution de BBG à des concentrations variables sont mélangés avec 40 μL de tampon phosphate 100 mM (pH 6.6) et 50 μL de ferricyanure de potassium à 1% (P/V). Le mélange est incubé à 50 °C pendant 20 min et la réaction est terminée en ajoutant 50 μL d'acide trichloroacétique (10% P/V), 40 μL d'eau et 10 μL de 0.1% FeCl_3 (P/V). L'absorbance est ensuite mesurée à 700 nm. 1 mg/mL d'EDTA est utilisé comme standard. L'intensité de l'absorbance est proportionnelle au pouvoir réducteur du mélange réactionnel. La concentration qui donne 0.5 de l'absorbance (EC_{50}) est calculée graphiquement.

I.3.8. Le piégeage du radical superoxyde par la méthode DMSO alcalin

La capacité de piégeage des radicaux superoxydes est mesurée en termes d'inhibition de la génération de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en utilisant des solutions alcalines de DMSO (Sanchez-Moreno, 2002 ; Sanja et *al.*, 2009) avec des modifications mineures. Cette méthode est adaptée aux microplaques à 96 puits. Le mélange réactionnel consiste en 40 μL de BBG à des concentrations variables (0 à 4 mg/mL dans du DMSO), 130 μL de DMSO alcalin (1 mL de DMSO contenant 5 mM NaOH dans 0.1 mL d'eau) et 30 μL de NBT (1 mg/mL dans le DMSO). Le mélange est incubé à 25 °C pendant 5 min et l'absorbance est mesurée à 560 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif. L'activité de piégeage est déterminée en utilisant l'équation :

$$\text{Piégeage de l'O}_2^{\cdot-} (\%) = [\text{Abs échantillon} - \text{Abs contrôle} / \text{Abs échantillon}] \times 100$$

I.3.9. Activité de piégeage du radical hydroxyl (OH^{\cdot})

L'activité de piégeage du radical hydroxyl (OH^{\cdot}) par le BBG est mesurée selon la méthode de Rajamanikandan et *al.* (2011). 200 μL de la solution réactionnelle finale consiste en 80 μL de diverses concentrations de BBG, 20 μL de FeSO_4 (8 mM), 20 μL H_2O_2 (20 mM) et 80 μL de salicylate de sodium (3 mM). Le mélange réactionnel est incubé pendant 1 h à 37 °C. L'acide

ascorbique est utilisé comme standard. Le développement de la couleur est mesuré à 560 nm contre un blanc. L'activité de piégeage est déterminée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Piégeage de OH}\cdot = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}/\text{Abs contrôle}] \times 100$$

I.3.10. Détermination de l'activité anticholinestérasique

Le pouvoir inhibiteur du BBG de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (ACHE) et de la butyrylcholinestérase (BCHE) est testé en utilisant une méthode spectrophotométrique légèrement modifiée (Ellman et *al.*, 1961). Dans cette étude, ACHE de l'anguille électrique et BCHE du sérum de cheval sont utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine (ACHI) et le chlorure de butyrylthiocholine (BCHC) sont utilisés comme substrats de la réaction. Brièvement, 110 μL de tampon phosphate de sodium 0.1 M (pH 8.0), 20 μL de solution ACHE (ou BCHE) et 50 μL de solution de β -glucanes à différentes concentrations (1000 μg -62.5 μg) sont ajoutés dans une microplaque de 96 puits. Après une période d'incubation de 10 min à 25 °C, la réaction est ensuite initiée par l'addition de 10 μL de DTNB et de 10 μL de substrat (ACHI ou BCHC). La quantité de DMSO dans le mélange ne dépasse pas 1.20%. La formation de l'anion 5-thio-2-nitrobenzoate jaune pendant la réaction est suivie par spectrophotométrie à 412 nm contre un blanc. La galanthamine est utilisée comme témoin positif. Les résultats sont donnés sous la forme d'une valeur de IC_{50} . Le pourcentage d'inhibition de l'ACHE ou la BCHE est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}/\text{Abs contrôle}] \times 100$$

I.3.11. Pouvoir inhibiteur de l'enzyme α -glucosidase

Des tests d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase de levure utilisant le *p*-nitrophényl- α -D-glucopyranoside (*p*-NPG) comme substrat sont réalisés sur des microplaques à 96 puits conformément à la méthode décrite par Zhang et *al.* (2014), avec des modifications mineures. Brièvement, le mélange réactionnel contient : α -glucosidase (15 μL , 1 unité/mL dans du tampon phosphate 100 mM, pH 6.8) mélangé avec différentes concentrations de BBG (7 mg/mL-0.219 mg/mL) et 40 μL de tampon phosphate dans une plaque de 96 puits. Après incubation à 37 °C pendant 10 min, 45 μL de solution de *p*-NPG (2 mM dans du tampon phosphate 0.1mM, pH 6,8) est ajouté pour initier la réaction. L'acarbose est utilisé comme standard (7 mg/mL- 0.219 mg/mL). L'activité enzymatique est suivie en mesurant le *p*-nitrophénol libéré à partir du PNP-glycoside à 405 nm toutes les 05 min pendant 15 min. Les échantillons témoins sont préparés sans BBG. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}/\text{Abs contrôle}] \times 100$$

II. Isolement et caractérisation des bactéries lactiques à partir du lait de chamelle

II.1. Collecte des échantillons du lait

Sept (07) échantillons de lait cru de chammelles proviennent de la région d'El-Abadla de la wilaya de Béchar de sud-ouest de l'Algérie. Le prélèvement est fait dans des flacons stériles, les mamelles des femelles sont lavées avec de l'eau javellisée à 2% et les premiers jets du lait sont éliminés. Par la suite, les échantillons sont placés dans une glacière puis transportés le même jour jusqu'au laboratoire de Microbiologie de la faculté des SNV de Sidi Bel-Abbes pour des analyses le lendemain matin.

II.2. Préparation des cultures

Après une étape d'enrichissement du lait pendant 48 à 72 h/37°C, un (01) ml de chaque échantillon est pipeté aseptiquement dans 9ml d'eau physiologique et des dilutions décimales sont réalisées (10^{-1} à 10^{-9}). Seules les dilutions 10^{-6} à 10^{-9} sont retenues etensemencées sur des boîtes coulées préalablement avec les milieux sélectifs des bactéries lactiques, MRS (Conda, Espagne) (30 et 45 °C) pour les lactobacilles et M17 (Conda, Espagne) (30 et 45 °C) pour les lactocoques.

II.3. Purification des souches

Les bactéries sont purifiées par stries sur milieu solide (MRS et M17). Des repiquages successifs sont réalisés à partir de 10 colonies différentes bien isolées choisies au hasard. Après coloration de Gram, l'aspect microscopique et le test de catalase ont permis de retenir les isolats montrant un Gram positif et une catalase négative. Ces colonies pures sont retenues pour la suite de l'étude (Leisner et *al.*, 1997).

II.4. Type fermentaire

Ce test permet d'identifier le type du métabolisme (homofermentaire ou hétérofermentaire) par lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation de CO₂ qui est piégé dans une cloche de Durham en milieu MRS-BCP glucosé pour les bacilles et en milieu M17-BCP glucosé pour les coques. Ce test permet de différencier les isolats homolactiques des hétérolactiques après une incubation à 37°C pendant 24 h jusqu'à 72 h. La présence du gaz dans la cloche indique un métabolisme hétérofermentaire alors que leur absence indique que les bactéries sont homofermentaires (Hariri et *al.*, 2009).

II.5. Conservation longue durée

A partir des cultures jeunes de 24h (milieu liquide), les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 tours par min pendant 10 min. Une fois le surnageant est éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot. Le milieu de conservation contient 70% de lait écrémé stérile et 30% de glycérol stérile. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes eppendorfs à -20°C (Badis et *al.*,2005).

II.6. Identification de l'espèce par les galeries API 50 CH (Profil fermentaire des sucres)

Les bactéries lactiques isolées sont identifiées au niveau de l'espèce ou de sous espèce en établissant leurs profils fermentaires à l'aide du microsystème d'identification API 50 CH (Référence 50300, Biomérieux, France). API 50 CH est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes. Elle est composée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation du substrat appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques) contenant des substrats sous forme déshydratée.

L'inoculum est préparé dans le milieu approprié api 50 CHL medium (référence 50410) à partir des cultures pures MRS liquide. Ensuite l'inoculum est réparti à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie tout en respectant les conditions d'asepsie. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 24h puis prolongée jusqu'à 48h. L'utilisation du substrat se traduit par un changement de couleur dans les tubes.

II.7. Caractérisation partielle du potentiel probiotique des LAB isolées

II.7.1. La croissance à différents pH acide

A. Sur milieu solide

Le test de résistance au pH acides est réalisé sur milieu gélosé, en ensemençant les souches sur des géloses MRS à différents pH ajustés par addition d'HCl 1N lors de l'élaboration du milieu pour obtenir les pH suivants : 2 ; 2.2 ; 2.4 ; 2.6 ; 2.8 ; 3. Pour faire face à la liquéfaction de la gélose aux pH bas (acides), celle-ci est additionnée en Agar à raison de 5g pour un volume de 230 mL. Une fois les cultures lactiquesensemencées à partir de cultures fraîches, celles-ci sont mise en incubation à 37°C pour une durée de 24 à 48h. Une croissance sur la gélose traduit une résistance au pH en question.

B. Sur milieu liquide

Le même test précédant est fait sur milieu MRS liquide (inoculation de tubes de 10 ml) suite à l'ajustement du pH aux valeurs 2 ; 2.2 ; 2.4 ; 2.6 ; 2.8 et 3, la croissance bactérienne est évaluée par mesure de la DO₆₀₀ de chaque tube inoculé par spectrophotométrie, après 24h de culture. Le test est répété trois fois pour chaque pH et ce pour chaque souche (Chung et *al.*, 1999).

II.7.2. Test de résistance aux sels biliaries

Ce test vise à évaluer la résistance des souches à deux concentration en sels biliaries : 0.15 % et 0.3 % pour ainsi simuler la présence de ces sels dans le tractus gastro-intestinal. Pour cela, les souches sont ensemencées sur bouillon MRS avec des sels biliaries à raison d'une concentration finale de 0.15 % et 0.3 %. Les souches sont inoculées dans des tubes de 10 mL et incubées à 37°C pendant 24 h.

La croissance bactérienne dans chaque tube des deux concentrations est évaluée par spectrophotométrie à 600 nm (Chung et *al.*, 1999).

II.7.3. Test de mobilité

Le Mannitol Mobilité-Nitrate est un milieu de culture semi-mou caractérisé par l'utilisation de Mannitol et de Nitrate et permet la mise en évidence (ou non) de la mobilité bactérienne, il permet aussi de voir le métabolisme énergétique des bactéries. Dans le présent cas, il est utilisé pour mettre en évidence la mobilité des souches lactique, un caractère avantageux pour des cultures destinées à être utilisées en tant que probiotiques.

L'ensemencement est réalisé par piqûre centrale dans un tube de milieu mannitol mobilité avec 1 colonie de souches lactiques, suivie d'une incubation des cultures à 37°C pendant 24 à 48 h. L'observation d'un virement de couleur du rouge au jaune-orange indique une croissance bactérienne, tandis que la diffusion de cette couleur indique une mobilité des souches. Le cas contraire (couleur non diffusée) indique une immobilité de la souche en question.

II.7.4. Suivre de la cinétique de croissance bactérienne et estimation des paramètres de croissance

La cinétique de croissance bactérienne en fonction du temps chez les quatre souches lactiques est étudiée pour permettre ainsi une comparaison des paramètres de croissance bactérienne de chaque isolat lactique retenus dans cette étude.

La culture de souche est faite sur bouillon MRS (100 mL) avec une charge bactérienne initiale ajustée à 0.01 à 600nm pour chaque souche.

Les mesures des DO₆₀₀ sont réalisées pendant 8h30 min à des intervalles de temps de 30 min. Chaque mesure –répétée trois fois- est effectuée après une agitation de 10 secondes pour homogénéiser la culture bactérienne (El-Amine Bendaha et *al.*, 2012).

Les données ainsi obtenues sont utilisées pour tracer une courbe des DO₆₀₀ observée (en nuage de points), en plus de la modélisation par deux modèles : le modèle "Gompertz" et le modèle "DModel" par le programme DMFit 2.1. (add-in sur microsoft Excel) (Baranyi et Roberts, 1994).

Les résultats sont représentés sous forme de courbes de croissance avec les données observées (DO₆₀₀) en plus des deux courbes obtenues avec les deux modèles utilisés (fitted data).

II.7.5. Evaluation de l'antibiorésistance

A. Ensemencement

Pour cette évaluation, le milieu retenu comme pour les autres tests est le MRS (gélose). Pour chaque souche l'inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18h, en raclant à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées. Cet inoculum est déchargé de l'anse dans un bouillon MRS de 10 mL. Une fois la DO₆₀₀ de cette suspension lue, elle servira à l'ajustement de la charge bactérienne à une DO de 0.09 à 0.1 à 600 nm équivalente à 10⁶-10⁸ UFC/mL (selon les recommandations de l'OMS pour la standardisation de l'antibiogramme).

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum, en trempant un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne prête, suivie d'un essorage en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

En se servant de l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche du MRS, des stries serrées de haut en bas sont réalisées. Cette opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Enfin l'ensemencement est achevé en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

B. Application des disques d'antibiotiques

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24mm, centre à centre.

Les antibiotiques retenus lors de cette études sont au nombre de 33: Tobramycine, Amikacine, Piperacilline, Ciprofloxacine, Aztreoname, Acide Nalidixique, Cefixime, Rifampicine, Colistine sulfate, Lincomycine, Acide Fusidique, Netimicine, Cefotaxime, Pristinamycine, Colistine, Nitrofurantoïne, Levofloxacine, Clindamycine, Kanamycine, Oxacilline, Trimethoprim, Imipenene, Pefloxacine, Doxycycline, Azithromycin, Ampicilline, Ticarcilline/ Acide clavulanique, Ceftazidine, Fosfomycine, Ofloxacine, Penicilline, Teicoplanine, Spiramycine.

Chaque disque d'antibiotique est pressé à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application. Une fois appliquée le disque ne doit pas être déplacé.

C. Incubation et lecture

L'incubation est faite à 37°C pendant 24 h. La lecture se fait par la mesure avec précision des diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.

Les résultats de l'antibiogramme permettent ainsi de classer chaque souche bactérienne lactique par rapport à un antibiotique dans l'une des catégories : sensible (diamètre de plus de 18 mm), intermédiaire (diamètre entre 10 et 18 mm) ou résistante (diamètre entre 0 et 10 mm).

II.7.6. Test de l'antagonisme

Pour réaliser le test d'antagonisme, il faut avoir des pré-cultures des souches lactiques et la pré-culture de chaque souche cible (pathogènes et autres). À partir des boîtes inclinées de gélose MRS, nous avonsensemencé chacune des quatre souches lactiques isolées dans un tube à essais contenant 5 mL du bouillon approprié (bouillon MRS). Le tube est incubé à 37°C pendant 24 h. Alors que les souches cibles sontensemencées dans un tube de bouillon nutritif et incubée à 37°C pendant 24 h.

Le milieu Mueller-Hinton gélosé est coulé dans des boîtes de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les boîtes sontensemencées en surface (comme pour le test d'antibiorésistance) par des suspensions des souches cibles (avec inoculum ajusté à 10^6 - 10^8 UFC/mL par $DO_{600} = 0.09$ à 0.1). Ensuite des disques de papier filtre stérile imprégnés par 5 μ L de surnageant obtenu après centrifugation à 3000 tours/min pendant 5 min d'une culture jeune des souches lactiques (dans le bouillon MRS) sont déposés sur les géloseensemencées par les souche cibles. La diffusion des agents antimicrobiens dans le milieu gélosé se produit durant une incubation des boîtes à 37°C pendant 24 h. L'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques. Les diamètres des zones d'inhibition

apparaissant autour des disques sont ainsi mesurés. Ce test est répété trois fois pour chaque souche cible (Labioui et *al.*, 2005).

II.8. Propriété prébiotique du BBG *in vitro*

Le potentiel prébiotique de BBG est évalué conformément au protocole décrit par (Das et *al.*, 2014). Le glucose du milieu MRS (glucose 2 % P/V) est remplacé par le BBG (2 % P/V) en tant que source unique de carbone. Les deux milieux de culture (MRS et MRS modifié) sontensemencés avec des cultures jeunes de deux souches isolées du lait de chamelle ; *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides*, puis incubés pendant 24 h à 37°C en anaérobiose afin d'étudier le pouvoir de ces deux souches à utiliser le BBG comme source d'énergie. La croissance de chaque souche est contrôlée via les changements de pH dans le milieu et la mesure de DO à 0h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 18 h et 24 h. Le dénombrement d'UFC est réalisé sur gélose MRS par la technique de comptage direct.

II.9. Standardisation de l'inoculum des bactéries lactiques

Afin d'étudier l'aptitude des 03 souches, retenues pour l'étude *in vivo*, à exercer des effets antidiabétiques, une standardisation des inocula est indispensable. Pour cela les inocula des souches testées sont standardisés à 10^{+8} UFC/mL. A partir d'une culture fraîche, obtenue dans 5 mL de bouillon MRS, un ensemencement est réalisé sur le même milieu gélosé. Après 48 h d'incubation à 37°C, les colonies isolées sont raclées à l'aide d'une anse de platine, l'anse est ensuite déchargée dans 5 mL d'eau physiologique, après homogénéisation de la suspension bactérienne au vortex, les inocula sont ajustés jusqu'à obtenir une DO de 0.50 à 600 nm. Des dilutions décimales sont ensuite réalisées dans de l'eau physiologique (10^{-1} à 10^{-8}), à partir des dilutions préparées (10^{-6} jusqu'à 10^{-8}), 1mL de chaque dilution est ensemencé en masse dans une gélose MRS, puis incubé à 37°C pendant 48h. Au terme de l'incubation, le dénombrement des colonies est réalisé (Fig. III.3).

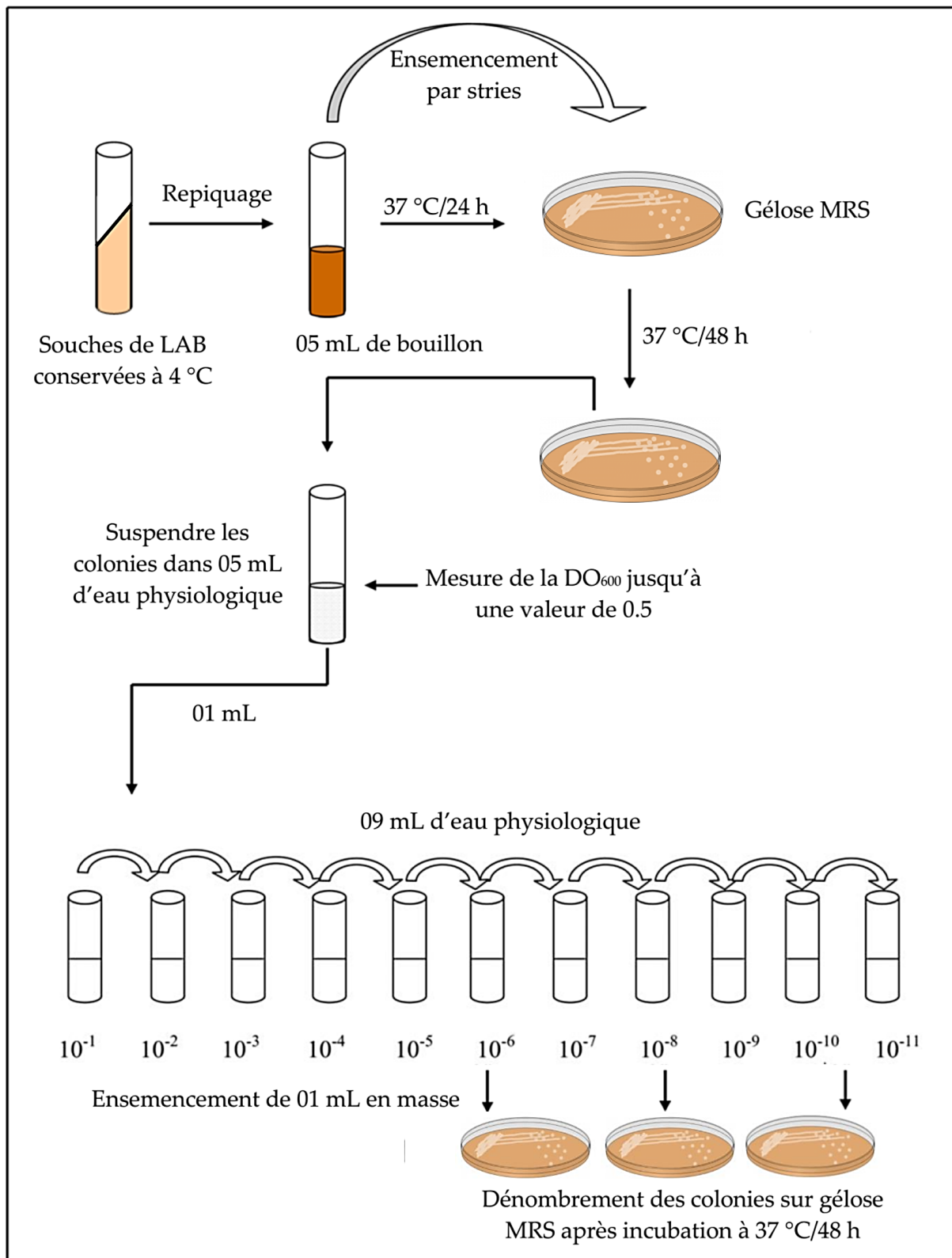


Figure III.3 : Standardisation de l'inoculum des bactéries lactiques

III. Etude *in vivo*

III.1. Choix de l'animal

Notre travail a porté sur des rats blancs mâles de souche Wistar. Le choix du rat Wistar s'explique par le fait qu'ils sont peu sensibles aux facteurs environnementaux et infectieux contrairement aux souris, leur caractère d'omnivore et surtout leur sensibilité aux conditions nutritionnelles (Adrian *et al.*, 1998).

L'étude est réalisée sur 36 rats mâles Wistar âgés de 8 semaines avec un poids corporel de 223 ± 27 g, obtenus auprès de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA). L'expérience est réalisée avec l'approbation du Comité d'éthique local de l'université de Constantine 01. Tous les animaux sont logés dans des cages en polystyrène, dont les dimensions et la structure répondent aux bons usages (02 rats par cage), avec accès à l'eau de boisson et la nourriture *ad libitum*. L'environnement est contrôlé, avec une température de $22 \pm 03^\circ\text{C}$ et une photopériode de 12 h/12 h pendant toute l'expérience. Le poids corporel des rats est mesuré chaque semaine et la consommation d'aliments est enregistrée tous les 2 jours. Après deux semaines de période d'adaptation, les animaux sont divisés en six (06) groupes.

III.2. Induction du diabète expérimental chez les rats

Le diabète est induit par injection intrapéritonéale d'une dose unique de Streptozotocine (STZ) (60 mg/kg). Tous les rats sont privés de nourriture toute la nuit avant l'injection. La STZ est fraîchement préparée dans un tampon citrate maintenu à $+4^\circ\text{C}$ (0.1 M, pH 4.5) (Yang *et al.*, 2011). Étant donné que la STZ est capable de produire une hypoglycémie mortelle à la suite d'une libération massive d'insuline, les rats reçoivent une solution de glucose 5% à la place de l'eau de boisson durant une nuit dans le but de prévenir l'hypoglycémie (Tanko *et al.*, 2008).

Le diabète est confirmé 48 h après l'injection de STZ par un prélèvement sanguin effectué au niveau de la veine caudale, seuls les rats qui ont une glycémie à jeun supérieure à 2.50 g/L sont considérés comme diabétiques, ils sont ensuite transférés dans des cages pour le contrôle de la consommation de nourriture et de l'eau.

Lot 01 : rats non diabétiques sans aucun traitement ;

Lot 02 : rats diabétiques sans traitement ;

Lot 03 : rats diabétiques traités avec la metformine (200 mg/Kg de poids corporel (P.C) ;

Lot 04 : rats diabétiques traités avec le BBG 50mg/Kg de P.C ;

Lot 05 : rats diabétiques traités avec les LAB 10^{+8} UFC/mL ;

Lot 06 : rats diabétiques traités avec le BBG 50mg/Kg P.C + LAB 10^{+8} UFC/mL.

Tableau III.1 : La composition de l'aliment des rats (selon le fournisseur)

Ingrédients	Quantité (g/100g d'aliments)
Glucides	51.3
Protéines	22
Lipides	5
Fibres alimentaires	4
Minéraux et vitamines	5.7
Eau	12

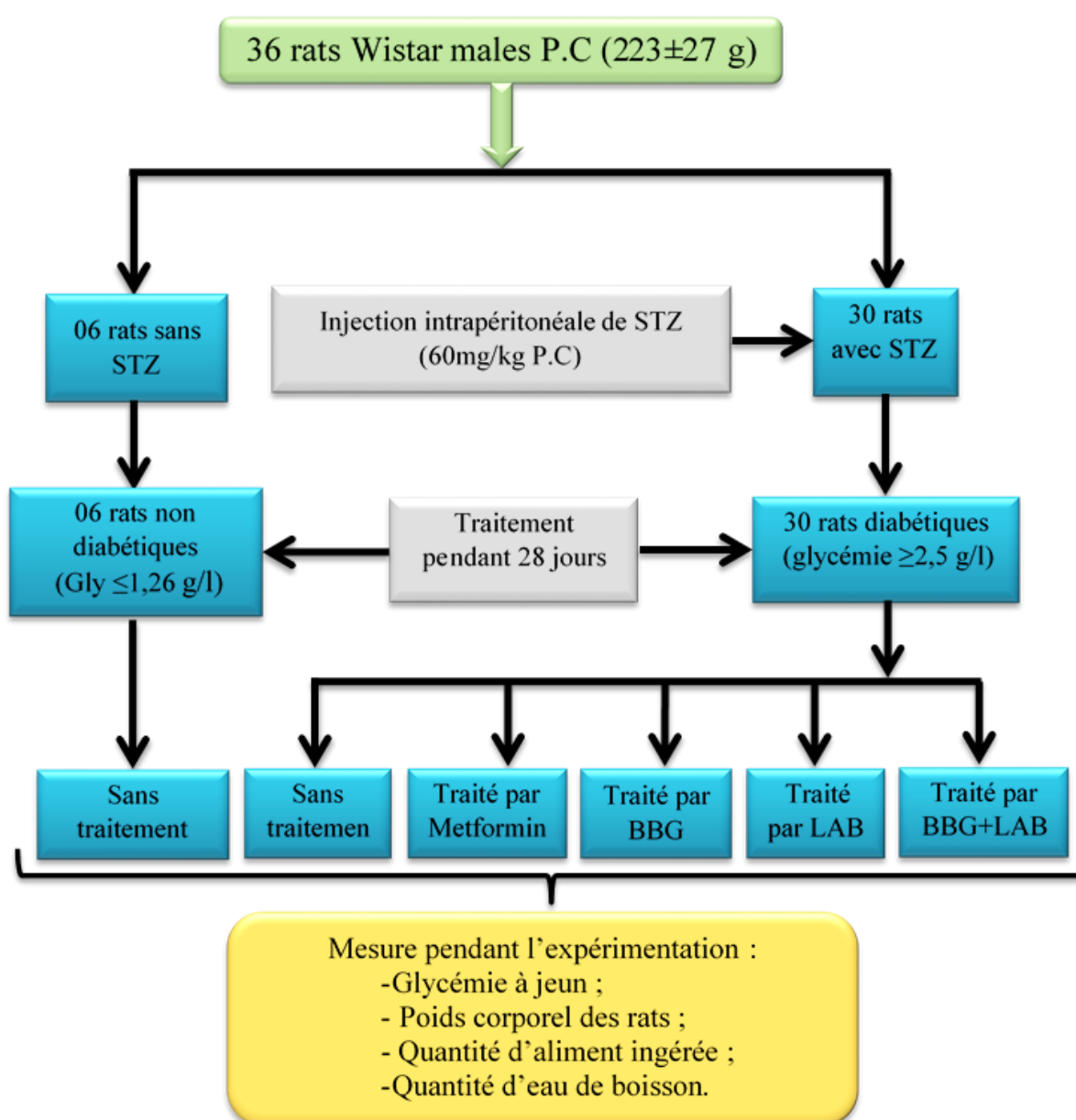


Figure III.3 :Organigramme représentant les différents groupes de rats soumis aux différents traitements

III.3. Mesure de la glycémie

Après l'induction du diabète, la glycémie des rats est mesurée chaque semaine à 10 h, au niveau de la veine caudale. Après nettoyage de la queue à l'alcool, les rats sont piqués à l'aide d'une fine aiguille, une goutte de sang est récupérée puis déposée sur une bandelette pour lecture de la glycémie (Accu Chek Performa, Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne).

III.4. Dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c)

L'hémoglobine glyquée est une hémoglobine sur laquelle s'est fixée une molécule de glucose. Il existe un lien proportionnel entre le taux d'HbA1c et le taux de glucose sanguin. L'HbA1c permet, par un dosage sanguin, d'évaluer l'équilibre glycémique sur une plus longue période (environ deux à trois mois) (Greaves et *al.*, 2005).

Le dosage de l'HbA1c est réalisé par une HPLC automatisée en utilisant l'appareil D-10 (Biorad, USA). Le système D-10 est un analyseur HPLC entièrement automatisé utilisant un polymère échangeur d'ions non poreux qui sépare les fractions stables et labiles de l'HbA1c et ne montre aucune interférence avec l'Hb carbamylée. La détection se fait à 415 nm. Les résultats d'HbA1c sont présentés en pourcentage ($100 \times \text{HbA1c}/\text{Hb totale}$).

III.5. Détermination des paramètres biochimiques

A la fin de la période expérimentale (le 29^{ème} jour), tous les groupes des rats sont sacrifiés après une nuit de jeûne, en anesthésiant avec du chloroforme et ensuite le sang est récupéré à partir de l'aorte abdominale. Le sérum est séparé après coagulation à température ambiante pendant 30 min et centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 min, puis stocké à -20°C jusqu'à ce que les paramètres biochimiques aient été déterminés. Le cholestérol total (TC), les triglycérides (TG), le cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL-CHL), l'alanine aminotransférase (ALAT), l'aspartate aminotransférase (ASAT), la phosphatase alcaline (ALP), l'urée et la créatinine sont déterminés avec un analyseur chimique automatisé (Mindray BS200, Chine). Les teneurs des protéines sériques totales sont déterminées avec l'analyseur A 25 BioSystems.

Les lipoprotéines sériques de basse densité (LDL-CHL) et les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) sont estimées à l'aide des équations de Friedewald (Friedewald et *al.*, 1972) :

$$\text{LDL-CHL} = \text{TC} - [\text{HDL-CHL} + (\text{TG}/5)]$$

$$\text{VLDL-CHL} = \text{TG}/5$$

La détermination de l'indice athérogénique (IA), l'indice de risque coronarien (IRC) et l'indice de risque cardiovasculaire (IRCV) sont estimées en utilisant les équations suivantes (Abbott et *al.*, 1988 et Alladi et Shanmugasundaram, 1989) :

$$\text{AI} = \text{LDL-CHL}/\text{HDL-CHL}$$

$$\text{IRC} = \text{TC}/\text{HDL-CHL}$$

$$\text{IRCV} = \text{TG}/\text{HDL-CHL}$$

III.6. Dosage du complément C3

Le système du complément est un ensemble complexe d'au moins 20 protéines participant à la réponse immunitaire. Leur dosage est utile pour rechercher des déficits en certaines fractions du complément, à l'origine d'infections répétées ou d'une défaillance des systèmes immunitaires (ex. maladies auto-immunes). Le dosage du complément C3 se fait par la technique d'immunoturbidimétrie en utilisant l'appareil Architect ci8200SR (Abbott Laboratories, USA), selon les instructions du fabricant.

Le complément C3 réagit avec l'anticorps spécifique produisant des complexes immuns insolubles. La turbidité provoquée par ces complexes immuns est proportionnelle à la concentration du complément C3 dans l'échantillon et peut être mesurée par spectrophotométrie (Denham et *al.*, 2007).

III.7. Dosage du peptide-C

Le dosage de peptide-C est utilisé ici pour nous renseigner sur la synthèse résiduelle de l'insuline par les cellules bêta pancréatiques, car le peptide-C est plus stable dans le plasma que l'insuline, sa demi-vie est entre 15 à 20 min par rapport celle de l'insuline qui plus courte entre 3 à 5 min.

Le dosage du peptide-C se fait par la technique chimioluminescence immunoassay (CLIA), en utilisant l'appareil Maglumi 1000 (Snibe Diagnostic, China). Cette méthode est basée sur une CLIA sandwich en deux étapes entièrement automatisé qui utilise une molécule révélatrice isoluminol ABEI pour marquer un anticorps monoclonal anti-peptide-C, et un autre anticorps antimonoclonal anti-peptide-C couplé à une microbille magnétique. Après une réaction de chimioluminescence, le signal lumineux est mesuré par un photomultiplicateur et cette luminescence est proportionnelle à la concentration du peptide-C présent dans l'échantillon (Anastasi et *al.*, 2016).

III.8. Calcul de l'indice de la sensibilité des cellules à l'insuline

L'indice de la sensibilité des cellules à l'insuline est calculé par le model HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) et l'indice quantitatif de contrôle de la sensibilité à l'insuline (QUICKI) en utilisant les deux formules suivantes (Liu et *al.*, 2016) :

HOMA-IR (HOMA-Insulinresistance) = Insuline à jeun ($\mu\text{U}/\text{mL}$) \times Glycémie (mM)/22.5

QUICKI = Ins/[log (Gly) + log (Ins)], Où :

Ins : est la quantité d'insuline à jeun en ($\mu\text{U}/\text{mL}$) et

Gly : est la glycémie à jeu (mg/dL).

III.9. Evaluation de la fonction des cellules bêta pancréatiques (HOMA-BF)

La fonction des cellules bêta du pancréas est évaluée par le model HOMA en utilisant la formule suivante (Kouidhi et *al.*, 2013 ; Ramachandran et *al.*, 2004).

HOMA-BF= (20 x Insuline à jeun ($\mu\text{U}/\text{ml}$))/(Glycémie à jeun (mM) – 3.5)

Remarque : comme le peptide-C est sécrété en quantité équimolaire avec l'insuline, les valeurs utilisées dans les formules ci-dessus sont des valeurs des concentrations du peptide-C au lieu celles de l'insuline.

III.10. Analyses statistiques

Les données sont rapportées comme étant Moyenne \pm SD. Les différences entre les différents groupes sont analysées par analyse de variance à un facteur (ANOVA). La valeur de $p \geq 0.05$ est considéré comme n'indiquant aucune différence statistiquement significative. Lorsque l'ANOVA a indiqué une différence statistiquement significative ($p < 0.05$), les différences entre les groupes sont analysées par le test de *Tukey* et *Dunnnett*.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 02 : Résultats et Discussion

I. Le bêta-glucane de l'orge

I.1. Extraction de bêta-glucane à partir de l'orge

Le rendement de l'extraction des BBG à partir de l'orge représente le poids de l'extrait obtenu à partir de 100 g de farine d'orge entière. Dans cette expérience, le rendement est de $4.99 \pm 0.21\%$. Cette poudre ne représente pas la quantité totale de BBG isolé (en plus du β -glucanes, cette poudre contenait également des impuretés telles que des lipides, protéine, amidon et minéraux). Pour déterminer l'efficacité de la méthode d'extraction, il faut déterminer la fraction de β -glucanes. Le pourcentage de BBG récupéré est donc $79.29 \pm 2.48\%$.

Parmi les céréales, l'orge et l'avoine sont les plus riches en composants de fibres solubles, en particulier les β -glucanes (37%) (Temelli, 1997). Dans notre étude l'extraction des BBG, à pH 7 et à 55°C , a donné un rendement de 4.99% pour 100 g de farine, alors que le pourcentage de BBG dans l'extrait est de 79.29%. Ce pourcentage est comparable à plusieurs autres études telles que Ahmad *et al.* (2009) qui ont obtenu des rendements entre 3.74 à 5.14% selon la procédure d'extraction. Plusieurs études ont montré que le rendement de l'extraction est fortement lié aux conditions d'extraction (solvant d'extraction, T° et pH). Temelli (1997) a constaté qu'il y avait une augmentation du rendement avec la T° à pH 7.0 et 8.0 et une diminution à pH plus élevé (9-10).

De petites quantités de matières grasses, de protéines, d'amidon, de pentosanes et de minéraux (cendres) sont également extraites avec les β -glucanes sous forme d'impuretés. Plusieurs chercheurs ont également signalé l'extraction de petites quantités de protéines, d'amidon et d'autres constituants chimiques qui ont réduit la récupération des β -glucanes pendant le processus d'extraction. La récupération de β -glucanes varie entre 82.1 et 86.8 %. La récupération la plus élevée est obtenue dans la méthode d'extraction enzymatique (86.8%) et la récupération la plus faible est observée dans la méthode d'extraction alcaline. Une récupération plus élevée des β -glucanes dans le processus d'extraction enzymatique est due à une plus grande élimination de l'amidon et des protéines par leurs enzymes respectives. La récupération plus élevée dans le processus enzymatique dans une étude fait par Ahmad *et al.* (2010) est attribuée à un traitement préalable à l'éthanol et à l'utilisation d'enzymes appropriées qui réduisent l'association intermoléculaire des β -glucanes avec d'autres composants qui entraîne une extractibilité élevée. Des observations similaires sont enregistrées par Xu *et al.* (2007) qui ont isolé un polysaccharide de haute pureté par un traitement préalable avec des solvants organiques pour éliminer les composants de la paroi non cellulaire.

La température d'extraction des β -glucanes est liée à sa solubilité. Lorsque la température augmente, la solubilité augmente également, permettant au β -glucanes de rester soluble dans le surnageant. Cependant, à des températures plus élevées, l'amidon peut également se solubiliser. Selon Lund and Lorenz, (1984), la température de gélatinisation de l'amidon à partir de l'orge varie de 51 à 60 °C. Cependant, sa solubilisation partielle commence sous ces températures. Wood et al. (1978) ont décrit une augmentation de l'extraction de β -glucanes de l'avoine à 45-63 °C, ce qui représente, selon les auteurs, la plage de température optimale pour éviter la contamination par l'amidon.

Burkus et Temelli (2005) ont obtenu 71.1% de β -glucanes en utilisant un pH de 9.4 et une température de 53 à 55 °C à partir d'un mélange de deux cultivars expérimentaux d'orge. Le rendement le plus élevé obtenu pour ces auteurs pourrait être lié à l'utilisation de l'orge et à l'utilisation de vitesse de centrifugation plus élevée.

I.2. Les activités biologiques du BBG

I.2.1. Détermination des teneurs des composés phénoliques et des flavonoïdes

Les composés phénoliques peuvent contribuer directement à l'action antioxydante. Ils sont également des constituants végétaux très importants parce que leurs groupes hydroxyles confèrent une capacité de piégeage des radicaux libres (Hazra et al., 2008). La teneur en composés phénoliques totaux de BBG est déterminée par la technique de Folin-Ciocalteu et exprimée en microgrammes équivalent d'acide gallique GAE/mg d'extrait. En utilisant la courbe standard de l'acide gallique ($R^2 = 0.7152$). La teneur totale en composés phénoliques du BBG est de 76.47 ± 2.12 μg GAE/mg. Thondre et al. (2011), a révélé que l'extraction de composés phénoliques dans le BBG avec 70% de méthanol donnait un meilleur rendement que l'éthanol à 70%. La teneur en flavonoïdes déterminée par la méthode qui utilise le nitrate d'aluminium pour le BBG est rapportée en μg équivalent quercétine/mg d'extrait ($R^2 = 0.9867$). Les résultats montrent que le BBG a une teneur en flavonoïdes (47.06 ± 2.12 μg QE/mg). Sur la base de ces données, on peut déduire que les flavonoïdes représentent 61.54% des phénols totaux dans l'extrait de méthanol. L'étude réalisée par Keddari et al. (2016) ont révélé que les quantités de flavonoïdes dans les fibres alimentaires solubles et les extraits de fibres alimentaires insolubles provenant du son de blé dur sont de 0.52 ± 0.012 et de 0.46 ± 0.119 mg EQ/g, respectivement. La teneur en polyphénol et en flavonoïdes dans les céréales est largement affectée par les espèces, la variété, les facteurs environnementaux et les méthodes d'extraction.

I.2.2. Piégeage du radical libre DPPH^{•+}

L'évaluation du pouvoir antioxydant du BBG est réalisée par le test DPPH, qui est considéré comme un radical libre relativement stable. La décoloration de DPPH est directement proportionnelle à la capacité des molécules bioactives à réduire ce radical. L'activité de piégeage du DPPH^{•+} par le BBG à différentes concentrations et le standard alpha-tocophérols sont représentés dans le tableau IV.1. Ces résultats montrent que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH^{•+} augmente avec la concentration, où à 4000 µg/mL et 125 µg/mL, l'activité de piégeage est respectivement de 50.14±3.67% et de 6.24±2.33%. Le BBG présentait 50% d'inhibition (IC₅₀) à une concentration de 4018.16 ± 656.59 µg/mL. Les niveaux d'inhibition du DPPH enregistrés en présence des différentes concentrations de BBG sont inférieurs à ceux observés avec les standards BHA, BHT et α-tocophérol (6.14±0.41%, 12.99±0.41% et 13.02±5.17% respectivement). Shah et al. (2017) ont rapporté que le β-glucane de l'avoine et de l'orge à une concentration de 20 mg/mL produisait 20.96% et 15.22% d'effet piégeur qui augmentait jusqu'à 52.23 et 47.31% à 100 mg/mL respectivement, mais est inférieur à celui de l'α-tocophérol standard (69.28%), à la même concentration.

Selon Kozarski et al. (2012), les hydrates de carbone ont un faible pouvoir antioxydant, dû en grande partie à la présence d'hydrogène dans leur structure. Dans le cas des polymères glucidiques, où les monosaccharides sont liés entre eux par des liaisons glycosidiques, cette activité augmente (effet multiplicateur), mais elle reste relativement faible. Wang et al. (2014) ont rapporté que l'effet de piégeage est beaucoup plus efficace dans le cas où les groupes hydroxyle dans le polysaccharide sont substitués par des groupes carboxyméthyle ou sulfate. Il illustre que la présence de groupes sulfate et de groupes carboxyméthyle agissant sur le β-glucane peut améliorer la capacité antioxydante par rapport à tout composé ayant un seul groupe sulfate ou carboxyméthyle.

I.2.3. Piégeage du radical libre ABTS^{•+}

Le test ABTS est basé sur la génération d'un ABTS^{•+} bleu/vert qui peut être réduit par des antioxydants (Floegel et al., 2011) et la décoloration reflète la capacité d'un antioxydant à donner des électrons ou des atomes d'hydrogène pour désactiver les espèces radicalaires (Xiao et al., 2016). Les résultats présentés dans le tableau IV.1 indiquent que le BBG présente des effets de piégeage de l'ABTS^{•+} élevés. Parmi sept concentrations différentes de BBG, la concentration maximale (02 mg/mL) a produit le pourcentage le plus élevé d'effet piégeur qui est d'environ 97.43% et 6.28% à 31.25 µg/mL. Khan et al., (2016) ont signalé une augmentation

de l'activité de piégeage de l'ABTS^{•+} avec l'augmentation de la concentration de β -glucane irradié et le degré d'irradiation. La valeur IC₅₀ du BBG est de 529.1±26.37 mg/mL par rapport aux BHA et BHT standard qui ont montré une forte activité (IC₅₀ 1.81±0.10 mg/mL et 1.29±0.30 mg/mL respectivement).

I.2.4. Activité antioxydante avec la méthode de blanchiment du β -carotène

Le potentiel antioxydant d'un extrait peut être évalué en déterminant la capacité à inhiber l'oxydation du β -carotène. Le tableau IV.1 montre l'activité antioxydante totale du BBG par rapport au BHT et au BHA comme standards. L'activité antioxydante totale augmente avec l'augmentation de la quantité de BBG dans la réaction. Toutes les concentrations testées de BBG ont montré une activité antioxydante inférieure à celle du BHT et du BHA. Les concentrations de BBG à 2000 μ g/mL et 32.25 μ g/mL présentaient respectivement 97.41±1.33% et 17.86±3.82% d'inhibition, alors que le BHA et le BHT avec une concentration élevée de 800 présentaient un taux de 95.58±0.19% et 99.66±0.52% de pourcentage d'inhibition. Ce pourcentage diminue légèrement et atteint respectivement 88.29±0.10 et 93.48±0.44% à la faible concentration de 12.5 mg/mL. Le BBG présente une inhibition de 50% à une concentration de 161.01±13,32 μ g/mL, alors que le BHA standard et BHT avec une valeur IC₅₀ de 1.05±0.03 mg/mL et 0.91±0.01 mg/mL respectivement. Ces résultats sont similaires à ceux observés par Nandi *et al.* (2014) avec une inhibition de 68% à 400 μ g/mL et une IC₅₀ égale à 180 μ g/mL. La méthode de l'acide β -carotène-linoléique est importante pour comprendre le type d'antioxydant donneur de proton et le niveau d'inhibition de la peroxydation lipidique (Huang *et al.*, 2005). Cette méthode est également importante pour comprendre les antioxydants responsables du piégeage de l'oxygène singulier causant des radicaux dans les lipides dans l'organisme.

I.2.5. Le Test de Capacité de Réduction du Cuivre (CUPRAC)

Le Test de Capacité de Réduction du Cuivre Antioxydant (CUPRAC) est une méthode de mesure du potentiel antioxydant utilisé pour une grande variété de polyphénols, incluant les acides phénoliques, hydroxyl cinnamiques, flavonoïdes, caroténoïdes, anthocyanes, ainsi que les thiols et antioxydants synthétiques, les vitamines C et E (Özyürek *et al.*, 2011). Le tableau IV.1 montre les résultats de l'activité CUPRAC du BBG. Avec l'augmentation de la concentration, il y a une augmentation de l'absorbance des échantillons et par conséquent une augmentation du pourcentage de réduction. La capacité antioxydante réductrice du BBG à 2000 μ g/mL, 250 μ g/mL et 31.25 μ g/mL est respectivement de 1.124, 0.340 et 0.151, beaucoup plus

faible que celles du BHA et du BHT (3.92 et 3.38 à une concentration de 800 $\mu\text{g/mL}$ et 1.12 et 1.41 à une concentration de 12.5 $\mu\text{g/mL}$) respectivement. La concentration de BBG correspondant à l'absorbance 0.5 est de $529.79 \pm 48.65 \mu\text{g/mL}$, alors que l'absorbance 0.5 de BHA et BHT est de $5.35 \pm 0.71 \text{ mg/mL}$ et $8.97 \pm 3.94 \text{ mg/mL}$ respectivement. Haghshenas et al. (2015) ont rapporté que l'addition de β -glucane dans la formulation de shrimp nuggets augmentait significativement ($p < 0.05$) l'activité antioxydante.

I.2.6. Pouvoir réducteur du BBG

L'activité antioxydante du BBG est évaluée en utilisant la méthode FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power). Les résultats sont présentés dans le tableau IV.1. La capacité de la réduction du Fer augmente avec la quantité de BBG dans le mélange. La plus forte concentration de BBG 500 $\mu\text{g/mL}$ a un pouvoir réducteur correspondant à l'absorbance de 0.583, alors que toutes les autres concentrations montrent des valeurs d'absorbance inférieures à 0.5. La concentration de BBG correspondant à l'absorbance 0.5 est de $359.88 \pm 63.64 \mu\text{g/mL}$. Ces résultats sont faibles comparés aux standards utilisés dans cette étude (acide ascorbique, alpha-tocophérol et acide tannique), qui présentaient des concentrations correspondant à 0.5 d'absorbance égale à 6.77 ± 1.15 , 34.93 et $5.39 \pm 0.91 \mu\text{g/mL}$, respectivement. Plusieurs études antérieures ont prouvé le pouvoir réducteur du β -glucane provenant de différentes sources. Deng et al. (2012), Giese et al. (2015), Maity et al. (2015), Nandi et al. (2014) ont rapporté que les B-glucanes provenant du champignon comestible *Russula albonigra*, à une concentration de 500 $\mu\text{g/mL}$, présentaient une puissance réductrice de 0.5. Ce résultat suggère que le BBG a le pouvoir de fournir des électrons aux radicaux libres réactifs, les convertissant en molécules non réactives plus stables.

I.2.7. Piégeage du radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot -}$) par la méthode DMSO alcalin

L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot -}$) est l'une des six principales espèces réactives de l'oxygène (ROS) causant des dommages oxydatifs aux composants cellulaires car il est le précurseur de plusieurs espèces réactives ((Halliwell, 1989 ; Huang et al., 2005). Par conséquent, la détermination du degré de piégeage de l'anion superoxyde est très important pour révéler les propriétés antioxydantes potentielles des molécules. Dans ce test, la concentration de l'anion superoxyde est proportionnelle à l'intensité de la couleur mesurée à 560 nm. Le tableau IV.1 montre l'activité de piégeage de cette anion à différentes concentrations de BBG. Ce dernier a montré une activité dose-dépendante. La capacité de piégeage la plus forte (87%) correspond à la plus forte concentration de BBG (2000 $\mu\text{g/mL}$) et proportionnellement la plus faible

concentration (31.25 µg/mL) donne la plus faible capacité de piégeage (34.53%). Cette activité est faiblement comparée à celle de l'acide ascorbique qui, à 800 µg/mL et à 12.5 µg/mL, présente un pourcentage d'inhibition de 96.37% et de 78.43%, respectivement. La valeur IC₅₀ de BBG s'est révélée être de 345.26 ± 62.32 µg/mL ; la valeur IC₅₀ du standard (acide ascorbique) est 31.52±2.22 µg/mL. Dans une étude publiée par Wang et al. (2014) sur trois dérivés du β-glucane, les résultats montrent que le piégeage du superoxyde radicalaire augmente avec l'augmentation de la concentration et peut atteindre 69.68% pour le dérivé sulfate de carboxyméthyle (1-3)-β-d-glucane à une concentration de 1600 µg/mL.

I.2.8. Test de piégeage du radical hydroxyle (HO•)

Ce test montre la capacité de BBG à inhiber le radical hydroxyle. Dans notre protocole, les radicaux hydroxyle sont générés par la réaction de Fenton (système Fe²⁺-ascorbate-H₂O₂). Le BBG présentait une activité de piégeage évidente sur le radical hydroxyle d'une manière dépendant de la concentration. A 4000 µg/mL, le BBG a montré une excellente activité de piégeage de ce radical (79.72%), cette activité est diminuée en fonction de la concentration jusqu'à atteindre un pourcentage de 22.36% à une quantité de 125 µg/mL. L'IC₅₀ du BBG est déterminé à 2268.38±101.57 µg/mL. Le β-glucane extrait du champignon comestible *Entoloma lividoalbum* étudié par Maity et al. (2015) ont montré une IC₅₀ pour la capacité de piégeage des radicaux hydroxyle à 400 µg/mL. Kofuji et al. (2012) ont rapporté que la pectine de pomme ou d'agrumes, de chitosane et de xanthangum utilisée comme additif alimentaire présentait une activité d'élimination des radicaux hydroxyles inférieure à celle de β-glucane extrait de l'orge.

Tableau IV.1 : Résultats des différentes activités antioxydantes du BBG

Composé	Activités (µg/mL)						
	DPPH (IC ₅₀)	ABTS (IC ₅₀)	β-carotène (IC ₅₀)	CUPRA C (A _{0.5})	FRAP (A _{0.5})	DMSO Alkalin (IC ₅₀)	Hydroxy Scavenging (IC ₅₀)
BBG	4018.61 ±656.69	529.91 ±26.37	161.013 ±13.322	529.79 ±48.65	359.88 ±63.64	345.26 ±62.32	2268.38±101.57
BHA	6.14±0.41	1.81±0.10	1.05±0.03	5,35±0.71	–	–	–
BHT	12.99±0.41	1.29±0.30	0.91±0.01	8.97±3.94	–	–	–
Vit.E	13.02±5.17	–	–	–	34.93 ±2.38	31.52±2.22	–
Vit.C	–	–	–	–	6.77±1.15	7.59±1.16	–
Ac. Tannique	–	–	–	–	5.39±0.91	–	–

I.2.9. Détermination de l'activité anticholinestérasique

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la démence qui cause des problèmes de mémoire, de pensée et de comportement, en particulier chez les personnes âgées (Ingkaninan et *al.*, 2003). Plusieurs voies pathogènes sont impliquées dans la progression de cette maladie, comme le déficit cholinergique et le stress oxydatif (Christen, 2000 ; Uddin et *al.*, 2016). Le cerveau des patients atteints de MA présente plusieurs signes d'attaques radicalaires telles que la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines, les dommages au niveau de l'ADN mitochondrial et nucléaire (Bekir et *al.*, 2013). Cependant, les antioxydants peuvent réduire la progression de cette maladie et minimiser la dégénérescence neuronale par inhibition des enzymes cholinestérasiques (Hafsa et *al.*, 2017). Le BBG est évalué pour son pouvoir inhibiteurs de deux enzymes clés dans cette pathologie, à savoir la ACHE et BCHE en utilisant la méthode colorimétrique modifiée d'Ellman dans une microplaque à 96 puits. La galantamine est utilisée comme standard. Concernant l'enzyme ACHE, le pourcentage d'inhibition de BBG augmente de manière dose-dépendante. A t=00 min, le BBG montre un pourcentage d'inhibition de $87.82 \pm 3.6\%$ et $22.45 \pm 6.37\%$ pour les concentrations 1000 $\mu\text{g/mL}$ et 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Après 05 min d'incubation, cette inhibition diminue jusqu'à atteindre 55.85% pour la concentration de 1000 $\mu\text{g/mL}$ et 3.90% pour 125 $\mu\text{g/mL}$. Le standard dans les mêmes conditions expérimentales a montré une inhibition très remarquable à toutes les concentrations, son inhibition à 1000 $\mu\text{g/mL}$ est de 95%, et cette valeur ne diminuait que faiblement et atteignait 85% après 15 min. En comparaison avec la norme, BBG a montré une activité faible par rapport à la norme. BBG a montré IC_{50} 859.164 ± 64.46 $\mu\text{g/mL}$ comparé à la galantamine (6.27 ± 1.15 $\mu\text{g/mL}$). Ces résultats sont en accord avec une étude réalisée par Haider et ses collaborateurs en 2016. Dans cette étude, le β -glucane extrait de *Saccharomyces cerevisiae* présentait une inhibition dose-dépendante de l'enzyme ACHE. A une concentration initiale de 20 mg/mL, le β -glucane montrait un pourcentage d'inhibition de 70%. La valeur de l' IC_{50} du β -glucane s'est révélée être de 680 ± 80 $\mu\text{g/mL}$. L'activité inhibitrice de BCHE du BBG est augmentée avec la concentration de manière proportionnelle. Les activités inhibitrices du BBG vis-à-vis du BCHE sont respectivement de 20.30% et de 65.12% à des concentrations de 63 et 1 000 $\mu\text{g/mL}$ à 00 min. Après 15 min, l'activité inhibitrice est diminuée pour atteindre 03.19% et 64.5% aux mêmes concentrations. La galantamine comme témoin positif a montré le meilleur pourcentage d'inhibition à toutes les concentrations et à différents moments. La valeur IC_{50} du BBG est de 725.47 ± 30.95 $\mu\text{g/mL}$, tandis que celle de la galantamine est de 34.75 ± 1.99 $\mu\text{g/mL}$. Ces résultats montrent que le BBG pourrait interagir avec les deux enzymes

avec différents degrés d'inhibition. Ces résultats corroborent ceux de Haider et *al.* (2016) qui ont trouvé une IC_{50} de bêta-glucane du *saccharomyce cerevisiae* égale à 680 $\mu\text{g/mL}$ comparée au Donepezil comme standard qui a donné une inhibition de 70 % à une concentration de 1.9 mg/mL . Il a déjà été trouvé que la BCHE est une enzyme qui peut accepter une large gamme de substrats par rapport à l'ACHE, en raison de sa faible spécificité de substrat (Orhan et *al.*, 2007). Le site actif de l'ACHE est composé de plusieurs résidus de phénylalanine qui rendent la poche catalytique très étroite et n'accepte donc pas de substrats plus grands, et serait préférable pour les petits substrats. En revanche, le BCHE qui possède un site catalytique riche en petits résidus d'acides aminés (valine et leucine), ce qui le rend capable d'hydrolyser des substrats plus grands même en excès (Nantakornsuttanan et *al.*, 2016 ; Tougu, 2001). Cette propriété des deux enzymes donne au BCHE la capacité de cliver différents esters, y compris ceux avec des fragments acyle plus grands, tandis que ACHE est une estérase avec plus de spécificité pour l'acétylcholine en raison de sa structure mais a une faible capacité à éliminer les esters avec des fragments acyles plus grands (Katalinić et *al.*, 2010). Par conséquent, dans cette expérience, la forte inhibition de BCHE par rapport à celle de ACHE par le BBG pourrait s'expliquer par la différence de structure de leurs sites actifs.

Tableau IV.2 : Résultats des activités enzymatiques du BBG

Composé	ACHE (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$)	BCHE (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$)	α -Glucosidase (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$)
BBG	859.164 \pm 64.46	725.470 \pm 30.95	2986.785 \pm 37.046
Galantamine	6.27 \pm 1.15	34.75 \pm 1.99	-
Acarbose	-	-	115.221 \pm 10.911

1.2.10. Essai d'inhibition de l' α -glucosidase de levure *in vitro*

L'alpha-glucosidase est une enzyme clé impliquée dans le métabolisme des glucides dans l'intestin qui représente l'une des approches thérapeutiques pour combattre le diabète de type 2 (Shai et *al.*, 2010). Dans cette étude, nous avons testé la capacité du BBG à inhiber l'activité de l' α -glucosidase *in vitro*, et par conséquent un effet antidiabétique possible. L'effet inhibiteur du BBG contre l' α -glucosidase est indiqué dans le tableau IV.2. Le BBG a montré un effet d'inhibition de l'activité de l' α -glucosidase de manière dose-dépendante. Cependant, l'inhibition la plus élevée de BBG est de 88.47% à la concentration la plus élevée (7 mg/mL) ; tandis qu'à des faibles concentrations, le BBG présentait un faible pourcentage d'inhibition (11.96% à 0.219 mg/mL). Dans les mêmes conditions expérimentales, l'acarbose a révélé une forte

inhibition pour les quatre concentrations élevées (97.27% et 86.15% à 7 mg/mL et 0.875 mg/mL, respectivement), et n'a diminué que légèrement, atteignant un pourcentage de 46.9% à la concentration de 0.109 mg / mL. La valeur IC₅₀ du BBG est de 2986.78±37.05 µg/mL et celle de l'acarbose est de 115.22±10.91 µg/mL. Ces résultats ont montré que le BBG a une faible activité inhibitrice par rapport à l'acarbose. Dong et ses collaborateurs (2011) ont constaté que l'activité de trois disaccharidases intestinales (sucrase, lactase et maltase) est inhibée par le β-glucane de l'avoine d'une manière dose-dépendante *in vitro* et *in vivo*. Le β-glucane brut extrait du champignon argenté de l'oreille a montré une activité inhibitrice de l'α-glucosidase. A 50 µg/mL, le taux d'inhibition est de 41.61±2.25% (kardono *et al.*, 2013). Plusieurs études (Brand-Miller *et al.*, 2003 ; Brockman *et al.*, 2013 ; Choi *et al.*, 2010) ont démontré l'effet du BBG sur la glycémie postprandiale ; cet effet pourrait s'expliquer par son effet possible sur l'activité de l'α-glucosidase intestinale en plus de son effet sur l'absorption du glucose dans l'intestin. Cet effet pourrait être expliqué par la barrière physique faite par les bêta-glucanes qui empêchent l'absorption du glucose.

I.2.11. Potentiel prébiotique *in vitro* du BBG

Les prébiotiques sont pour la plupart des fibres qui sont des ingrédients alimentaires non digestibles et qui affectent de manière bénéfique la santé de l'hôte, en stimulant sélectivement le microbiote bénéfique et en supprimant potentiellement les bactéries nuisibles dominantes (Gibson et Roberfroid, 1995). Il existe plusieurs tests *in vitro* utilisés pour cribler et classer un ingrédient alimentaire en tant que prébiotique, tels que; 1) résistance aux actions des acides dans l'estomac, les sels biliaires et d'autres enzymes hydrolysants dans l'intestin, 2) ne devrait pas être absorbé dans le tractus gastro-intestinal supérieur, 3) être facilement fermentées par la microflore intestinale 4) stimulant la croissance et/ou l'activité de certaines espèces de micro-organismes bénéfiques dans le côlon (De Vrese et Schrezenmeir, 2008 ; Gibson *et al.*, 2004). La fermentation anaérobie *in vitro* du BBG par deux bactéries lactiques, à savoir *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides*, est présentée dans le tableau IV.3. La croissance de ces bactéries lactiques en présence de BBG et de glucose est comparable à 37 ° C après 12 et 24 h d'incubation ($p > 0.05$). Les résultats ont montré que l'extrait de β-glucane de l'orge stimule la croissance de *Lactococcus lactis ssp lactis* et de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides*, en augmentant son nombre de 08.14 ± 0.024 à 10.45 ± 0.009 et de 7.99±0.021 à 10.21±0.021 log₁₀ CFU/mL, respectivement. Il a été rapporté que les produits finaux de la fermentation, les acides gras à courte chaîne (SCFA) ; butyrate, acétate et propionate, sont considérés comme bénéfiques pour l'intestin (Roberfroid *et al.*, 2010). La

production des SCFA dans le tractus intestinal abaissera le pH du côlon, ce qui limite la croissance des pathogènes (Dass et al., 2007). Ces SCFA ont également fourni de l'énergie pour l'épithélium colique et la modulation du métabolisme du cholestérol et des lipides (Hongpattarakere et al., 2012 ; Topping et Clifton, 2001). Les données suggèrent que le BBG ont la capacité d'exercer un effet prébiotique pour ces bactéries lactiques.

Tableau IV.3 : Potentiel prébiotique *in vitro* du BBG

Souches (Log ₁₀ UFC/mL)	Glucose		
	0 h	12 h	24 h
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	08.14±0.024	09.57±0.018	10.51±0.012
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i>	07.99±0.021	09.12±0.032	10.18±0.019
	BBG		
	0 h	12 h	24 h
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	08.14±0.024	09.26 ±0.036	10.45±0.009
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i>	07.99±0.021	09.02±0.021	10.21±0.028

II. Isolement, caractérisation et identification des bactéries lactiques isolées

II.1. Examen macroscopique et microscopique des isolats

Soixante-quatre souches sont isolées des différents laits collectés dans la région de Abadela de la willaya de Bechar. Après purification sur les milieux MRS et M17 à 30°C et 45°C, les isolats sont examinés au microscope puis testés pour leurs activités catalase. Les bactéries lactiques retenues sont Gram+ et catalase-.

Au cours de la purification, seuls les isolats qui abordent les caractéristiques communes propres aux bactéries lactiques sont conservés. Sur un total de 64 isolats, 36 souches montrées positives à la coloration de Gram, de forme bacillaire ou Cocci qui sont retenues (Axelsson, 2004 ; Badis et al., 2004). Les cellules sont souvent disposées en courtes ou longues chainettes, ou tétrades. En outre, l'examen macroscopique des colonies obtenues sur gélose MRS ou M17 a révélé qu'elles sont de petite taille, de forme circulaire ou, à contour régulier et de couleur blanchâtre. Sur bouillon, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques. Elles sont négatives aux réactions de la catalase (Axelsson, 2004).



Figure IV.1 : Observation de la macromorphologie des souches lactiques sur gélose MRS

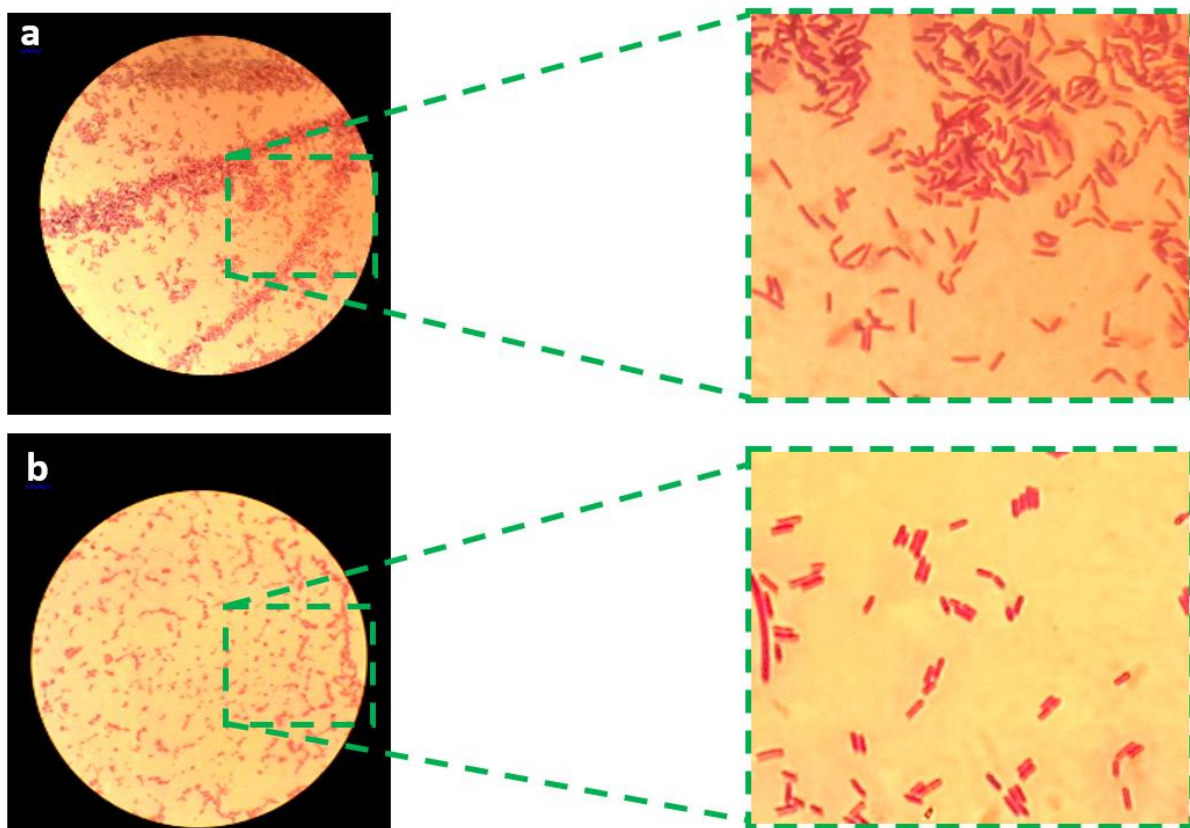


Figure IV.2 : Observation microscopique des isolats après coloration de Gram (x100)

II.2. Caractérisation partielle du potentiel probiotique des LAB isolées

II.2.1. La croissance à différents pH acides

La résistance à un pH bas est l'un des principaux critères de sélection des souches probiotiques (Ouwehand, *et al.*, 1999). Depuis, pour atteindre l'intestin grêle, ils doivent passer à travers les conditions stressantes de l'estomac. Après l'examen de tous les isolats, les isolats qui survivent aux pH acides sont sélectionnés pour les tests suivants. Selon cette expérience, seuls quatre isolats sont résistants au pH acide. L'effet des conditions acides sur la viabilité des isolats est illustré à la figure IV.3. Sur milieu gélosé, il s'est avéré qu'aucune croissance n'ayant

été observée après incubation des quatre souches à différents pH testés. Contrairement au milieu liquide où l'observation à l'œil nu des tubes inoculés par les quatre souches atteste leur développement aux pH 2, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8 et 3 (Fig. IV.3). Cette observation fut confirmée par la lecture de la DO_{600} des bouillons des 4 souches après 24h de culture à différents pH.

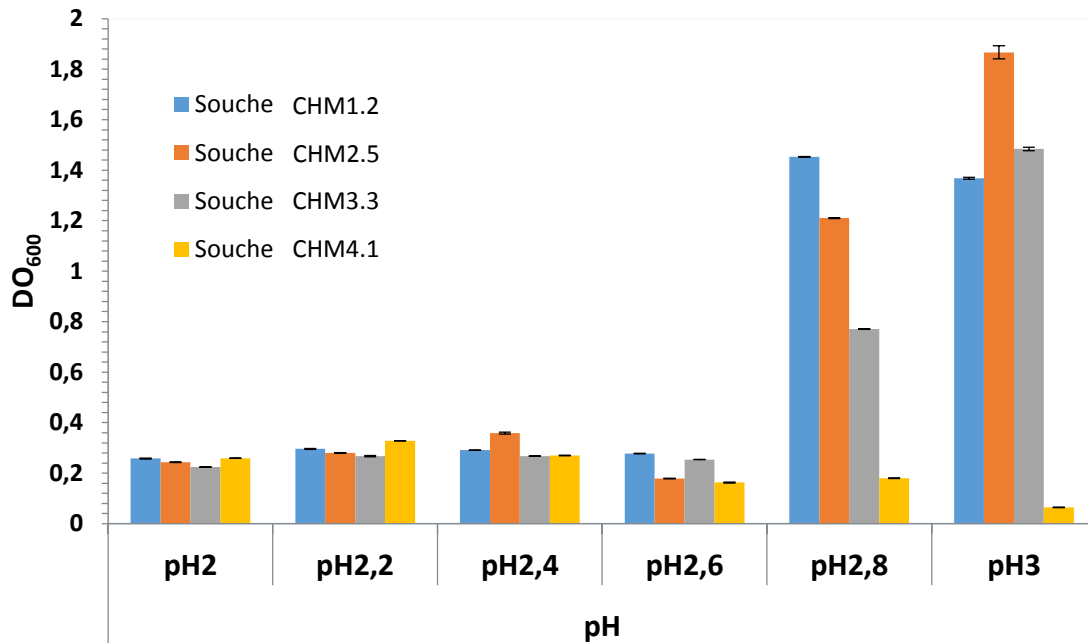


Figure IV.3 : Croissance microbienne après 24 h de culture sur milieu MRS avec différents pH (de 2 à 3). Valeurs exprimées en moyenne de la $DO_{600} \pm SD$

II.2.2. Test de résistance aux sels biliaries

Après incubation des tubes de bouillon MRS additionné en sels biliaries, l'apparition d'un trouble de culture fut observée chez la totalité des 4 souches testées pour les deux concentrations testées (0.15% et 0.30%) confirmant ainsi leur potentielle capacité à tolérer le stress biliaire du tractus digestif.

En scrutant les lectures de la DO_{600} , il en ressort que la concentration à 0.15% en sels biliaries n'a pas été compromettante pour la croissance des 4 souches lactiques, et ce d'une manière équivoque indifféremment de la souche en question (Figure IV.4).

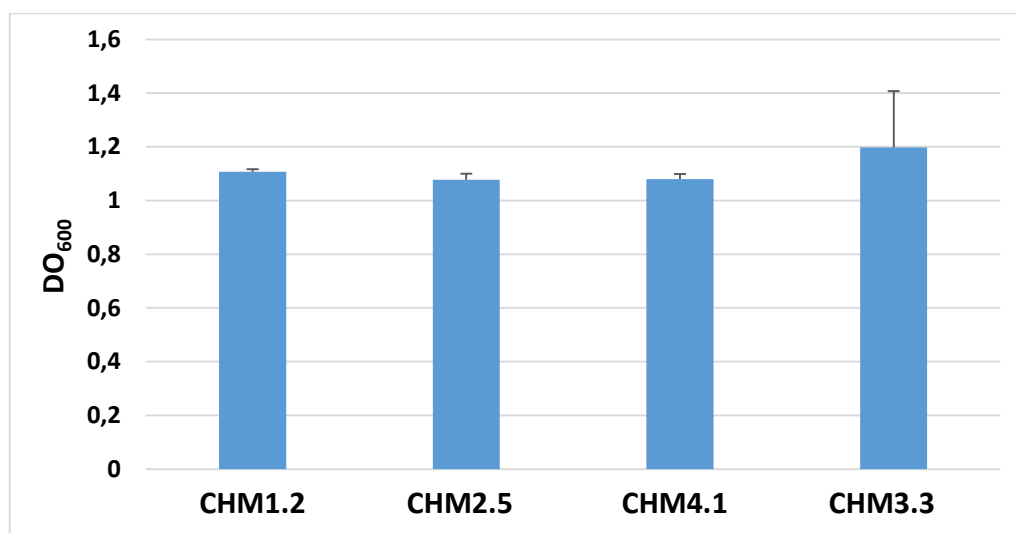


Figure IV.4 : Croissance bactérienne dans un milieu de culture additionné avec 0.15 % de sels biliaires

Par contre, la concentration de 0.3 % en sels biliaires a affecté l'ensemble des souches en terme de développement (avec une réduction de moitié de la DO₆₀₀ pour les trois souches CHM1.2, CHM2.5, CHM3.3), et ce d'une manière assez visible pour la souche CHM4.1 dont la DO₆₀₀ ne dépasse guère la valeur 0.1 (Fig. IV.5).

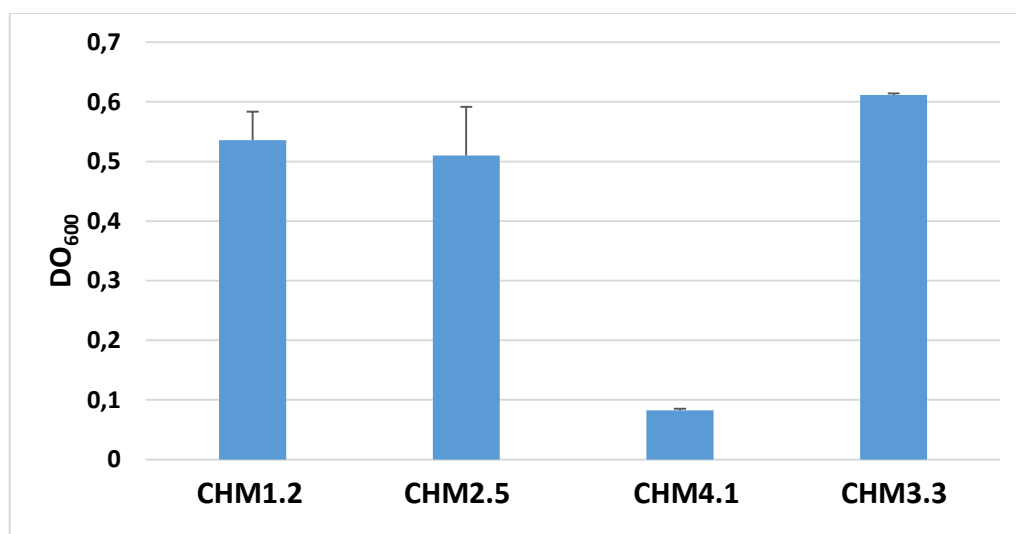


Figure IV.5 : Croissance bactérienne dans un milieu de culture additionné avec 0.3 % de sels biliaires

II.2.3. Test de mobilité (Fig. IV.6)

Ce test a permis de mettre en évidence la mobilité des souches, par le changement de couleur (du rouge à l'orange-jaune) d'une manière diffuse suite à l'acidification du milieu comme résultat d'un développement généralisé. Il en ressort que les 3 souches CHM2.5 ; CHM3.3 et CHM1.2 sont mobiles et que la souche CHM4.1 fut la seule à être immobile (Tab. IV.4).

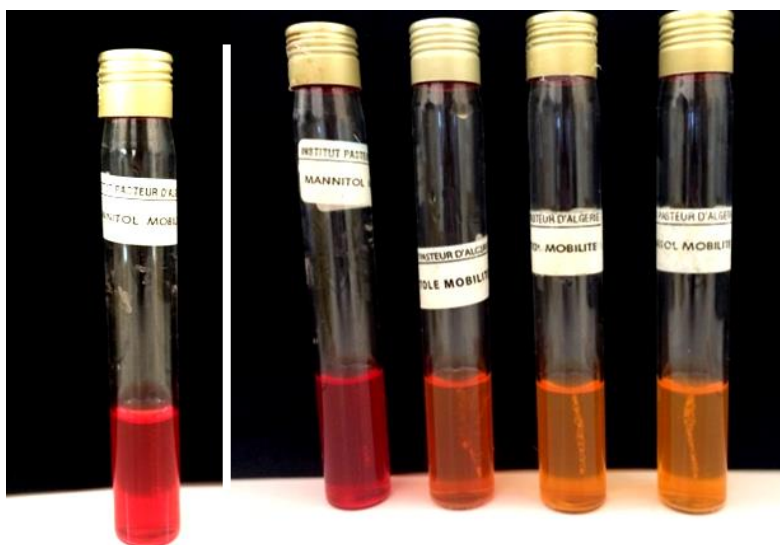


Figure IV.6 : Résultats du test de mobilité sur gélose mannitol mobilité. Premier tube sur la gauche : témoin, tubes restants du gauche vers la droite : souche CHM4.1 ; souche CHM 3.3 ; souche CHM2.5 et souche CHM1.2

Tableau IV.4 : Résultats du test de mobilité des souches lactiques sur gélose "mannitol-mobilité"

Souches	Mobilité
CHM 1.2	+
CHM 2.5	+
CHM 3.3	+
CHM 4.1	-

II.2.4. Suivre de la cinétique de croissance bactérienne et estimation des paramètres de croissance

Le suivi des cinétiques de croissance des 4 souches lactiques a permis d'apprécier les facultés de développement des isolats retenus sur leur milieu de prédilection ; à savoir le MRS. Il en ressort que les trois souches CHM1.2, CHM2.5 et CHM3.3 entament leur phase exponentielle à partir de 330 min de culture avec un rythme assez semblable. Par contre la souche CHM4.1 se détache du groupe avec une phase exponentielle relativement précoce (après environ 200 min de culture) avec, donc, une phase de latence relativement courte et une charge bactérienne plus dense en comparaison avec les autres souches lactiques testées. Toutefois, celle-ci connaît une pente plus douce en phase exponentielle exhibant ainsi un taux de croissance relativement réduit par rapport au reste du groupe testé (Fig. IV.7, Fig. IV.8, Fig. IV.9 et Fig. IV.10).

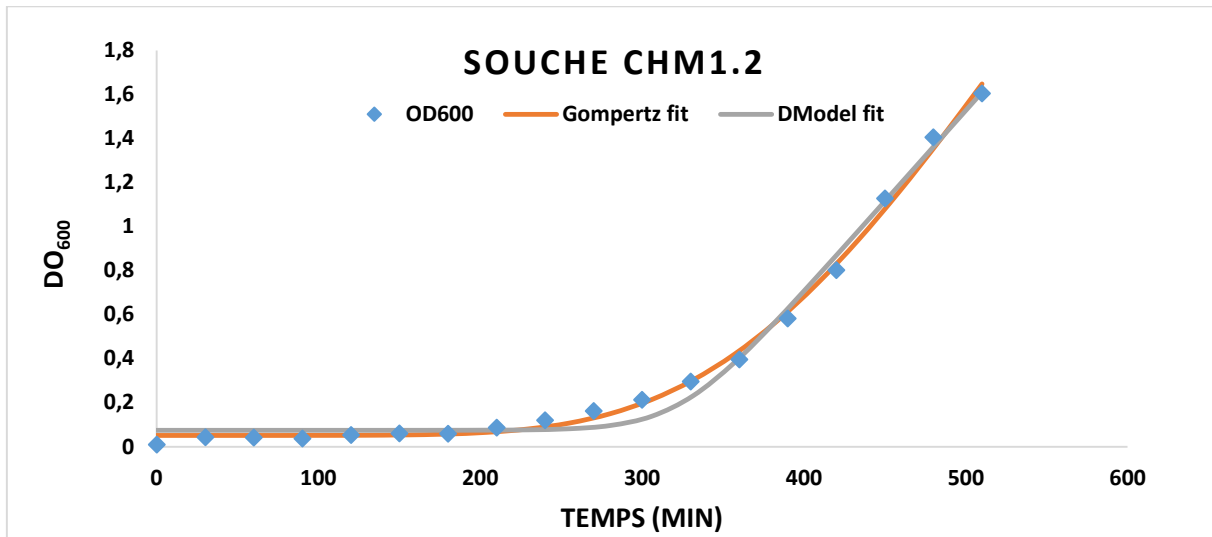


Figure IV.7 : Courbe de croissance bactérienne de la souche CHM1.2 sur bouillon MRS selon les données observées (DO_{600}) ; le fitting des données par le modèle "D-Model" et par modèle "Gompertz"

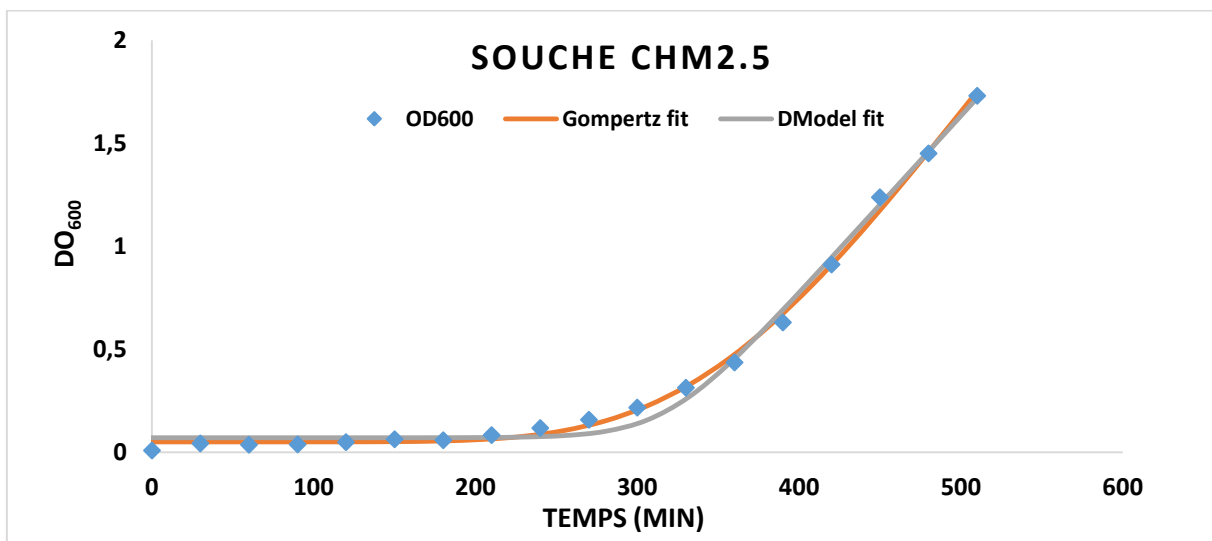


Figure IV.8 : Courbe de croissance bactérienne de la souche CHM2.5 sur bouillon MRS selon les données observées (DO_{600}) ; le fitting des données par le modèle "D-Model" et par modèle "Gompertz"

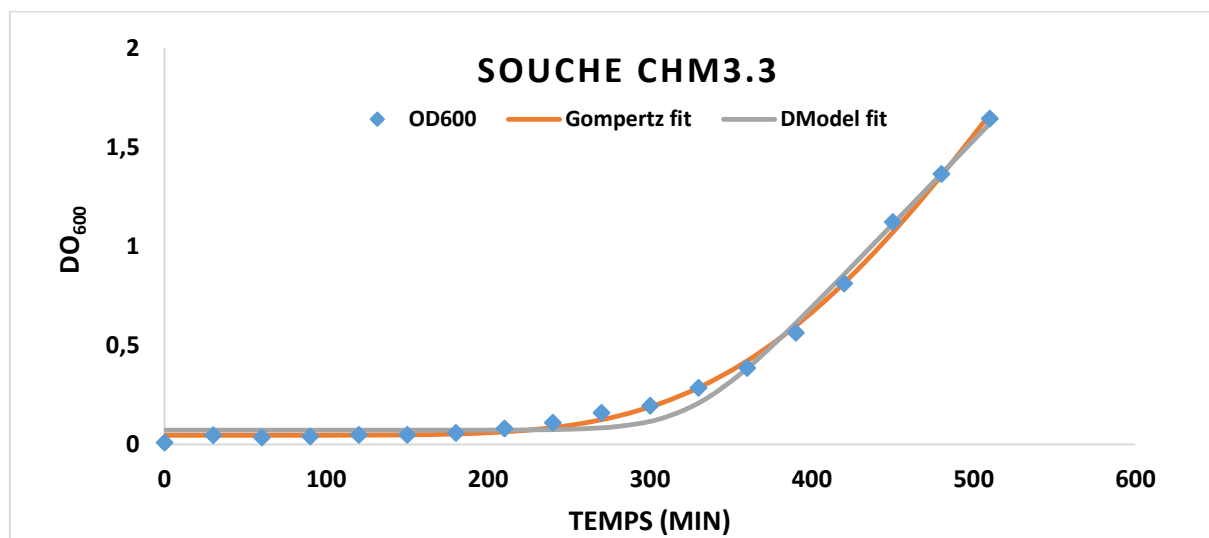


Figure IV.9 : Courbe de croissance bactérienne de la souche CHM3.3 sur bouillon MRS selon les données observées (DO_{600}) ; le fitting des données par le modèle "D-Model" et par modèle "Gompertz"

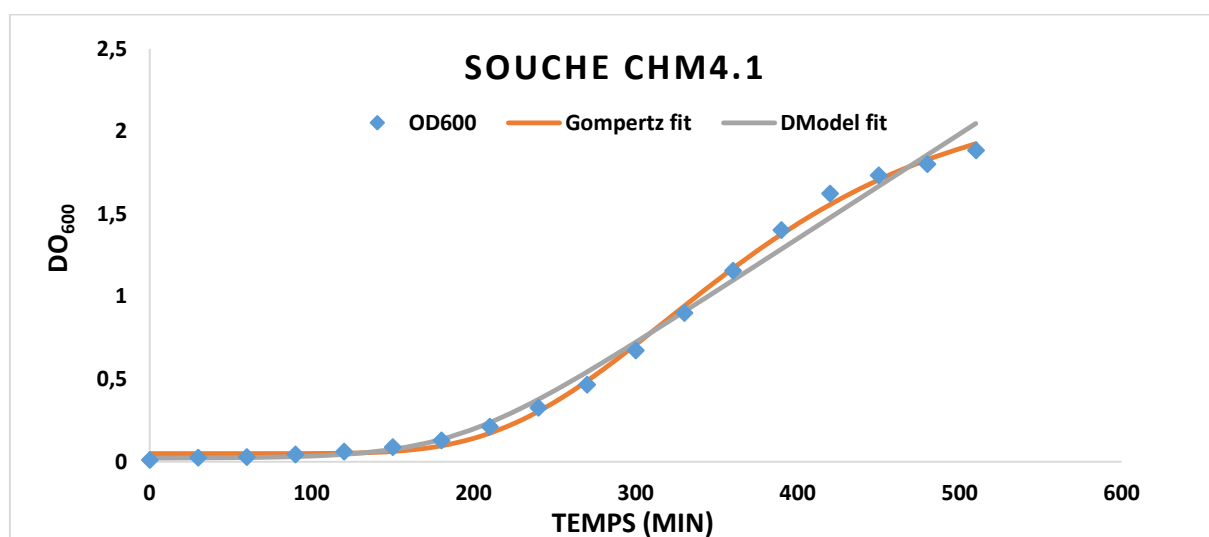


Figure IV.10 : Courbe de croissance bactérienne de la souche CHM4.1 sur bouillon MRS selon les données observées (DO_{600}) ; le fitting des données par le modèle "D-Model" et par modèle "Gompertz"

En outre l'ensemble de ces remarques fut confirmé suite à l'estimation des paramètres de croissance des 4 souches avec les deux modèles utilisés, à savoir le modèle Gompertz et le modèle D-Model. En comparant les erreurs standards des deux modèles appliqués aux données de la DO_{600} observée, il s'avère que le modèle Gompertz affiche de meilleures performances. Ceci est confirmé par les valeurs R^2 (coefficient de détermination) qui se rapproche plus de la valeur 1 avec le modèle Gompertz (de 0.995 à 0.997) par rapport au modèle "D-Model" (allant de 0.988

à 0.993). De ce fait, nous retiendrons le modèle de Gompertz pour le reste des interprétations, et pour ce qui est des différences entre les 4 souches.

Concernant le taux de génération (μ_{Max}), la souche CHM4.1 arbore la plus basse valeur au sein de groupe avec 0.007 DO/min, alors que le reste des souches demeure assez équilibré avec des valeurs de 0.010 DO/min pour CHM1.2, 0.009 DO/min pour CHM2.5 et 0.011 DO/min pour CHM3.3.

Pour ce qui est du temps de génération, la tendance est la même avec des valeurs assez proches pour les trois souche CHM1.2, CHM2.5 et CHM3.3 (68.44 min, 70.91 min et 62.3 min respectivement), et un temps plus long pour la souche CHM4.1 avec une valeur de 88.59 min.

Enfin comme nous l'avons souligné dans la partie précédente, l'estimation de la phase de latence, la souche CHM4.1 affiche la phase de latence la plus courte du groupe avec une valeur de 215 min, par rapport aux valeurs 352.34 min ; 336.17 et 365.17 min pour les souches CHM1.2, CHM2.5 et CHM3.3 respectivement.

Tableau IV.5 : Paramètres de croissance des souches lactiques selon les modèles "D Model" et "Gompertz"

Valeurs de courbe de croissance	Souches							
	CHM1.2		CHM2.5		CHM3.3		CHM4.1	
	D-M F	G-M F	D-M F	G-M F	D-M F	G-M F	D-M F	G-M F
DO de l'inoculum initial	0.010	0.010	0.010	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Taux de croissance μ_{max} (DO/min)	0.008	0.010	0.009	0.01	0.01	0.01	0.07	0.07
Temps de génération (min)	84.024	68.45	80.51	70.91	81.70	62.31	109.27	88.59
Phase de latence (min)	323.95	352.35	318.80	336.17	327.46	365.18	190.58	215.93
Erreur standard	0.05	0.03	0.04	0.03	0.05	0.03	0.08	0.04
R ²	0.99	0.10	0.99	0.10	0.10	0.10	0.99	0.10

D-M F : D-Model Fitting

GM F : Gompertz Model Fitting

II.2.5. Evaluation de l'antibiorésistance

L'antibiorésistance des 4 souches lactiques de cette étude est investiguée en vue d'écarter le risque majeur de transfert horizontal de gènes de résistance à d'autres bactéries pathogènes. Après l'étude des résultats de cette évaluation (Tab. IV.6), il en ressort que :

La souche CHM2.5 affiche une résistance au Tobramycine, Acide Nalidixique, Colistine, Kanamycine, Pefloxacin, Fosfomycine, Teicoplanine, Ciprofloxacine, Colistine sulfate, Acide Fusidique, Netimicine, Levofloxacine. Et une forte sensibilité aux : Piperacilline, Cefotaxime, Pristinamycine, Nitrofurantoine, Triméthoprim, Doxycycline, Ampicilline, Ticarcilline / Acide

clavulanique, Penicilline, Spiramycine, et surtout à l'Imipenene. En plus d'une certaine sensibilité (entre 18 et 20 mm) à l'Amikacine et à la Cefixime. Par ailleurs, la souche CHM3.3 serait résistante à l'Acide Nalidixique, Colistine sulfate, Kanamycine, Fosfomycine, Colistine, Oxacilline, Ofloxacin ; et très sensible à une large gamme d'antibiotique, tel que : Piperacilline, Cefixime, Cefotaxime, Pristinamycine, Nitrofurantoine, Triméthoprim, Imipenene, Doxycycline, Azithromycine, Ampicilline, Ticarcilline / Acide clavulanique, Ceftazidine, Penicilline, Spiramycine.

Concernant la souche CHM1.2 : cette souche arbore une résistance face à la Colistine sulfate, Colistine, Kanamycine, Ofloxacin, Teicoplanine, Tobramycine, Cefixime, Lincomycine, Acide Fusidique, Fosfomycine, et une forte sensibilité aux antibiotiques (Cefotaxime, Pristinamycine, Nitrofurantoine, Imipenene, Piperacilline, Penicilline, Triméthoprim, Ticarcilline / Acide clavulanique), et une certaine sensibilité (entre 18 et 20 mm de diamètre) aux : Acide Nalidixique, Oxacilline, Ampicilline, Spiramycine.

Enfin la souche CHM4.1 : celle-ci est résistante aux antibiotique suivants : Tobramycine, Aztreoname, Acide Nalidixique, Cefixime, Colistine sulfate, Colistine, Oxacilline, Triméthoprim, Ceftazidine, Netimicine, Kanamycine, avec une forte sensibilité aux antibiotique suivant (plus de 20 mm de diamètre) : Rifampicine, Lincomycine, Cefotaxime, Pristinamycine, Nitrofurantoine, Levofloxacin, Clindamycine, Imipenene, Ticarcilline / Acide clavulanique, Penicilline, Spiramycine, et une certaine sensibilité pour les antibiotique suivants (entre 18 et 20 mm de diamètre): Piperacilline, Ciprofloxacine, Pefloxacine, Ofloxacin, Teicoplanine.

A la lumière de ces résultats, la souche ayant démontré un bon profil de sensibilité aux antibiotique serait la souche CHM3.3 (sur les 33 antibiotiques testés : très sensible à 14 antibiotiques, sensible de manière intermédiaire à 12 antibiotiques et résistante à seulement 7 antibiotiques).

Tableau IV.6 : Résultats de l'évaluation de l'antibiorésistance des souches lactiques testées. Valeurs exprimées sous forme diamètre des halos d'inhibition (mm), résistant : Ø < 10 mm, sensible Ø > 18 mm

Antibiotiques	Abréviations	Classe	Souches lactiques			
			CHM3.3	CHM2.5	CHM1.2	CHM4.1
Tobramycine	TOB	Aminoside	13.98	0	8.13	0
Amikacine	AK	Aminoside	10.44	18.80	16.58	08.29
Piperacilline	PRL	Bêta-lactamine	31.99	32.28	24.68	18.77
Ciprofloxacine	CIP	Fuoroquinolone	11.53	9.46	14.85	19.14
Aztreoname	ATM	Monobactame	14.52	12.24	17.16	0
Acide Nalidixique	NA	Quinolone	0	0	19.26	0
Cefixime	CFM	Céphalosporine	23.39	19.11	9.27	0
Rifampicine	RA	Rifamycine	18.86	15.56	14.86	24.13
Colistine sulfate	CS	Polymyxine	0	8.78	0	0
Lincomycine	L	Lincosamide	13.53	11.48	07.28	27.09
Acide Fusidique	FA	Autre	10.35	8.80	9.86	16.16
Netimicine	NET	Aminoside	13.88	09.08	14.93	9.26
Cefotaxime	CTX	Céphalosporine	31.48	20.39	26.05	21.33
Pristinamycine	PT	Synergistine	32.84	23.24	23.01	30.45
Colistine	CT	Polymyxine	08	0	0	0
Nitrofurantoïne	F	Nitrofurane	33.31	23.94	23.44	21.09
Levofloxacine	LEN	Fluoroquinolone	12.83	09.43	10.54	20.81
Clindamycine	DA	Lincosamide	10.50	11.94	15.79	32.92
Kanamycine	K	Aminoside	0	0	0	7.96
Oxacilline	OX	Bêta-lactamine	07.05	10.86	19.95	0
Trimethoprim	TMP	Autre	33.87	24.87	24.94	0
Imipenene	IPM	Carbapénème	48.26	40.27	40.98	24.62
Pefloxacine	PF	Quinolone	12.57	0	15.24	18.46
Doxycycline	Do	Tétracycline	27.34	21.45	17.56	14.52
Azithromycin	AZM	Macrolide	20.16	16.75	15.43	17.26
Ampicilline	AM	Bêta-lactamine	23.30	24.33	18.25	14.11
Ticarcilline/Acide clavulanique	TIM	Pénicillin+inhibiteur de bêta-Lactamase	31.07	31.79	23.75	22.97
Ceftazidine	CAZ	Céphalosporine	23.38	17.31	17.44	0
Fosfomycine	FF	Autre	0	0	07.40	10.09
Ofloxacine	OFX	Fluoroquinolone	9.73	14.51	0	18.18
Penicilline	P	Bêta-lactamine	31.37	22.32	26.68	25.01
Teicoplanine	TEC	Glycopeptide	16.87	0	0	18.40
Spiramycine	SP	Macrolide	27.74	20.23	19.85	22.12

II.2.6. Test de l'antagonisme

Concernant le pouvoir antagoniste des souches, il en ressort que nos souches affichent un faible potentiel antagoniste (Tab. IV.7). En effet, sur les 8 souches cibles, seules trois souches ont vu leur développement affecté par la présence de souches lactiques, à savoir la souche *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2785) (affecté par la présence de la souche lactique CHM4.1), *E. coli* (affectée par les souches CHM4.1 et CHM3.3) et la souche levurienne *Saccharomyces cerevisiae* (sensible à la présence de la souche CHM3.3).

Tableau IV.7 : Résultats du test d'antagonisme. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes des zones d'inhibition de trois répétitions, mesurées en millimètre (mm)

Souches lactiques	Pathogènes et autres souches cibles*							
	Ps27853	E52	ML	M3	SC	25923	25922	L275
CHM4.1	8.88	8.99	0	0	0	0	0	0
CHM25	0	0	0	0	0	0	0	0
CHM3.3	0	2.24	0	0	2.53	0	0	0
CHM1.2	0	0	0	0	0	0	0	0

* Liste des souches pathogènes et autres souches cibles :

- Ps27853 : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
- E52 : *E. coli*
- ML : *Micrococcus luteus*
- M3 : *Candida albicans*
- SC : *Saccharomyces cerevisiae*
- 25923 : *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* Rosenbach (ATCC 25923) MRSA (méticilline résistant *Staphylococcus aureus*)
- 25922 : *E. coli* (ATCC 25922)
- L275 : *Clavibacter michiganensis sepedonicus*

II.4.7. Identification par galerie API 50 CH (Tab. IV.8)

Les résultats de la fermentation des hydrates de carbone sur la galerie API 50 CH, ont permis l'identification des espèces des souches. Le tableau IV.8 indique les résultats du profil fermentaire. Après la comparaison des résultats, avec les données de (Axelsson, 2004 ; Carr et al., 2002 ; Hammes et Hertel, 2006). Les souches sont classées dans les espèces suivantes :

- **La souche CHM3.3** : *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides*
- **La souche CHM2.5** : *Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii*
- **La souche CHM1.2** : *Lactococcus lactis ssp lactis 1*
- **La souche CHM4.1** : *Lactococcus Lactis ssp Lactis 1*

Les souches retenues pour l'étude *in vivo* selon les résultats des propriétés probiotiques sont la CHM3.3 (*Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides*), CHM2.5 (*Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii*) et la souche CHM1.2 (*Lactococcus lactis ssp lactis 1*).

Tableau IV.8 : profil de fermentation des hydrates de carbone des 04 souches après 48 heures

Code	Sucre	CHM4.1	CHM2.5	CHM3.3	CHM1.2
		Après 48h	Après 48h	Après 48h	Après 48h
GLY	Glycérol	+	-	-	+
ERY	Erytritol	-	-	-	-
DARA	D-Arabinose	-	-	-	-
LARA	L-Arabinose	-	-	-	-
RIB	D-Ribose	+	-	-	+
DXYL	D-Xylose	-	-	-	+
LXYL	L-Xylose	-	-	-	-
ADO	D-Adonitol	-	-	-	-
MDX	Méthyl-βD-xylopyranoside	-	-	-	-
GAL	D-Galactose	+	-	-	+
GLU	D-Glucose	+	+	+	+
FRU	D-Fructose	+	-	+	+
MNE	D-Manose	+	-	+	+
SBE	L-Sorbose	-	-	-	-
RHA	L-Rhamnose	-	-	-	-
DUL	Dulcitol	-	-	-	-
INO	Inositol	-	-	-	-
MAN	D-Mannitol	-	-	-	-
SOR	D-Sorbitol	-	-	-	-
MDM	Méthyl-αD mannopyranoside	-	-	-	-
MDG	Méthyl-αD glucopyranoside	-	-	+	-
NAG	N-Acétyleglucosamine	+	-	+	+
AMY	Amygdaline	+	-	-	+
ARB	Arbutine	+	-	-	+
ESC	Esculine Citrate de fer	+	+	+	+
SAL	Salicine	+	-	-	+
CEL	D-Cellobiose	+	-	-	+
MAL	d-Maltose	+	+	+	+
LAC	D-Lactose (origine bovine)	+	-	+	+
MEL	D-Melibiose	+	-	+	+
SAC	D-Saccharose	-	+	+	+
TRE	D-Trehalose	+	-	+	+
INU	Inuline	-	-	-	-
MLZ	D-Mélézitose	-	-	-	-
RAF	D- Raffinose	-	-	+	-
AMD	Amidon	+	-	-	+
GLYG	Glycogène	-	-	-	-
XLT	Xylitol	-	-	-	-
GEN	Gentiobiose	+	-	-	+
TUR	D-Turanose	-	-	+	-
LYX	D-Lyxose	-	-	-	-
TAG	D-Tagatose	+	-	-	+
DFUC	D-Fucose	-	-	-	-
LFUC	L-Fucose	-	-	-	-
DARL	D-Arabitol	-	-	-	-
LARL	L-Arabitol	-	-	-	-
GNT	Potassium Gluconate	-	-	-	-
2KG	Potassium 2-cétogluconate	-	-	-	-
5KG	Potassium 5-cétogluconate	-	-	-	-

II.3. Discussion

II.3.1. Isolement, caractérisation et identification des LAB

L'isolement et l'identification préliminaires sont basés sur l'apparence morphologique et le test de catalase. Après avoir effectué des tests préliminaires (coloration de Gram et catalase), un total de 64 isolats est sélectionné pour une identification plus poussée. Les 64 isolats se sont avérés être des Cocci et des bâtonnets Gram positif, catalase négatifs. Le test de la catalase est l'un des tests de diagnostic les plus utiles pour la reconnaissance des bactéries en raison de sa simplicité. Lors de l'exécution du test de catalase, aucune bulle n'est observée, ce qui indique que les bactéries isolées sont négatives pour la catalase et ne pourraient pas contribuer à la décomposition de l' H_2O_2 pour produire du CO_2 .

La capacité des isolats à fermenter des oligosaccharides représente l'une des caractéristiques probiotiques souhaitables, car la monosaccharine présente dans le tractus gastro-intestinal affectera la vie des micro-organismes de l'intestin (Kaplan et Hutkins, 2000). Il a été constaté que tous les glucides ne pouvaient pas être fermentés par des isolats sélectionnés. Le tableau IV.6 montre que les 04 souches retenues ne pouvaient pas fermenter les glucides suivants : Xylose, D-adonitol, dulcitol, inositol, L-sorbose, D-arabinose, rhamnose et fucose, Cette condition pourrait être due au manque de capacité de l'enzyme produite par les isolats à décomposer le sucre dans le milieu de base. Comme indiqué dans le tableau IV.6, les 04 souches ont toutes été capables de fermenter le D-glucose et le D-maltose. Après des tests préliminaires de caractérisation phénotypique et une interprétation de la base de données API, les isolats sont identifiés comme étant *Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* et *Lactococcus lactis ssp lactis 1*. Bill et al. (1992) et Klinger et al. (1992) ont indiqué que certains systèmes d'identification commerciaux donnent souvent de bons résultats en ce qui concerne l'identification des genres, mais qu'ils ne sont pas tout à fait suffisants au niveau des espèces.

III.3.2. Croissance à pH acide

Afin d'exercer leurs effets bénéfiques sur l'hôte, les probiotiques doivent rester en vie aussi bien pendant l'ingestion que pendant leur transit avant d'atteindre le gros intestin. Les probiotiques doivent traverser les conditions stressantes de l'estomac avec un pH compris entre 1.5 et 3 et dans la partie supérieure de l'intestin contenant de la bile (Corzo et Gilliland, 1999). Bien que le pH de l'estomac puisse être aussi bas que 1.0, dans la plupart des analyses *in vitro*, le pH 3 est préféré (Suskovic et al., 2001). Le temps de séjour moyen des aliments dans l'estomac est de 3 h, et les tests sont donc généralement exécutés aussi longtemps. Pour les

souches CHM1.2 et CHM 4.1 dont la forme est assimilable à celle des lactocoques, il y a eu peu d'études sur l'activité probiotiques des lactocoques, puisqu'on l'a généralement supposé que les lactocoques ne survivent pas lors du passage à travers l'appareil digestif, cela est dû au pH faible de l'estomac et à la présence de sels biliaires dans l'intestin. Cependant, plusieurs travaux récents ont suggéré que les lactocoques puissent survivre pour atteindre l'appareil gastro-intestinal humain ou animal (Kimoto-nira et *al.*, 2009). Les résultats obtenus avec les souches CHM3.3 et CHM2.5 de formes bacillaires sont en corrélation avec ceux obtenus par Charteris et *al.* (1997). Selon Charteris et ses collaborateurs, les lactobacilles entériques sont capables de tolérer un pH de 3 pendant quelques heures et un pH de 2 pendant plusieurs mins, tandis qu'à un pH 1, toutes les Lactobacilles testés sont détruits. D'autre part, les travaux de Mathara et *al.* (2004) ont montré une tolérance élevée des souches de *Lactobacillus sp.* vis-à-vis aux pH 2.5 et pH 2 après 2 h d'incubation. Les résultats d'une étude menée par McDonald et *al.* (1990) révèlent un arrêt de la croissance des souches de *Ln. mesenteroides* et *Lb. plantarum* à pH voisin de 3.

III.3.3. Résistance aux sels biliaires

Les bactéries candidates d'être des probiotiques doivent pouvoir résister aux facteurs inhibiteurs du tractus gastro-intestinal tels que les sels biliaires. Les sels biliaires sont des produits chimiques tensioactifs produits dans le foie à partir du catabolisme du cholestérol (Soomro et Masud, 2012). Outre la tolérance au pH, la tolérance à la bile est un facteur important pour la survie et la croissance des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal. Bien que la concentration en bile du tractus gastro-intestinal humain varie, la concentration moyenne en bile intestinale serait de 0.3% et le temps de séjour serait de 4 h (Prasad et *al.*, 1998 ; Dunne et *al.*, 2001). Plusieurs travaux rapportent des résultats similaires avec des souches lactiques ayant fait la preuve de la résistance au stress gastrique due aux sels biliaires. Kimoto-nira et *al.* (2009) ont rapporté la résistance de souches lactiques aux sels biliaires, en précisant que les facteurs influençant la résistance des lactocoques à la bile sont associés à la composition du milieu de croissance. Ils ont prouvé que la résistance à la bile de quelques souches de *Lactococcus* est changée quand le sucre dans le milieu est changé du glucose en lactose. En d'autres termes, l'exclusion de la bile par les bactéries exige de l'énergie. Les hydrates de carbone qui sont facilement ou rapidement métabolisés pour apporter cette énergie, augmentent la résistance aux sels biliaires. D'autre part, et comme la bile est un détergent, la résistance aux sels biliaires semble être associée à la stabilité de la membrane cellulaire. Des résultats trouvés par Burns et *al.* (2008) ont montré que la plus part des souches de *Lb.delbrueckii*sp. *bulgaricus* et *Lb.delbrueckii*sp. *lactis* sont sensibles aux sels biliaires. De même Zago et *al.* (2011) ont

révélé une moyenne de survie de 40% chez des lactobacilles isolés à partir de lait et du fromage. La résistance des isolats à des concentrations élevées en sels biliaries est probablement due à l'expression de protéines liées à la résistance à la bile dans les cellules bactériennes (Hamon et *al.*, 2011). En raison de la haute tolérance au sel biliaire de tous les isolats, nous nous attendons à ce que les souches soient efficaces pour la déconjugaison des sels biliaries et, partant, pour réduire le cholestérol sérique. La tolérance aux sels biliaries est une condition préalable à la colonisation de bactéries dans l'intestin grêle de l'hôte (Havenaar et *al.*, 1992). L'activité hydrolytique des sels biliaries peut contribuer à la résistance des isolats à la toxicité des sels biliaries conjugués dans le duodénum et constitue donc un facteur de colonisation important. Par conséquent, la tolérance des isolats aux sels biliaries peut jouer un rôle dans le maintien de l'équilibre de la microflore intestinale. Des études antérieures ont indiqué que la capacité de résistance est due à la présence d'hydrolases contre les sels biliaries, une enzyme qui réduit les effets toxiques en conjuguant la bile (Rani et Pradeep, 2014).

III.3.3. Sensibilité aux antibiotiques

L'utilisation massive d'antibiotiques au cours des dernières années chez les animaux et chez l'homme a joué un rôle important dans l'émergence généralisée des bactéries résistantes aux antibiotiques (Ashraf et Shah, 2011). Par la suite, avec la propagation de la résistance aux antibiotiques dans les communautés microbiennes, des préoccupations ont été exprimées quant à l'existence d'une résistance aux antibiotiques chez des espèces bactériennes utiles, y compris des souches probiotiques (Sharma et *al.*, 2014). Les probiotiques sont couramment utilisés comme additifs alimentaires pour favoriser la croissance du bétail. Une exigence clé pour les souches probiotiques est qu'elles ne contiennent pas de gènes transférables de résistance aux antibiotiques (Aymerich et *al.*, 2006). L'importance de l'évaluation du profil de résistance aux antibiotiques des isolats est de limiter l'utilisation de cultures probiotiques contenant des gènes transférables de résistance aux antibiotiques. Dans cette étude, tous les 4 isolats provenant de lait de chamelle sont analysés pour déterminer leur sensibilité aux antibiotiques, en utilisant la méthode de diffusion sur disque. D'après les résultats, tous les isolats ont montré une résistance à la colistine, au kanamycine, fosfomycine et l'acide nalidixique, alors qu'ils sont sensibles aux antibiotiques restants de degrés différents d'une souche à l'autre. Les différences de degré d'inhibition avec différents antibiotiques sont attribuées à divers modes d'action sur les composants cellulaires tels que la paroi cellulaire, la synthèse des protéines et de l'ADN et l'ARN polymérase (Neu, 1992). Les lactobacilles présentent naturellement un large éventail de résistances aux antibiotiques, mais dans la plupart des cas, la résistance aux antibiotiques n'est pas du type transmissible et ne pose donc généralement pas de problème de sécurité (Saarela et

al., 2002). Les résultats concordent avec l'étude de D'Aimmo *et al.* (2007), où toutes les souches de *L. acidophilus* et *L. casei* ont présenté une résistance élevée à l'acide nalidixique. Dans l'étude de Liu *et al.* (2009), 30% des isolats de *Lactobacillus* étaient résistants à la gentamycine. Plusieurs études ont mis en évidence la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (Botes *et al.*, 2008). La résistance de souches de *Leuconostoc sp.* à la Vanomycine, Gentamicine et la Chloramphénicol est ainsi l'un des cas de figure les mieux démontrés (Ogier *et al.*, 2008). De même que d'autres références rapportent pour des espèces de *Lactococcus lactis* une résistance à l'Ampicilline et la Vanomycine (Salminen et Von Wright, 2004).

III.3.4. Test de l'antagonisme

Les préoccupations récentes concernant l'utilisation généralisée et aveugle d'antibiotiques pour le traitement des maladies et la promotion de la croissance du bétail ainsi que le développement d'agents pathogènes résistants aux antibiotiques ont suscité un intérêt accru pour l'application des probiotiques et de leurs métabolites antimicrobiens comme stratégies antimicrobiennes alternatives pour le traitement et la prévention des infections (Hemant et Harshada, 2015). L'activité antibactérienne est essentielle au succès de la colonisation des lactobacilles dans la muqueuse intestinale car ils fournissent un effet de barrière et une défense contre les agents pathogènes (Vaughan *et al.*, 1999). Les lactobacilles peuvent avoir un effet antimicrobien en produisant certaines substances telles que des acides organiques (lactique, propionique acétique), du dioxyde de carbone, du peroxyde d'hydrogène, du diacétyle, des substances antimicrobiennes de faible poids moléculaire telles que des bactériocines, qui peuvent être continuellement excrétés par la bactérie (Santos *et al.*, 2003). Les diamètres des zones d'inhibition ont montré que tous les isolats ont des effets antibactériens faible contre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2785) *E.coli* et *Saccharomyces cerevisiae*. Les activités inhibitrices de tous les isolats de cette étude pourraient être dues à la production d'acides organiques. Schilliager *et al.* (1997), ont signalé l'inhibition d'agents pathogènes Gram- attribués à la production d'acides organiques par des souches de *Lactobacillus* isolées à partir de produits laitiers.

III. Etude *in vivo*

III.1 Induction du Diabète

Après 48 h de l'injection de 60 mg/kg P.C. de la STZ aux rats, les signes cliniques suivantes sont remarqué : polyurie, polydipsie et polyphagie avec une asthénie. L'analyse des urines par des bandelettes réactives a révélé une glycosurie importante, des traces de sang dans les urines, un pH urinaire acide compris entre 5.5 et 6 avec une faible protéinurie.

Le dosage de la glycémie chez tous les rats recevant la STZ est supérieur à la valeur de 05 g/L.

III.2 Evolution du poids corporel des rats (Fig. IV.11)

Les résultats de l'évolution pondérale des différents groupes sont représentés dans la figure IV.11. Chez le groupe témoin non diabétique (TND), un gain de poids est observé au cours des 04 semaines de l'expérimentation où il atteint 56 g au 28^{ème} jour et une perte de poids continue pendant les 28 jours est observée chez le groupe témoin diabétique. Durant la première semaine, les groupes traités ont subi une chute de poids de l'ordre de 14 g, suivi par un gain de poids continu le reste de la période de traitement. L'étude statistique montre qu'aucune différence statistiquement significative entre les groupes traités et le groupe témoin diabétique (TD) avec un $p < 0.05$ qu'après la troisième semaine de traitement.

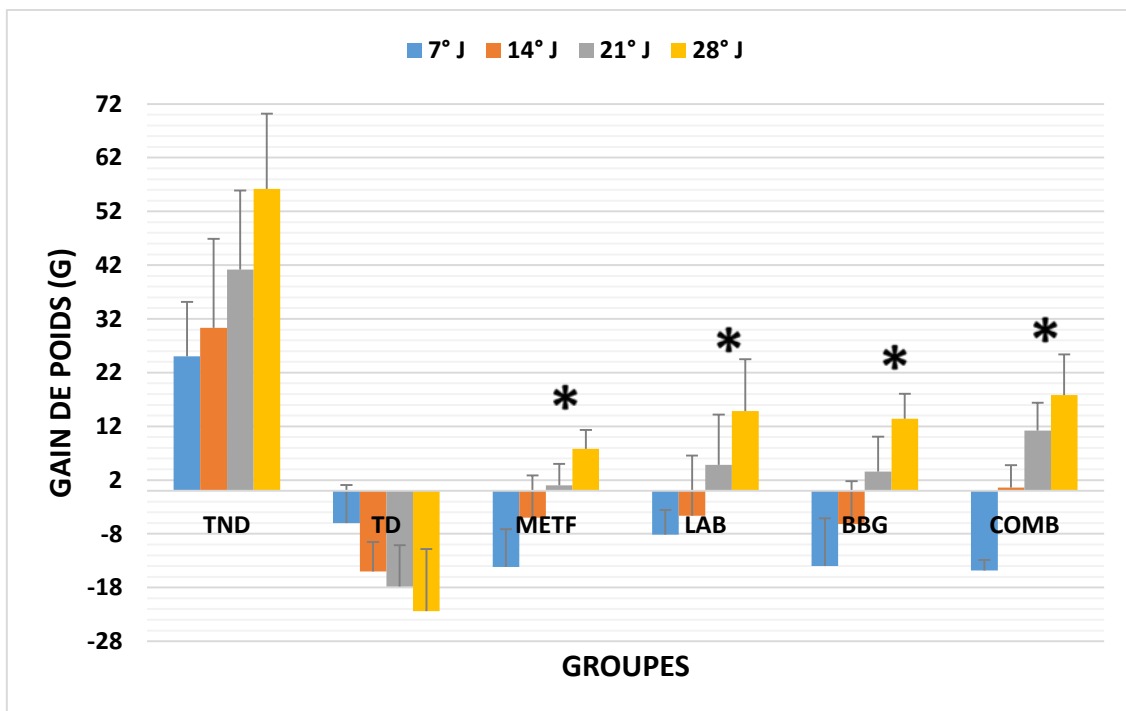


Figure IV.11 : Evolution du gain de poids des différents groupes expérimentaux

III.3. Poids relatif du foie (Fig. IV.12)

Les résultats des poids relatifs du foie sont représentés dans la figure IV.12. Le groupe TD présente un poids relatif du foie supérieur (4.27 ± 0.35 %) comparé à celui de tous les autres groupes. Les différents groupes traités (METF, LAB, BBG et COMB) affichent des moyennes de poids relatifs du foie proches (3.71 ± 0.19 %, 3.74 ± 0.42 %, 3.75 ± 0.29 %, 3.77 ± 0.12 % respectivement) et nettement inférieures à celle du groupe TD et supérieures à celle du groupe non diabétique qui affiche la moyenne la plus faible 3.37 ± 0.44 %. L'analyse statistique montre une différence significative entre les groupes traités et le groupe témoin diabétique $p < 0.05$.

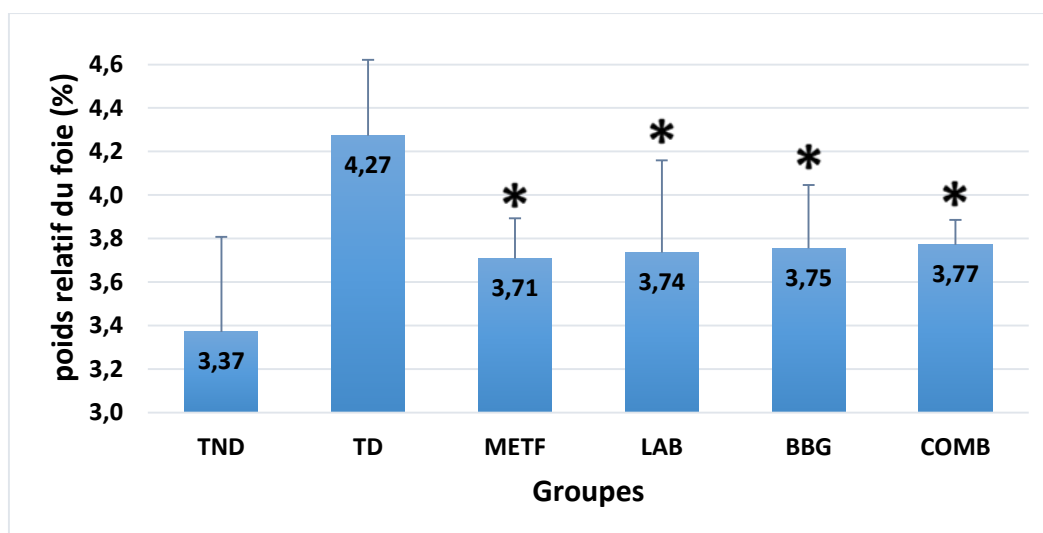


Figure IV.12 : Poids relatif du foie des rats de différents groupes expérimentaux

III.4. Poids relatif des reins (Fig. IV.13)

Les résultats des poids relatifs des reins sont représentés dans la figure IV.13. La moyenne des poids relatifs des reins des rats de groupe TND est la plus faible (0.65 ± 0.10 %) par rapport à tous les autres groupes tandis que le groupe TD avait la moyenne la plus forte 0.93 ± 0.03 . Les groupes traités brandissent des moyennes avec des valeurs qui se situent entre celles du groupes témoins (METF : 0.78 ± 0.08 %, LAB : 0.78 ± 0.08 %, BBG : 0.79 ± 0.07 % et COMB : 0.78 ± 0.05 %). L'étude statistique montre une différence statistiquement significative entre les groupes traités et le groupe TD avec un $p < 0.01$.

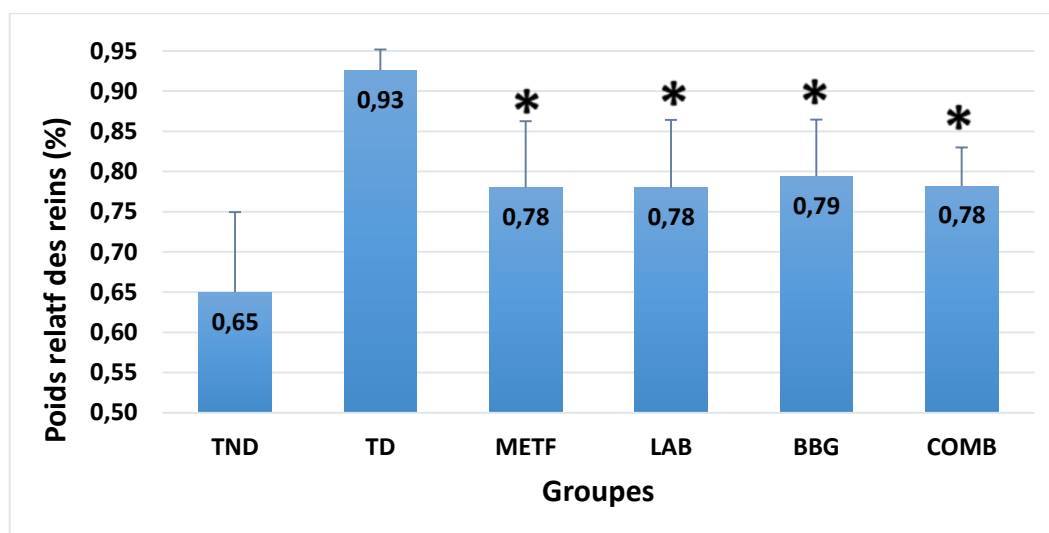


Figure IV.13 : Poids relatif des reins des rats des différents groupes expérimentaux

III.5. Evolution de la glycémie à jeun (Fig. IV.14)

Le dosage de la glycémie à jeun est fait chaque semaine, afin de voir l'effet des différents traitements sur la glycémie. Sauf le groupe des rats non diabétiques qui ont présenté une glycémie normale et stable pendant toute l'expérimentation. Après une injection de la STZ, tous les groupes affichent une hyperglycémie qui dépasse 05 g/L. Pour les rats diabétiques témoins, une légère diminution de la glycémie sans atteindre le 3.5 g/L durant toute l'expérimentation. Alors que les groupes traités après une semaine de traitement, la glycémie est diminuée pour atteindre 3.5 g/L. cette diminution est continuée le long de l'expérimentation où le groupe METF affiche la moyenne la plus faible (1.86 g/L) suivi par le groupe COMB (2.09 g/L) puis le groupe BBG 217 g/L et enfin le groupe LAB avec une moyenne 224 g/L. l'analyse statistique montre une différence significative entre tous les groupes traités et le groupe TD avec $p < 0.01$.

III.6. Dosage de l'hémoglobine glyquée (Fig. IV.15)

Le dosage de l'hémoglobine glyquée est donc utilisé pour le suivi des personnes diabétiques, en complément du dosage de la glycémie. La glycémie reflète le taux de sucre instantané dans le sang, alors que le taux d'hémoglobine glyquée reflète l'équilibre global du diabète (environ deux à trois mois). La figure IV.15 résume les résultats de dosage de l'hémoglobine glyquée de différents groupes de rats. Le groupe témoin négatif présentait un pourcentage d'hémoglobine glyquée significativement plus bas que les rats diabétiques du groupe témoin positif ($p < 0.0001$), indiquant une induction réussie du diabète dans tous les groupes diabétiques, alors que les rats diabétiques recevant les différents traitements affichent

des valeurs moins que celles de témoins diabétiques sans significativité statistique décelée ($p>0.05$).

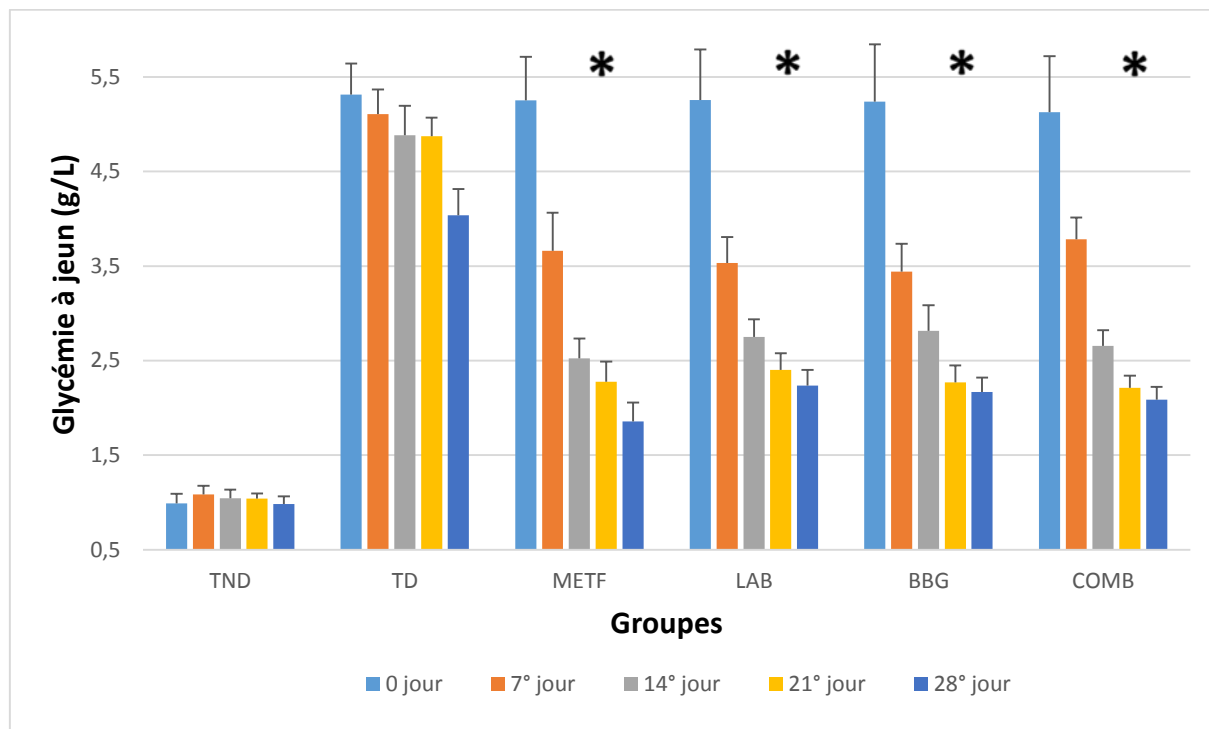


Figure IV.14 : Evolution de la glycémie à jeun des différents groupes expérimentaux

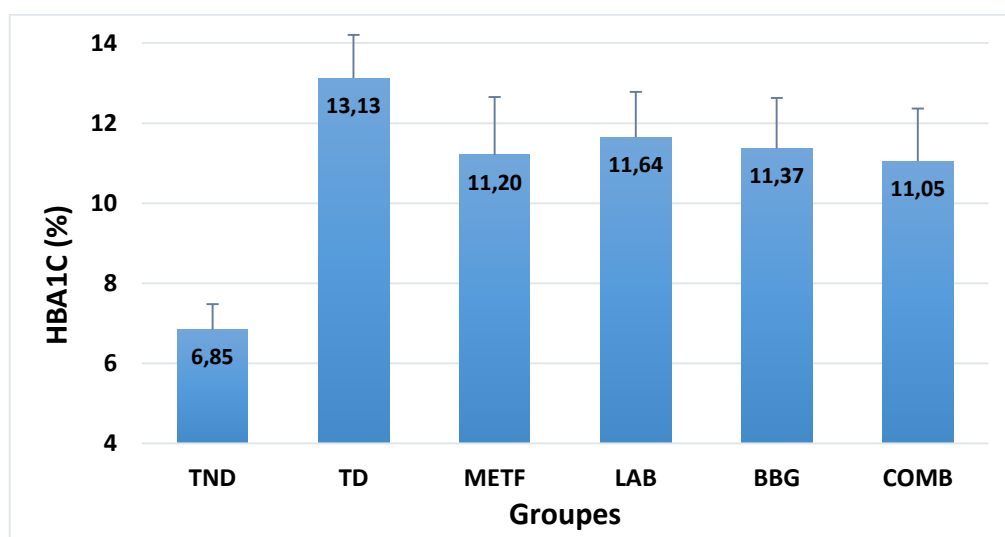


Figure IV.15 : Dosage l'HbA1c des différents groupes expérimentaux

III.7. Paramètres de la fonction rénale (Fig. IV.16)

Les résultats de paramètres rénaux (Urée et créatinine) sont présentés dans la figure IV.16. Pour les deux paramètres, les rats diabétiques témoins et recevant les 03 traitements présentent des valeurs supérieures comparées à celles du groupe non diabétique, l'étude statistique par

TUKEY Analysis montre une différence hautement significative entre les rats sains et les rats diabétiques. Concernant les groupes diabétiques, le traitement par la metformine, le BBG et traitement combiné font diminué les valeurs de l'urée et la créatinine avec une différence statistiquement confirmée ($p < 0.05$) par rapport au groupe TD, seuls les rats du groupe LAB qui présentent des valeurs moins que celles de groupe TD sans aucune différence statistique ($p > 0.05$).

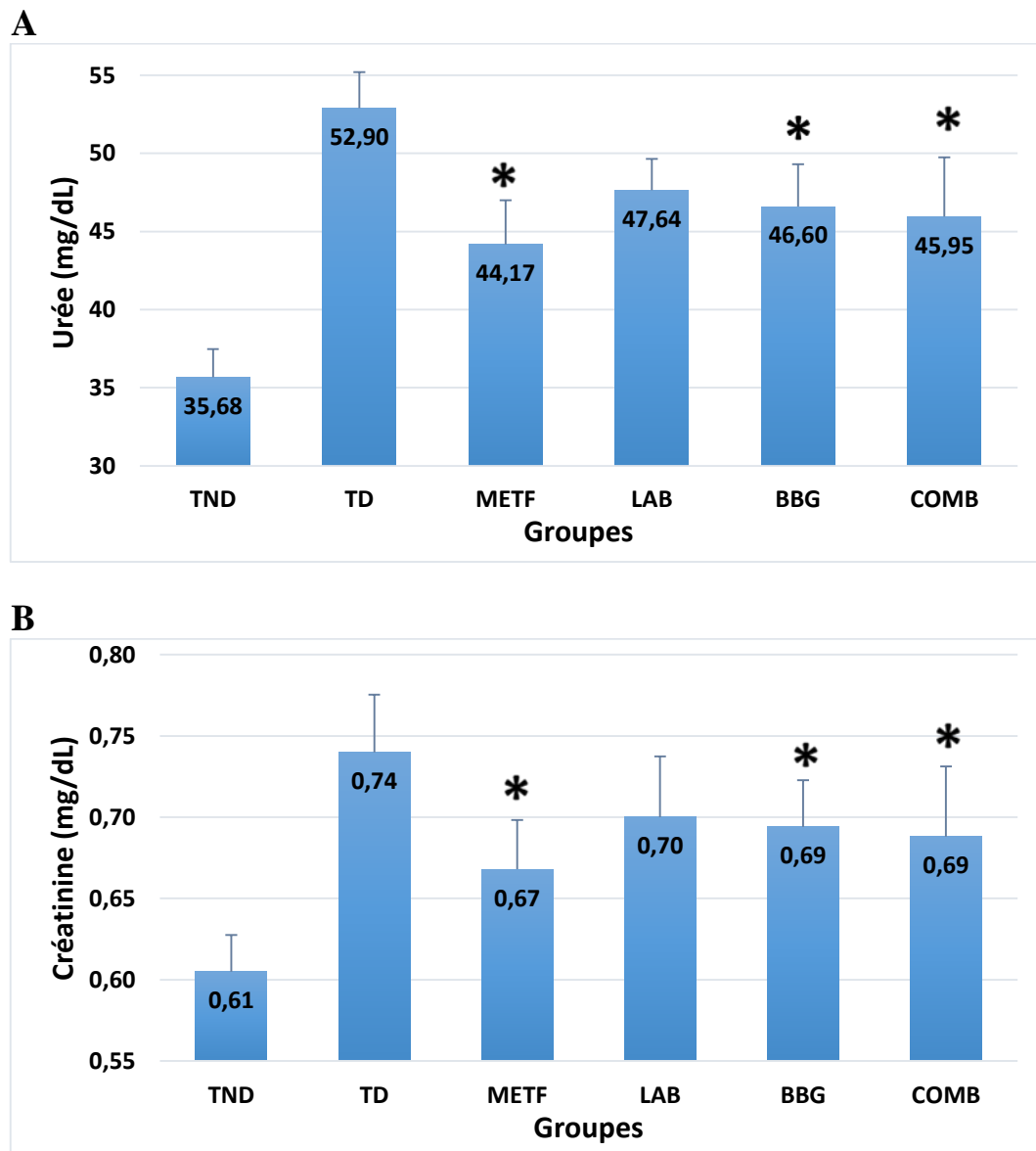


Figure IV.16 : Dosage de l'urée et de la créatinine des différents groupes expérimentaux

A : Dosage de l'urée ; B : Dosage de la créatinine

III.8. Paramètres hépatiques (Fig. IV.17)

La figure IV.17 montre qu'il existe une diminution du taux de l'ASAT chez les groupes diabétiques traités avec différents traitements comparés au groupe TD sans aucune différence statistiquement significative $p>0.05$, on note aussi que le groupe TND présente une valeur de l'ASAT physiologique normale très inférieure par rapport à tous les autres groupes avec une différence hautement significative ($p<0.00001$).

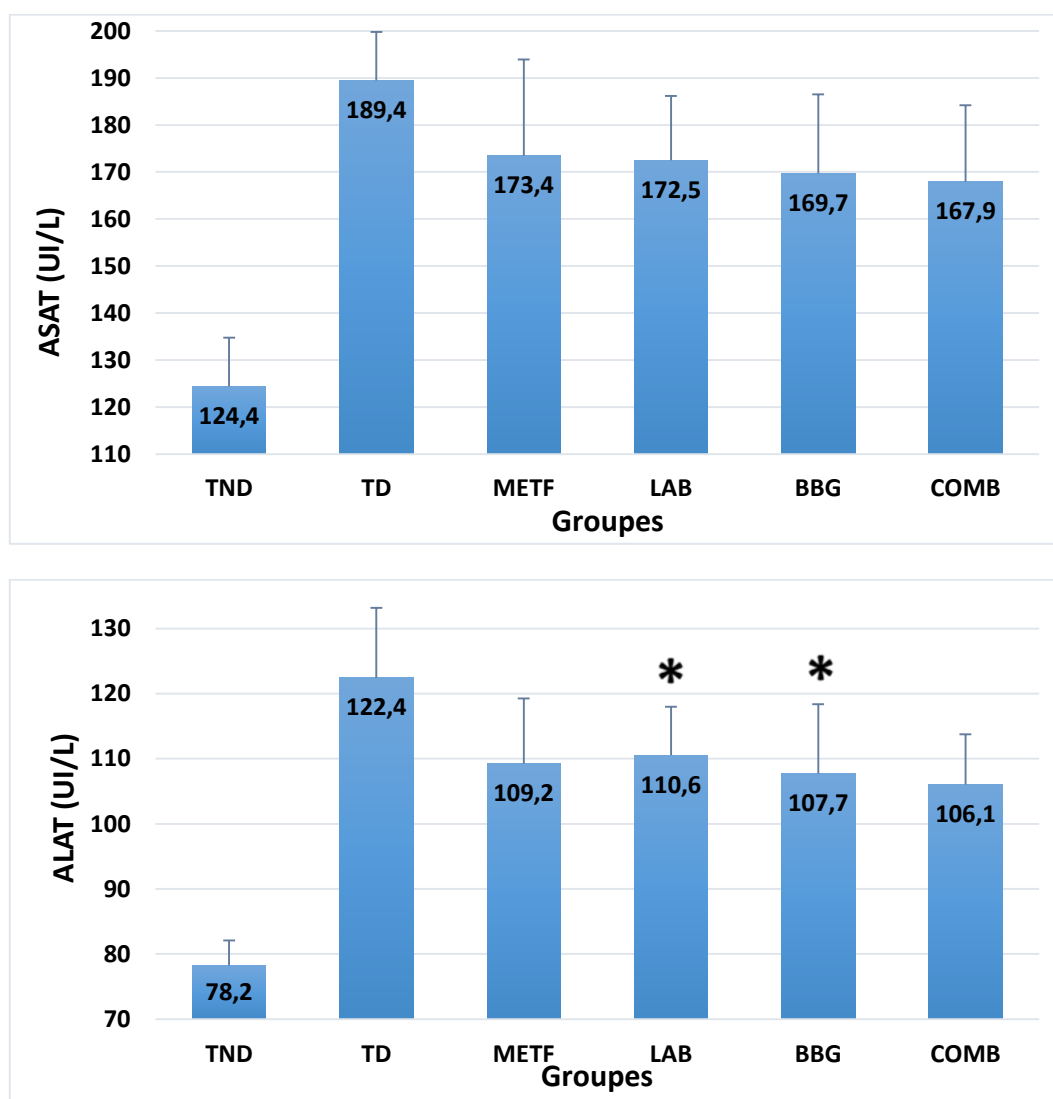


Figure IV.17 : Dosage de l'ASAT et l'ALAT des différents groupes expérimentaux

Les résultats illustrés dans la figure IV.17, montrent une forte augmentation de l'activité enzymatique de l'ALAT chez le groupe TD et les trois groupes traités, avec différence hautement significative par rapport au groupe TND ($p<0.0001$), l'administration des traitements aux rats malades y compris la metformine fait baisser le taux de l'enzyme sans

aucun effet statistiquement remarquable ($p>0.05$), sauf le groupe recevant les LAB et BBG qui présentent une activité enzymatique statistiquement plus faible que celle du groupe TD ($p<0.05$).

III.9. Paramètres lipidiques

III.9.1. Dosage du cholestérol total (Fig. IV.18)

Les teneurs sériques en cholestérol chez les rats diabétiques traités et non traités varient de façon très significative entre les différents lots. La teneur en cholestérol est augmentée très significativement chez le lot TD comparée au lot TND ainsi que à tous les autres lots traités, le lot consommant le BBG présente une teneur en cholestérol très proche de celle du lot TND avec aucune différence significative entre eux, suivi par le lot COMB, ce qui démontre l'effet hypocholestérolémiant du BBG.

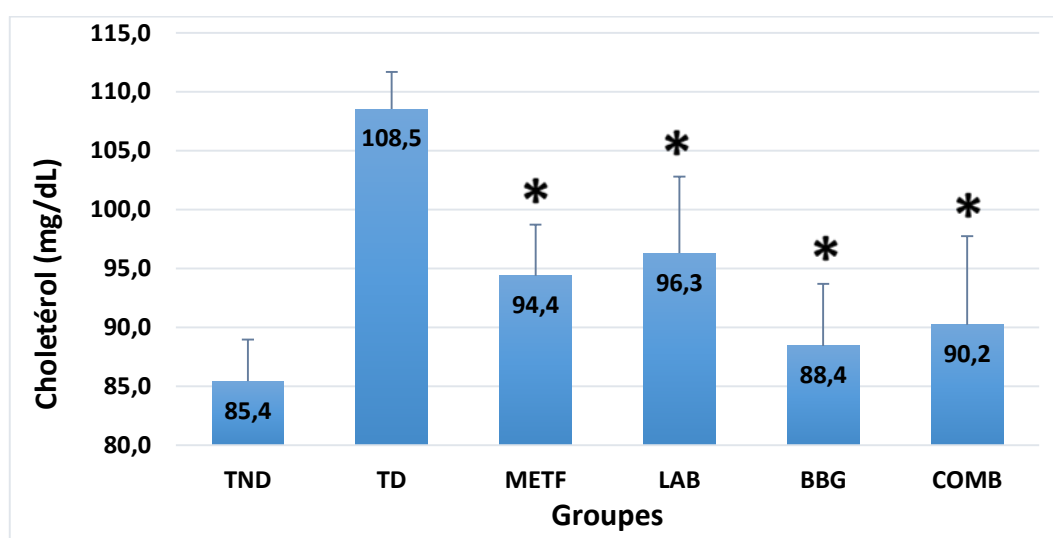


Figure IV.18 : Dosage du cholestérol total des différents groupes expérimentaux

III.9.2. Dosage des triglycérides (Fig. IV.19)

Les résultats obtenus montrent que le groupe BBG avait l'effet hypotriglycéridémiant le plus remarquable et significatif par rapport au groupe TD et sa valeur rapproche de celle du groupe TND, les autres groupes traités ont subi une diminution de la teneur des triglycérides dans le sang. Le traitement statistique montre que la différence entre tous les groupes traités et le groupe diabétique est très significative ($p<0.001$ pour le groupe BBG et $p<0.01$ pour le groupe LAB et COMB).

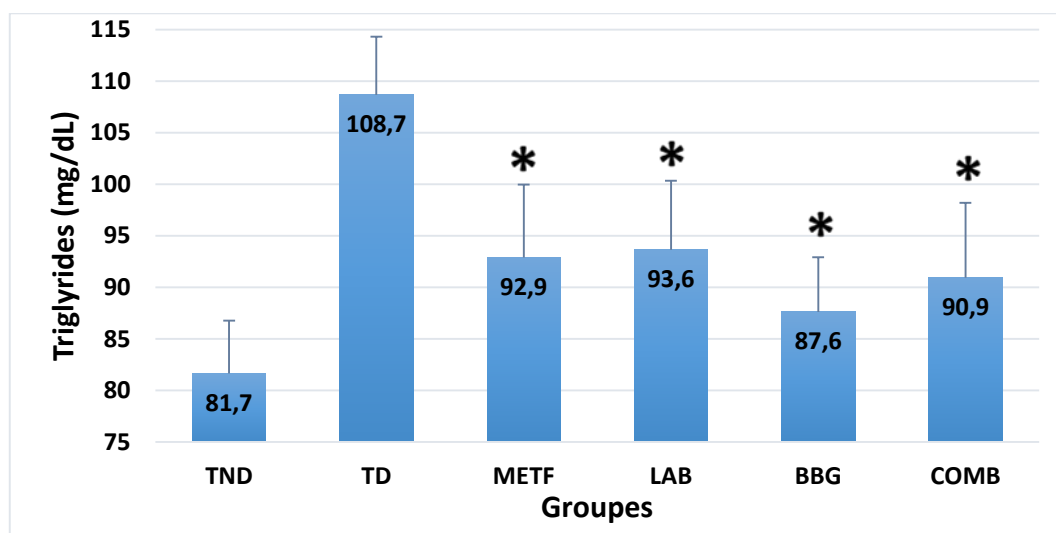


Figure IV.19 : Dosage de triglycérides des différents groupes expérimentaux

III.9.3. Dosage de l'HDL-Cholestérol (Fig. IV.20)

Les résultats obtenus montrent d'une part une augmentation significative de la teneur en HDL-C chez le lot BBG comparé à celle du groupe TD, avec une différence très significative ($p < 0.001$). La concentration de l'HDL-CHL est aussi augmentée dans les autres groupes traités de façon moins prononcée que le groupe BBG. L'analyse statistique montre une différence statistiquement significative entre les groupes traités et le groupe TD avec $p < 0.05$.

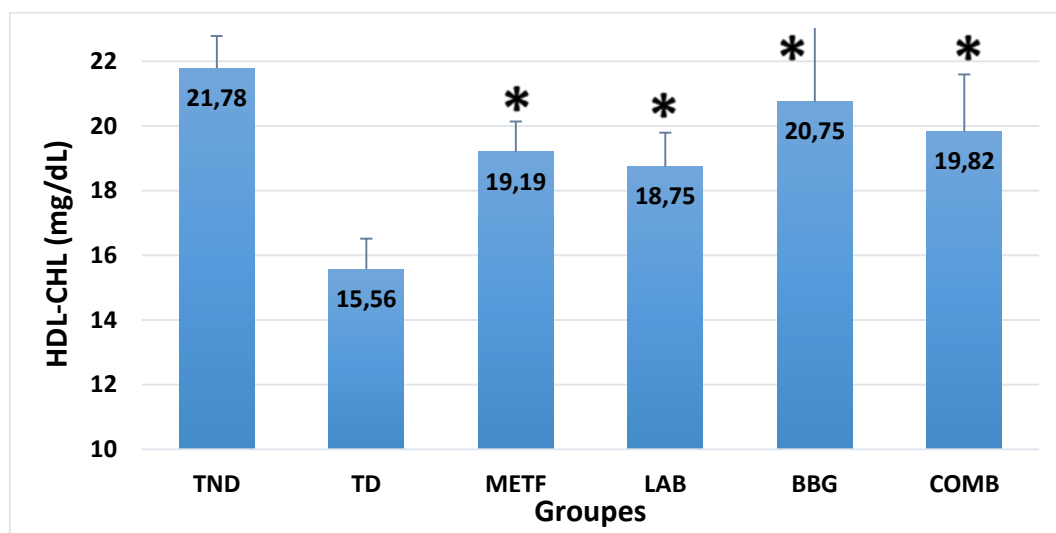


Figure IV.20 : Dosage de l'HDL-CHL des différents groupes expérimentaux

III.9.4. Dosage du LDL-Cholestérol (Fig. IV. 21)

Après 28 jours de traitement, les différents groupes expérimentaux présentent des teneurs différents entre eux en LDL-CHL, le TD affiche une valeur nettement supérieure par rapport le groupe TND ($p < 0.00001$), et même avec les groupes diabétiques traités mais à des degrés différents, les rats consommant la metformine et les LAB présentent des teneurs inférieures à celles du TD avec des valeurs de $p < 0.01$ et $p < 0.05$ respectivement, alors que la teneur de la LDL-CHL du groupe du BBG et celui qui a consommé les deux composés est très faible et proche de celle du groupe TD avec une différence hautement significative ($p < 0.001$) en comparaison avec le TD.

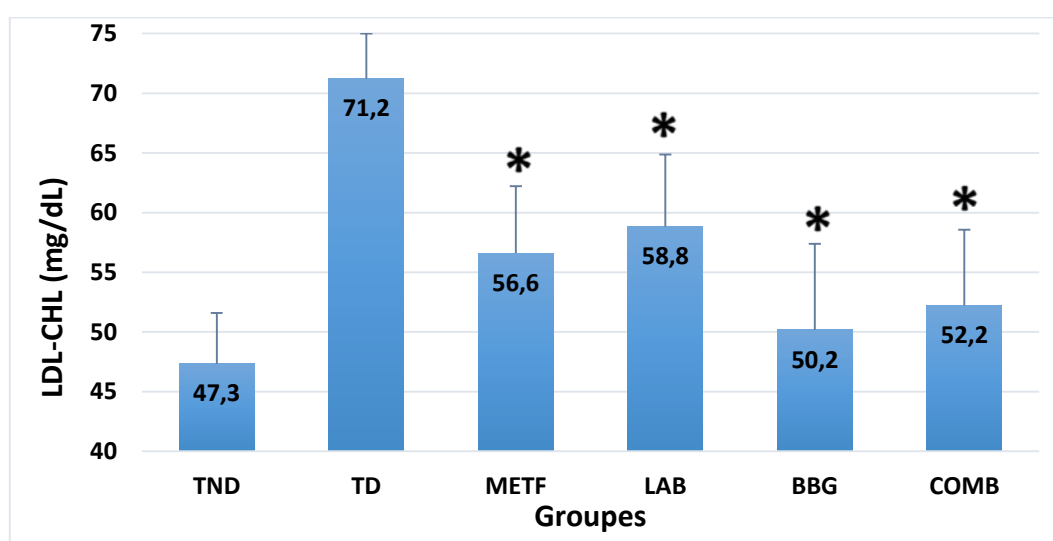


Figure IV.21 : Détermination du LDL-CHL des différents groupes expérimentaux

III.9.5. Détermination des VLDL (Fig. IV.22)

Les VLDL qui assurent le transport des lipides dans le sang connaissent le même profil que les LDL-CHL après quatre semaines d'expérimentation. Les rats diabétiques traités avec La metformine, les LAB et la COMB présentent des valeurs des VLDL inférieures à celle du groupe TD avec une différence statistiquement significative ($p < 0.01$), alors que les rats traités par le BBG présentent dans leur sang des quantités en VLDL inférieures à tous les autres groupes diabétiques ($p < 0.001$ par rapport le TD) et proche des quantités du groupe TND.

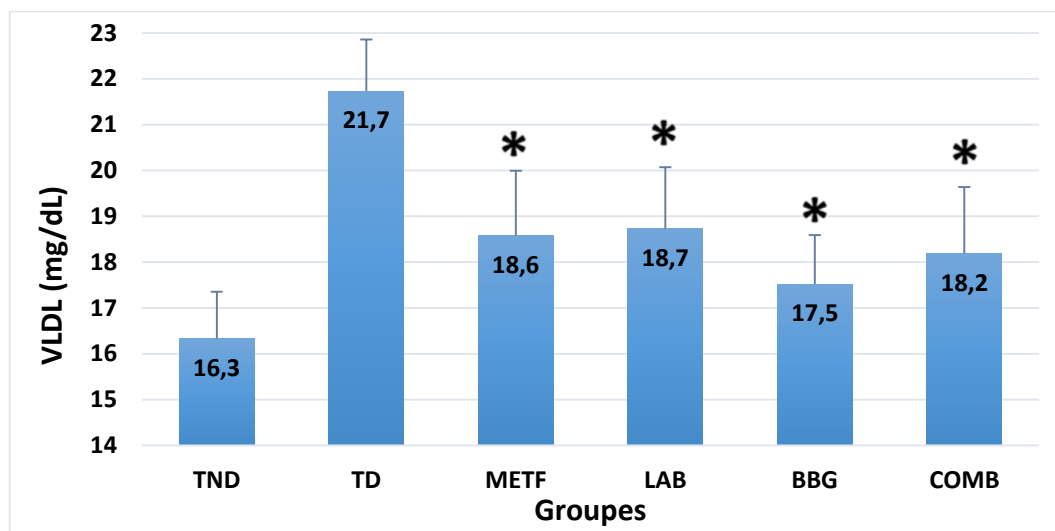


Figure IV.22 : Détermination des VLDL des différents groupes expérimentaux

III.10. Les paramètres cardiovasculaires

III.10.1. Indice de risque athérogénique (Fig. IV.23)

Les résultats dans la figure IV.23 révèlent que l'IA pour le groupe BBG est nettement inférieur (2,47) par rapport au groupe TD avec une différence hautement significative ($p < 0.0001$). Les autres groupes diabétiques traités présentent eux aussi des indices athérogénique faible en comparaison avec le groupe TD et supérieur par rapport au groupe TND. L'analyse statistique montre une différence très significative avec un $p < 0.01$.

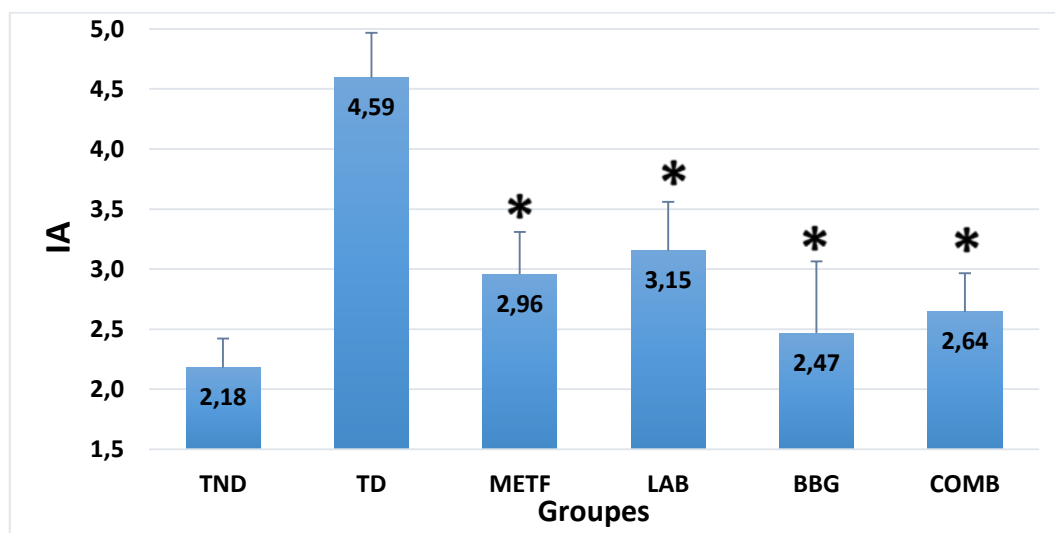


Figure IV.23 : Indice IA des différents groupes expérimentaux

III.10.2. Indice de risque coronarien (Fig. IV.24)

Le risque coronarien du groupe TDN est le plus grand par rapport à tous les autres groupes traités et non traités. Des traitements de 28 jours par le LAB, Metformine, COMB et BBG ont permis une diminution de l'IRC de 26.4 %, 29.5%, 34.7 % et 38.2 % respectivement. L'analyse statistique montre une différence hautement significative ($p < 0.001$) entre le groupe BBG et TD et différence très significative entre les autres groupes traités et le groupe TD.

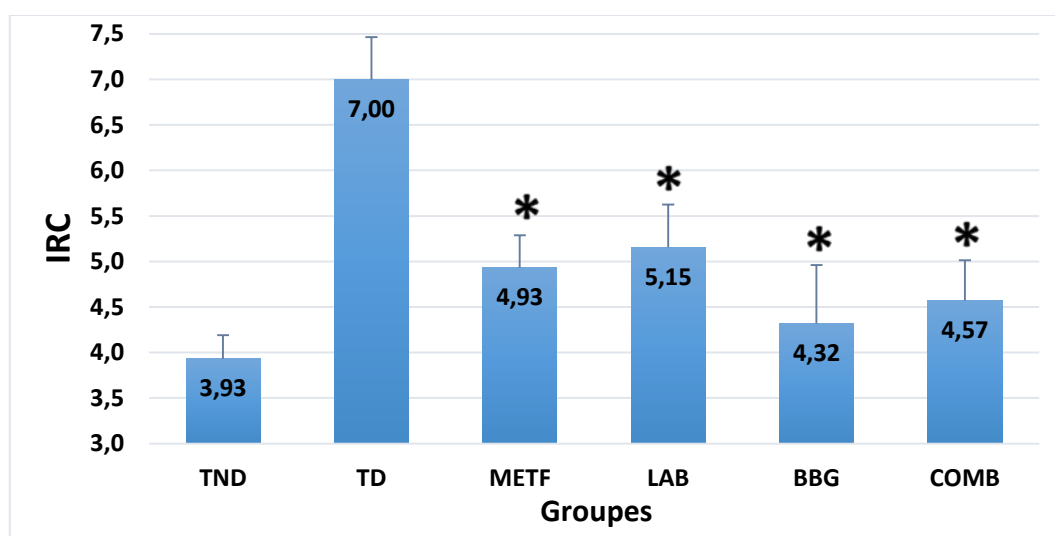


Figure IV.24 : IRC des différents groupes expérimentaux

III.10.3. Indice de risque cardiovasculaire (Fig. IV. 25)

L'indice de risque cardiovasculaire du groupe TDN est le plus faible par rapport à tous les groupes suivis par les groupes traités. En comparaison entre le groupe TD et les groupes traités, le groupe LAB affiche l'IRCV le plus grand suivi par celui du groupe METF, puis COMB et enfin le groupe BBG. L'analyse statistique révèle une différence statistique entre tous les groupes traités et le groupe TD avec des $p < 0.01$.

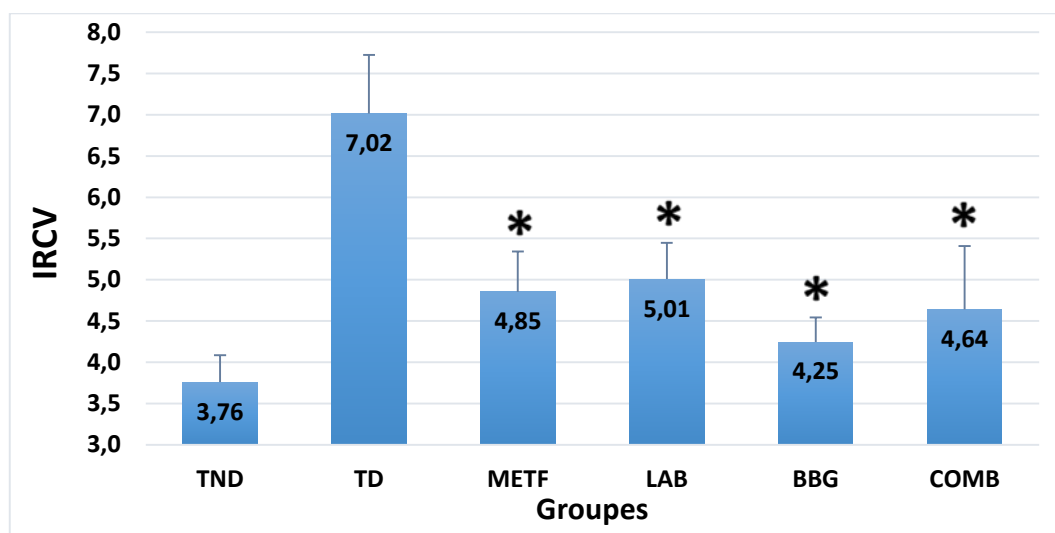


Figure IV.25 : IRCV des différents groupes expérimentaux

III.10.4. Dosage de lactate déshydrogénase (LDH) (Fig. IV.26)

Le dosage de la LDH est nécessaire pour le diagnostic et suivi des atteintes cardiaques, l'activité enzymatique de cette enzyme chez les rats diabétiques non traités est nettement supérieure en comparant avec tous les autres groupes, l'exposition aux différents traitements permet la diminution de l'activité de la LDH avec presque le même degré avec un avantage pour le BBG. Le test *ANOVA* suivi par analyse *Tukey* et *Dunnnett* permet de confirmer la différence statistique entre les groupes traités et le groupes TD ($p < 0.05$) et une différence hautement significative entre le groupe TDN et les autres groupes ($p < 0.0001$).

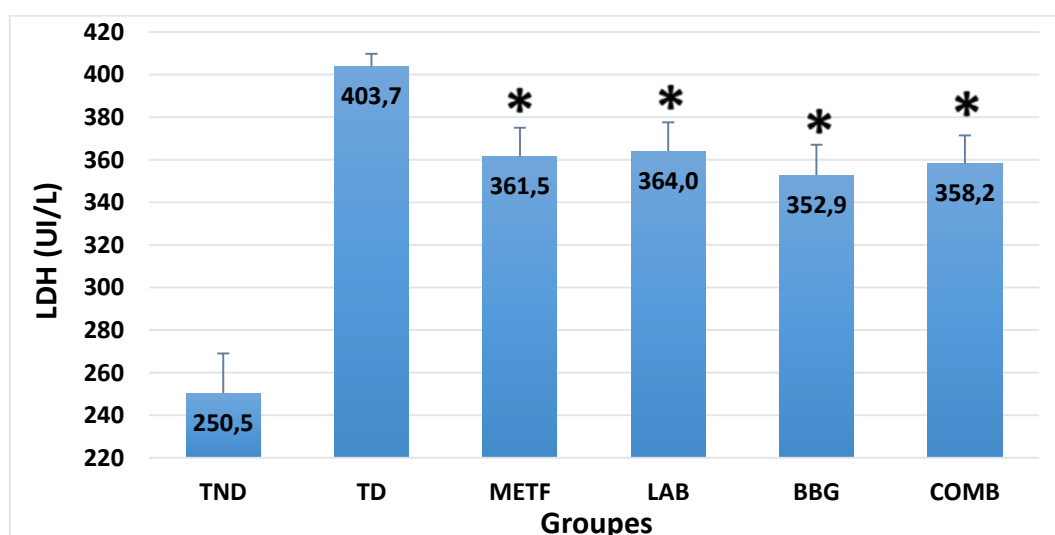


Figure IV.26 : Dosage de LDH des différents groupes expérimentaux

III.11. Les protéines sériques (Fig. IV.27)

D'après la figure IV.27-A, nous avons constaté une diminution très significative des protéines totales des rats diabétiques par rapport aux rats non diabétiques témoins. En revanche, les différents traitements ont permis d'augmenter le taux des protéines sans atteindre les valeurs du groupe TND, cette augmentation est considérée statistiquement significative par comparaison avec le groupe TD.

Le taux trop faible de l'albumine du groupe TD indique une forte perte de cette protéine au niveau rénale, le groupe TND affiche une valeur nettement supérieure et se trouve dans les valeurs physiologiques. On a constaté que les différents groupes diabétiques traités présentent des valeurs supérieures au groupe TD sans arriver aux valeurs physiologiques, l'analyse statistique montre une différence significative entre les groupes traités et le groupe TD.

La fraction des globulines qui comporte différentes familles de protéines avec des rôles physiologiques très différents, se révèle très faible en valeur absolue pour le groupe TD, alors que cette fraction a connu une légère augmentation chez les groupes diabétiques traités, jugée statistiquement significative par ANOVA.

Dans la figure IV.27-D, nous avons constaté un rapport Albumine/Globuline très faible pour le groupe TD contrairement au groupe TND, les groupes traités révèlent des valeurs intermédiaires entre les deux, cette augmentation de rapport est statistiquement significative par rapport au groupe témoin diabétique.

III.12. Paramètres immunologiques

III.12.1. Dosage du complément C3 (Fig. IV.28)

Après 28 jours de traitement, les groupes traités montrent un faible taux de complément C3 où le groupe BBG affiche la plus faible valeur, suivi par le groupe COMB, puis LAB et enfin, le groupe METF. Seuls les groupes BBG et COMB montrent une différence statistiquement significative par rapport au groupe TD avec un $p < 0.05$.

III.12.2. Le rapport Neutrophiles/lymphocytes (N/L) (Fig. IV.29)

Le rapport N/L du groupe TND est le plus faible en comparaison avec les autres groupes avec une significativité statistique décelée, l'induction du diabète a fait augmenter ce rapport chez le groupe diabétique, mais après 28 jours de traitements, une baisse de ce paramètre à des différents degrés selon le type de traitement est remarquée. L'évaluation statistique montre une

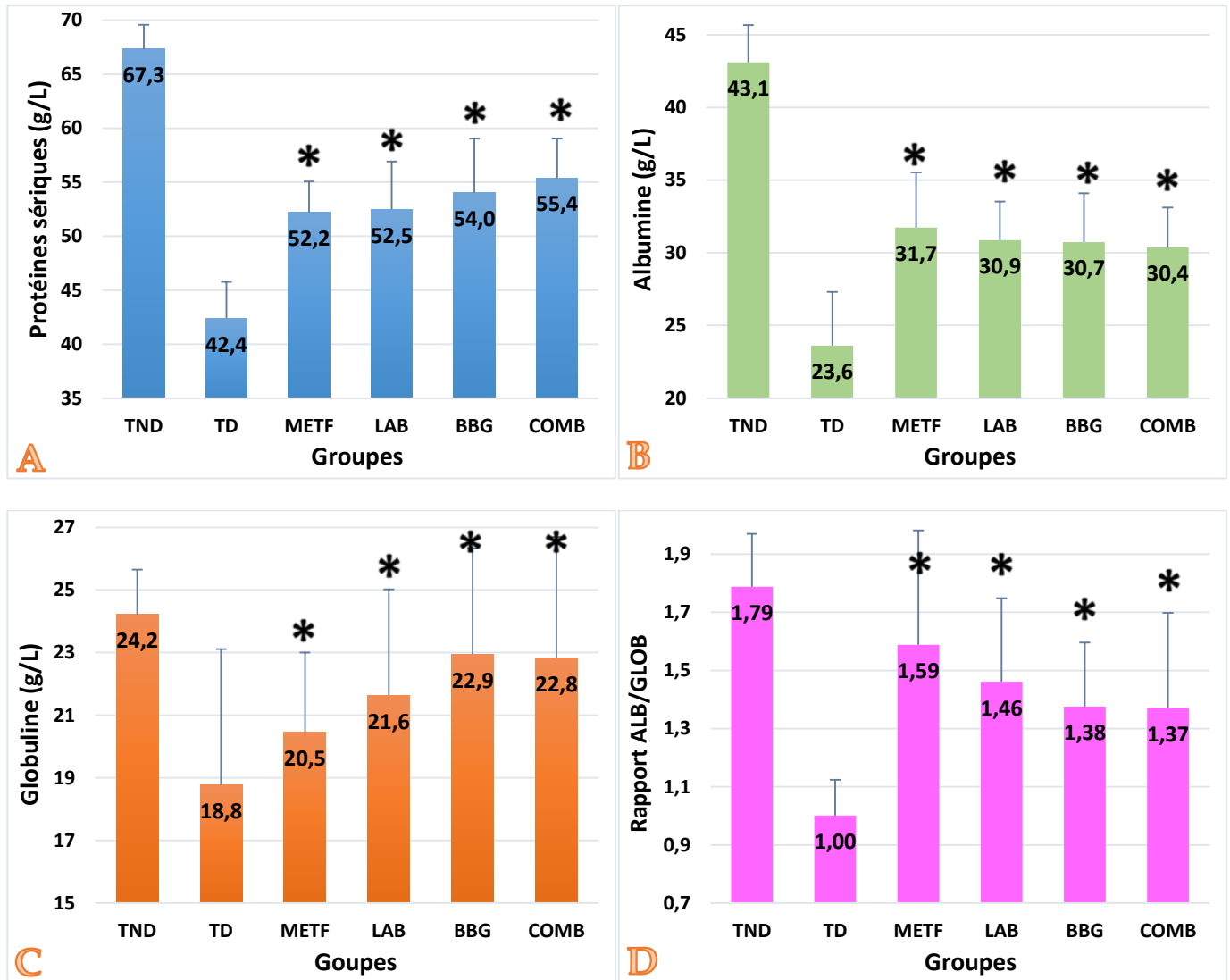


Figure IV.27 : Dosage des protéines sériques des différents groupes expérimentaux

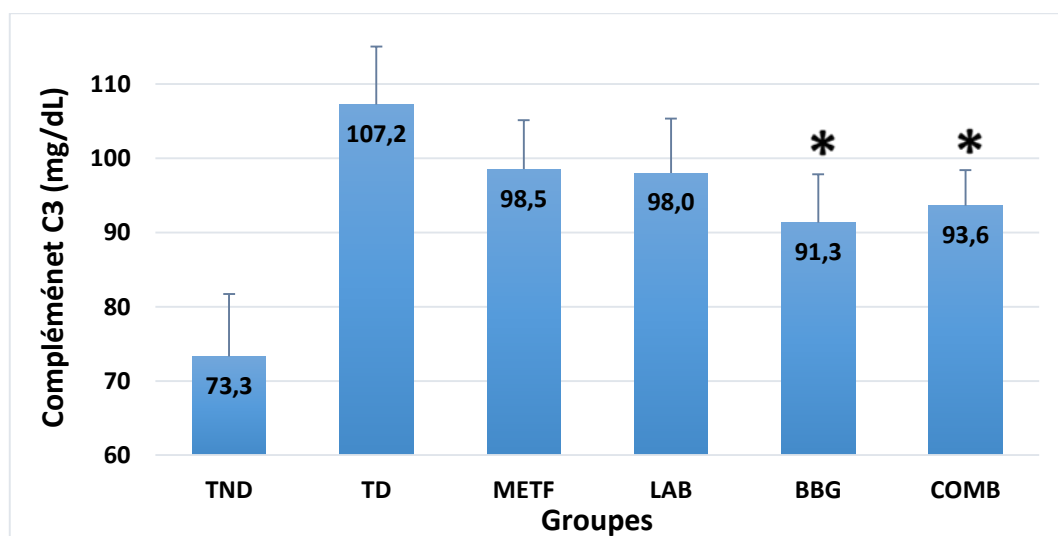


Figure IV.28 : Dosage du complément-C3 des différents groupes expérimentaux

différence significative entre le groupe TD et les groupes COMB et BBG avec un $p < 0.05$ et aucune différence statistique avec les groupes LAB et METF ($p > 0.05$).

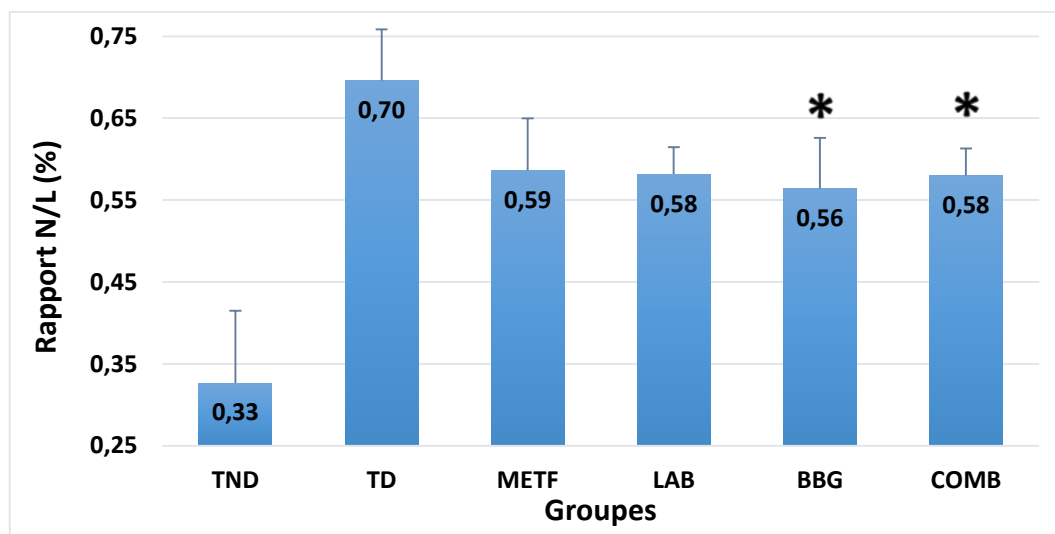


Figure IV.29 : Le rapport Neutrophiles/Lymphocytes des différents groupes expérimentaux

III.13. Dosage du peptide-C (Fig. IV.30)

Le dosage du peptide-C chez tous les groupes permet de confirmer la réussite du protocole de l'induction du diabète, l'administration de la STZ fait diminuer le taux du peptide-C et par conséquent l'insuline avec un pourcentage de 82.6%, l'exposition à des différents traitements pendant 28 jours permet une légère augmentation de taux de peptide-C mais l'étude statistique ne révèle aucune différence entre les rats diabétiques témoin et les rats exposés à différents traitements ($p > 0.05$).

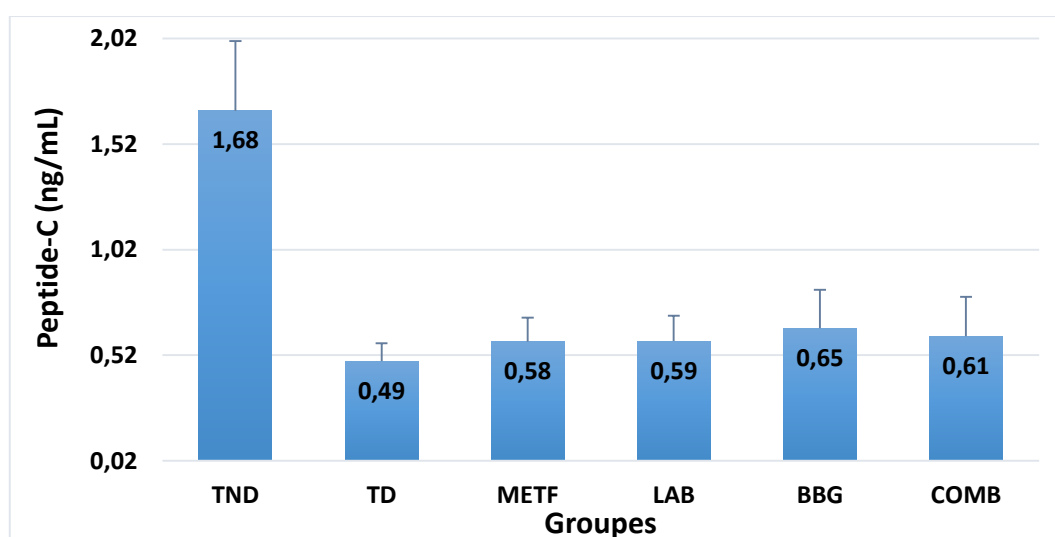


Figure IV.30 : Dosage du peptide-C des différents groupes expérimentaux

III.14. L'évaluation des fonctions des cellules bêta du pancréas (Fig. IV.31)

La résistance à l'insuline joue un rôle important dans la physiopathologie du diabète et est associée à l'obésité et à d'autres facteurs de risque cardiovasculaire. Le dosage du glucose et le modèle d'analyse minimale sont deux méthodes établies pour déterminer la sensibilité à l'insuline *in vivo*, mais aucune de ces méthodes n'est facilement mise en œuvre dans de grandes études (Katz et al., 2000). Tous les rats diabétiques témoins et traités présente une très faible activité des cellules bêta pancréatiques avec une légère augmentation pour le groupe METF, sans aucune différence entre ces groupes. En revanche, le groupe TND affiche une valeur nettement supérieure qui prouve le bon fonctionnement des leurs cellules bêta. L'étude statistique entre le groupe TND et les autres groupes montre une différence hautement significative.

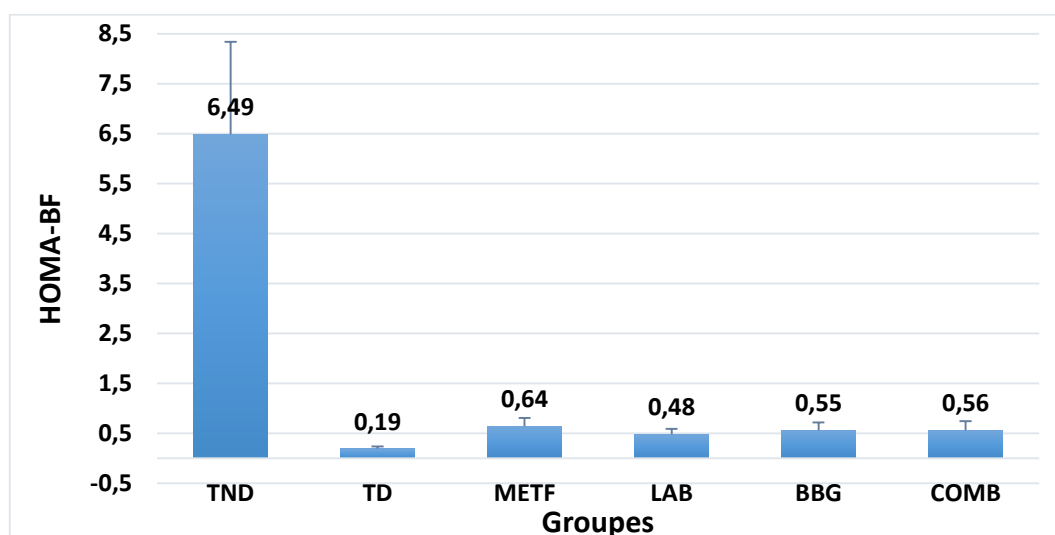


Figure IV.31 : Indice HOMA-BF des différents groupes expérimentaux

III.15. La sensibilité des cellules de l'organisme à l'action de l'insuline (Fig. IV.32 et IV. 33)

L'indice QUICKI et l'indice de l'activité de l'insuline (IAI) montrent des sensibilités différentes entre les rats non diabétiques et les rats diabétiques, le groupe TND révèle une bonne sensibilité des cellules envers l'insuline traduit par un QUICKI plus forte et un IAI très faible par rapport aux autres groupes, les différents traitements ont permis d'augmenter l'indice QUICKI et abaisser le IAI. L'analyse statistique montre une différence significative entre tous les groupes traités par rapport au groupe TD pour l'indice IAI, alors que pour l'indice QUICKI, seuls les groupes BBG et METF qui ont montré une différence significative.

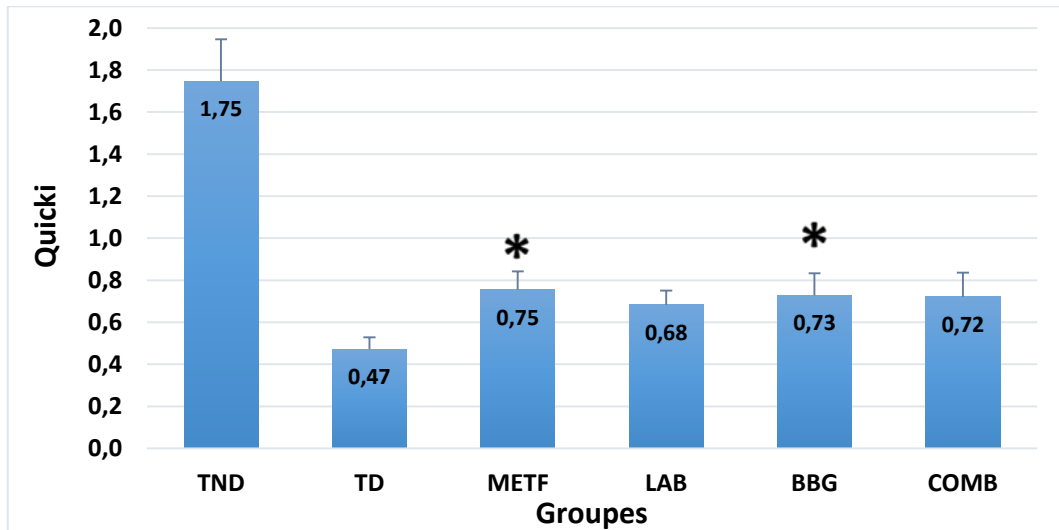


Figure IV.32 : Indice Quicki des différents groupes expérimentaux

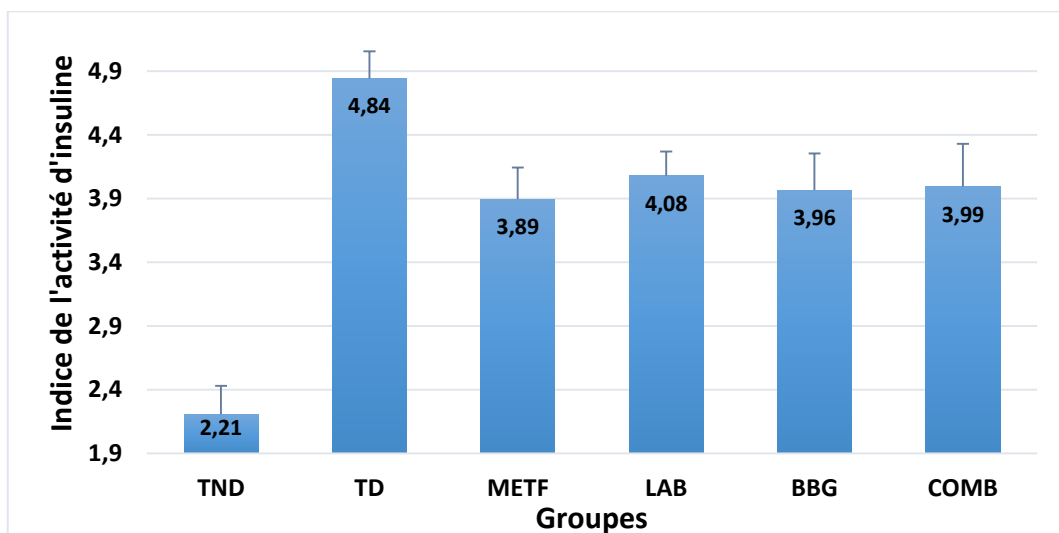


Figure IV.33 : Indice de l'activité d'insuline des différents groupes expérimentaux

III.16. Discussion

L'objectif principal de cette partie se résumait à mettre en évidence les propriétés biologiques seuls ou en combinaison des bêta-glucanes extraits de l'orge et les bactéries lactiques isolées du lait de chamelle. Après extraction du BBG et isolement des bactéries lactiques, le BBG est évalué *in vitro* pour ses propriétés antioxydantes, anticholinestérasiques et antidiabétiques, et les bactéries lactiques sont soumis à des conditions du stress gastro-intestinale pour sélectionner les souches résistantes. Le travail est finalisé par une étude *in vivo* sur des rats Wistar pour voir l'effet de la combinaison du BBG et les bactéries lactiques sur le diabète induit par streptozotocine.

Le diabète est une épidémie imminente dans le monde entier, affectant presque tous les principaux segments de la société, créant des fardeaux pour la santé et l'économie mondiale (Panwar et *al.*, 2013). Un grand nombre d'études ont pu identifier une série de facteurs de risque multiples tels que la prédisposition génétique, les changements épigénétiques, le mode de vie malsain et la modification du microbiote intestinal qui entraînent une augmentation de l'adiposité, un dysfonctionnement des cellules Bêta, une hyperglycémie, une dyslipidémie, une inflammation, une perméabilité intestinale et un stress oxydatif associé au diabète de type 2 (Cani et *al.*, 2012 ; Mengual et *al.*, 2010). Des études récentes ont proposé des solutions multifactorielles incluant des recommandations alimentaires dans la prise en charge du DT2. Les interventions diététiques en conjonction avec les probiotiques et les fibres alimentaires, une stratégie multifactorielle pour abroger la progression et le développement du diabète. Bien qu'il n'y ait pas de recommandation spécifique pour les fibres alimentaires et les probiotiques pour les patients diabétiques, les directives diététiques de l'USDA (département de l'agriculture des USA) de 2010 recommandaient de consommer des fibres alimentaires naturellement présentes dans les aliments pour améliorer le DT2 (Panwar et *al.*, 2013).

1. Gain du poids corporel

Le diabète induit par la STZ est caractérisé par une perte sévère de poids corporel (Akbarzadeh et *al.*, 2007 ; Sarkhail et *al.*, 2007). En effet, L'évolution pondérale des différents lots traités a montré une chute de poids durant la première semaine de traitement et un gain du poids non significatif qu'après la troisième semaine de traitement, et cela peut être expliqué par l'action prolongée des fibres alimentaires et des bactéries lactiques. Cette perte de poids des animaux au début de l'expérimentation est probablement due à une carence en insuline qui conduit à une diminution de l'absorption des acides aminés par les tissus avec une réduction

conséquence de la synthèse des protéines (Vasudvan et *al.*, 2013). Par ailleurs, de nombreuses études suggèrent que la perte de poids corporel chez les rats diabétiques peut être expliquée par une augmentation du catabolisme des lipides et des protéines due au déficit en glucides (Sathishsekar et Subramanian, 2005). Le gain de poids des rats traités par le BBG pourrait être expliqué par l'effet des fibres alimentaires sur le diabète en réduisant l'hyperglycémie postprandiale en augmentant la viscosité du contenu de l'estomac (Cameron-Smith et *al.*, 1994) et amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les personnes diabétiques et non diabétiques (Sierra et *al.*, 2002). Les études épidémiologiques ont montré une corrélation inverse entre la consommation des fibres et le poids corporel (Appleby et *al.*, 1998) et la masse grasse (Nelson et Tucker, 1996). Une étude prospective a établi l'association entre la consommation des grains entiers et le gain de poids des femmes durant 12 ans de suivi, dans cette étude, ils ont montré que le gain de poids est inversement associé avec la consommation des grains entiers mais formellement associé avec la consommation des grains raffinés (Liu et *al.*, 2003).

2. Evolution de la glycémie

Les effets hypoglycémiques des β -glucanes des céréales ont reçu une attention croissante. Les β -glucanes dérivés de l'avoine, du blé, de l'orge et des champignons ont été testés. Parmi eux, les β -glucanes de l'avoine ont reçu le plus d'attention et seulement quelques articles concernant les β -glucanes d'orge (Behall et *al.*, 2006 ; Brennan et Cleary, 2005 ; Gao et *al.*, 2012). Dans notre étude et durant les 28 jours d'expérimentation, des mesures de la glycémie sont faites chaque semaine à jeun. Les résultats montrent que les différents traitements ont un effet hypoglycémiant significatif à des différents degrés, ces résultats sont concordants avec plusieurs travaux (Choi et *al.*, 2010 ; Lo et *al.*, 2006). Tandis que Hallfrisch et Behall (2003) ont noté qu'aucune différence significative n'a été observée entre les β -glucanes d'orge et d'avoine sur la réponse au glucose et à l'insuline. Cavallero et *al.* (2002) ont signalé que le β -glucane d'orge avait un effet sur la réduction de la glycémie postprandiale, même dans les aliments à indice glycémique élevé. Le mécanisme des BG pour réduire la glycémie pourrait être médié éventuellement en retardant la vidange de l'estomac afin que le glucose alimentaire soit absorbé plus lentement (Kiho et *al.*, 1995). Ces changements réduisent le sentiment de faim causé par une diminution rapide de la glycémie (Ludwig, 2003). Ainsi, les β -glucanes peuvent diminuer l'appétit et réduire l'apport alimentaire. D'autre part, la présence de β -glucanes d'orge dans les aliments amylicés modifiait l'arrangement structurel de la matrice alimentaire, ce qui peut être lié à la réduction de la gélatinisation de l'amidon et à une diminution des index glycémiques (Symons et Brennan 2004). Bien que Dong et *al.* (2011) aient signalé que le β -

glucane d'avoine pouvait inhiber efficacement l'activité disaccharidase à la fois *in vivo* et *in vitro*, on a supposé qu'il n'avait peut-être rien à voir avec les activités des disaccharidases. L'effet possible est la viscosité élevée que BBG a fait obstacle au contact des disaccharides à leurs hydrolases. Un autre mécanisme possible pour les β -glucanes pour réduire le taux de glucose dans le sang est médié par la voie de la signalisation par l'activation PI3K/Akt. La diminution de l'activité PI3K/Akt a montré qu'il jouait un rôle clé dans la pathogenèse du diabète. Une étude a prouvé que les β -glucanes stimulent l'activation de la voie PI3K/Akt à travers plusieurs récepteurs tels que la Dectine-1 et le récepteur 3 du complément (Chen et Seviour 2007). Par exemple, il a été démontré que le zymosan (bêta-glucane) active la voie PI3K/Akt médiée par la kinase syk (Hiller et *al.*, 2000). Ces bêta-glucanes peuvent se lier au récepteur de la dectine-1 pour stimuler la voie du signal (Olsson et Sundler, 2007). Cependant, comment cela fonctionne dans le diabète n'est pas étudié. Il sera intéressant de tester si les bêta-glucanes pourraient restaurer l'activité de PI3K/Akt dans les modèles animaux diabétiques.

De plus, le β -glucanes est fermenté par la flore intestinale, ce qui entraîne la formation d'acides gras à courtes chaînes (SCFA) tels que l'acétate, le propionate et le butyrate (den Besten et *al.*, 2013 ; Hughes et *al.*, 2008 ; Mitsou et *al.*, 2010). En tant que molécules du signal, les SCFA sont capables de moduler le métabolisme du glucose et du cholestérol via des récepteurs distincts (par exemple, Ffr 2/3, récepteurs d'acides gras libres) (den Besten et *al.*, 2013). Via ces récepteurs, les SCFA peuvent augmenter la concentration d'hormones gastro-intestinales telles que GLP-1 (Glucagon Like Peptide-1) et PYY (peptide YY). Le PYY induit l'utilisation du glucose dans les tissus musculaires et adipeux et le GLP-1 réduit indirectement la concentration de glucose dans le sang en augmentant la concentration d'insuline et en réduisant la production de glucagon dans le pancréas.

L'hypothèse selon laquelle les probiotiques pourraient jouer un rôle dans le maintien d'un microbiote intestinal et le contrôle de la glycémie a suscité beaucoup d'attention (Gomes et *al.*, 2014). Des altérations du microbiote intestinal qui ont été rapportées chez des patients atteints de DT2 pourrait être réversible avec un supplément probiotique (Larsen et *al.*, 2010). La supplémentation alimentaire en probiotiques chez un modèle diabétique induit par le streptozotocine et le fructose a amélioré le métabolisme du glucose et des lipides, supprimé l'intolérance au glucose et retardé l'apparition d'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et le stress oxydatif (Yadav et *al.*, 2008). Yun et son équipe (2009) ont constaté que la glycémie à jeun et la glycémie postprandiale étaient significativement diminuées après une ingestion de probiotiques pendant 3 semaines chez des souris diabétiques. Dans notre étude, nous avons

observé que les probiotiques avaient un effet hypoglycémiant par rapport aux témoins diabétiques, ce qui conforte l'idée selon laquelle la supplémentation en probiotiques peut avoir un effet bénéfique sur la glycémie à jeun élevée. Toutefois, toutes les études ne font pas état d'effets bénéfiques des probiotiques. Il faut donc être prudent quant aux espèces, aux sources et à la dose à utiliser, ce qui peut avoir des conséquences importantes sur les effets observés et aider à expliquer l'hétérogénéité des études. L'analyse de sous-groupes d'études utilisant plusieurs espèces de probiotiques a indiqué une réduction plus prononcée de la glycémie à jeun, de l'insulinémie et de l'HOMA-IR ; Cependant, il semble que les probiotiques n'aient aucun effet sur ces critères d'évaluation pour les essais utilisant une seule espèce de probiotique, ce qui suggère qu'une combinaison d'espèces de probiotiques est plus efficace qu'une seule espèce (Chapman *et al.*, 2011).

Comment les probiotiques abaissent-ils la glycémie ? Ils peuvent être liés à une diminution du stress oxydatif, qui se révèle être un facteur dans l'hyperglycémie. Des souches spécifiques de bactéries lactiques ont des propriétés antioxydantes (Amaretti *et al.*, 2013). Par exemple, Yadav et ses collaborateurs (2008) ont rapporté qu'un lait fermenté contenant *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*, retardait la progression de l'intolérance au glucose, de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie en réduisant le stress oxydatif chez l'animal. En outre, une inflammation chronique de faible grade est observée chez les personnes diabétiques et obèses et le système immunitaire a un rôle crucial dans la régulation du métabolisme du glucose. Ainsi, les probiotiques pourraient moduler les réponses immunitaires et l'inflammation, en réduisant les cytokines et en supprimant la voie NF- κ B, qui médié l'activation microbienne du système immunitaire via des récepteurs TLR (de Moreno de Leblanc et Perdigon, 2010). Le groupe de Laitinen (2009) a observé des effets prononcés des probiotiques sur la réduction du glucose et l'attribuait à des propriétés immunorégulatrices. D'autres études suggèrent que la consommation de probiotiques a diminué les marqueurs inflammatoires, y compris l'IL-6 et le TNF- α (Mohamadshahi *et al.*, 2014).

3. Bilan lipidique

Le diabète sucré est associé avec une hyperlipidémie et provoque de profondes anomalies dans la concentration et la composition des lipides. Ces anomalies représentent un important facteur de risque de maladies cardiovasculaires (Hobbs, 2006 ; Jeppesen *et al.*, 2003). L'élévation des lipides sériques chez les rats rendus diabétiques par STZ joue un rôle important dans la pathologie du diabète (Sharma *et al.*, 2008). Dans nos conditions expérimentales, on a enregistré une augmentation du cholestérol, des triglycérides et aussi de LDL-CHL, contre de

faibles niveaux de HDL-CHL chez les rats du groupe TD, comparé au groupe TND. Les résultats de notre expérimentation montrent aussi que le groupe des rats TD représentent les valeurs de l'indice athérogénique, l'indice de risque coronarien et l'indice de risque cardiovasculaire, supérieure à celui de groupe TND. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Ahmadvand et *al.*, (2014) et (Erejuwa et *al.*, 2016), où ils suggèrent que les rats témoins diabétiques avaient des niveaux sériques des lipides élevés (TC, TG, LDL-CHL). En effet, Betteridge (1997) indique que cette augmentation des lipides sériques est principalement due à l'augmentation de la mobilisation des acides gras à partir du tissu adipeux. Puisque l'insuline a une action inhibitrice sur la HMG-COA réductase (3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl coenzyme A réductase), l'enzyme clé dans la biosynthèse du cholestérol. L'accumulation de ces lipoprotéines et les TG est impliquée dans de nombreux troubles vasculaires. Le LDL-CHL est un facteur de risque indépendant de développement des maladies coronariennes (Keevil et *al.*, 2007). Les TG, contrairement au LDL-CHL, ne sont pas directement athérogènes, mais c'est un facteur de risque important pour le développement de maladies cardiovasculaires (Erejuwa et *al.*, 2016).

Les résultats obtenus révèlent aussi que l'administration de BBG aux rats diabétiques a nettement réduit le taux du TC, les TG, LDL-CHL avec une augmentation significative de la concentration sérique de l'HDL-CHL comparé au lot TD. D'autre part nous avons constaté aussi que l'indice athérogénique, indice de risque coronarien et l'indice de risque cardiovasculaire est significativement réduit chez les rats traités par le BBG. Il existe de nombreuses études sur l'effet des BG sur le taux de cholestérol sanguin sur plusieurs espèces ce qui est en accord avec notre résultat. Bilal et *al.* (2012) a rapporté que le BBG a diminué les niveaux de TC et LDL-CHL tout en augmentant celui du HDL-CHL chez les rats, associée à la réduction des facteurs de risque d'obésité et des MCV. Kalra et Jood (2000) ont rapporté également que trois cultivars d'orge contenant 6.23, 4.60, 2.18% de BBG totaux et 5.39, 2.06, 1.08% de BBG soluble ont diminué les niveaux du TC et de LDL-CHL et augmenté celui du HDL-CHL chez les rats et les deux diminutions sont significativement corrélées avec la teneur en BBG. En outre, Dhewantara (2016) a réalisé une étude sur des rats hypercholestérolémiques, il a confirmé la diminution des niveaux de TC, de TG et LDL-CHL et l'augmentation du taux de l'HDL-CHL chez les rats traités par des BG isolés de *Saccharomyces cerevisiae* pendant 30 jours.

Le mécanisme des BG pour abaisser le taux du LDL-CHL est basé sur la propriété des BG de se lier avec les acides biliaries. Par conséquent, les BG augmentent l'élimination des

acides biliaires (Lia et *al.*, 1995), ce qui active la néosynthèse des acides biliaires à partir du cholestérol dans les hépatocytes (Nilsson et *al.*, 2007). Butt et son équipe (2008) ont indiqué que les avantages des BG sont liés à leur viscosité élevée à très faible concentration (1%) et leur stabilité à différents pH. Le même mécanisme peut être valable pour notre étude présentant des résultats similaires, qui sont en concordance avec les expériences précédentes mentionnées ci-dessus, dans l'effet du BBG sur la réduction du cholestérol dans le sang.

Comme le groupe de BBG, nous avons constaté également chez le lot diabétique traité par les bactéries lactiques (LAB) qu'il y a une diminution de lipides sérique (TC, LDL-CHL, TG) et augmentation de l'HDL-CHL, comparés au groupe TD. Parallèlement nos résultats suggèrent que l'IA, l'IRC et l'IRCV sont faible chez le groupe LAB mais pas de la même façon que chez le groupe BBG.

L'effet des LAB sur le métabolisme du cholestérol reste encore controversé. Alors que plusieurs études rapportent que la concentration en cholestérol sérique diminue pendant la consommation de grandes quantités de produits laitiers. Dans une étude *in vivo* par Grunewald (1982), il a observé une forte réduction du taux de cholestérol chez les rats nourris au lait fermenté par des probiotiques, indiquant que le taux de cholestérol dans le sérum peut être réduit par la consommation de probiotiques. Une autre étude menée sur des souris avec un taux élevé de cholestérol a démontré que le *Lactobacillus reuteri* a réussi à réduire les TG sanguins de 38% et le cholestérol de 40% et a augmenté le rapport cholestérol HDL/LDL de 20% et réduit donc le risque des maladies cardiovasculaires (Taranto et *al.*, 1998). Des résultats similaires ont été observés par El-Gawad et *al.* (2005) dans une étude sur des rats nourris avec du yaourt contenant *Bifidobacterium lactis* ou *Bifidobacterium longum*.

Des études antérieures *in vitro* ont évalué un certain nombre de mécanismes proposés pour les effets abaissant le cholestérol par des probiotiques. L'un des mécanismes prétendus comprend la déconjugaison enzymatique des acides biliaires, Alors que certaines LAB des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* possèdent une activité hydrolase intracellulaire. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des acides biliaires conjugués pour donner des acides biliaires libres et les acides aminés correspondants (Corzo et Gilliland, 1999). Une fois les acides biliaires déconjugés sont moins solubles seront par la suite absorbés par les intestins, conduisant à leur élimination dans les selles. Le cholestérol est utilisé pour synthétiser de nouveaux acides biliaires dans une réponse homéostatique, entraînant une diminution du cholestérol sérique (Begley et *al.*, 2006).

Dans une étude faite par Schaafsma et son équipe (1998), randomisée, contrôlée par placebo, sur des hommes à cholestérolémie normale, une combinaison de probiotique *Lactobacillus acidophilus* en supplémentation avec le prébiotique fructo-oligosaccharide (FOS) a considérablement réduit le taux du LDL-CHL, TC et le rapport LDL/HDL. Dans une autre étude sur les hommes et les femmes avec hypercholestérolémie, une réduction significative des LDL-CHL et TC a été observée après une supplémentation pendant 12 semaines d'une association de *Lactobacillus acidophilus* plus l'inuline comme prébiotique (Ooi et al., 2010). Il est intéressant de noter que les résultats de la combinaison symbiotique utilisée dans cette étude surtout pour la réduction du LDL-CHL et TC donnent des résultats encourageants sans aucune preuve statistique, plaidant davantage sur l'influence positive du BBG en association avec les 3 souches sur les profils lipidiques. Très récemment, DiRienzo (2014) dans une étude clinique a conclu que les probiotiques ou les symbioses peuvent être exploités comme une recommandation viable pour des options alimentaires thérapeutiques pour de meilleurs profils lipidiques et santé cardiovasculaire.

Des études *in vitro* ont montré que le propionate (résultats de la fermentation du BBG par les bactéries lactiques), en particulier, module le métabolisme du cholestérol en inhibant les activités enzymatiques des deux enzymes hépatiques ; HMG-CoA-synthase et de la HMG-CoA-réductase. En conséquence, l'administration du propionate a conduit à une réduction de la synthèse du cholestérol dans le foie des rats (den Besten et al., 2013). De plus, il existe des preuves que les SCFA diminuent l'appétit (Chambers et al., 2015). La régulation du métabolisme du glucose et des lipides est donc étroitement liée à la régulation de l'appétit et de la satiété par les SCFA formés dans l'intestin.

4. Bilan hépatique

Des résultats actuels montrent que l'injection de STZ induit un dommage hépatocellulaire, ce qui constitue un autre changement caractéristique du diabète, comme le prouvent les niveaux sériques élevés d'ASAT et d'ALAT dans le groupe diabétique non traité. Ces augmentations peuvent être attribuables à une fuite de ces enzymes hépatiques dans la circulation sanguine et/ou la modification de la perméabilité de la membrane cellulaire des hépatocytes prend place (Dashinamzhilov et al., 1997). Bien que les β -glucanes aient montré des effets thérapeutiques différents, les recherches visant à fournir des preuves de son potentiel hépatoprotecteur sont insuffisantes car il s'agit d'un domaine d'étude récente. Dans cette étude, les valeurs des enzymes hépatiques (ASAT et ALAT) sont diminuées dans les différents groupes traités sans significativité statistique décelée, ces résultats montrent ainsi un effet hépatoprotecteur du BBG

et LAB ainsi que leur combinaison contre les effets néfastes de STZ ainsi que les atteintes hépatiques causées par les complications du diabète. Ces résultats corroborent ceux d'une équipe turque qui a travaillé sur l'effet des β -glucanes sur les dommages hépatiques causés par la jaunisse obstructive (Erkol et al., 2011). D'autres études ont montré l'effet protecteur des β -glucanes contre le stéatose hépatique non alcoolique (Aoki et al., 2015 ; Xin-Zhong et al., 2015). Une étude réalisée par Neyrinck et al. (2007) sur des rats Wistar injectés par une dose des LPS, les rats traités par la laminarine (β -glucanes marines fermentés) avaient des symptômes moins prononcés que les non traités, avec des taux faibles de l'ALAT et l'ASAT. L'effet hépatoprotecteur du β -glucanes pourrait être lié à ses propriétés immunomodulatrices, suggérant qu'un recrutement plus faible des cellules inflammatoires dans le foie et une sécrétion plus faible des médiateurs inflammatoires jouent un rôle important dans les effets hépatoprotecteur. Ainsi, ces effets pourraient être attribués à un effet direct des β -glucanes sur les cellules immunitaires ou à un effet indirect par ses propriétés de fibres alimentaires (Madrigal-Santillán et al., 2014).

5. Paramètres de la fonction rénale

L'hyperglycémie provoquée par le diabète est impliquée dans l'initiation et le développement de divers types de complications diabétiques. La néphropathie est l'une de ces complications microvasculaires graves qui sont observées chez les diabétiques (Engelgau et al., 2003). De plus, les concentrations sériques de l'urée et de la créatinine ont augmenté chez les diabétiques non contrôlés et cette augmentation pourrait être due à une altération de la fonction rénale causée par l'hyperglycémie. Dans notre étude, des taux élevés d'urée et de créatinine sont observés chez les rats diabétiques non traités, confirmant ainsi une dysfonction rénale. Après 28 jours, nous avons constaté une diminution significative des concentrations sériques de l'urée et de la créatinine après l'administration de différents traitements. Des résultats similaires sont obtenus lorsque la metformine a été administrée par voie orale chez des rats diabétiques induits par l'Alloxane (Irshaid et al., 2012). Ainsi, la réduction des taux d'urée et de créatinine peut probablement s'expliquer par une réduction du taux de glucose dans le sang.

6. Les protéines sériques

Il est rapporté que l'hyperglycémie entraîne une augmentation de la production de protéines de la matrice glomérulaire, où leur accumulation diminue la surface de filtration conduisant à une diminution du taux de filtration glomérulaire (Falk et al., 1983 ; Nerlich et Schleicher, 1991). Dans cette étude, nous avons constaté une hypoprotéïnémie et une hypoalbuminémie chez le groupe TD, nous avons également démontré que l'administration des

différents traitements pendant 04 semaines améliorait significativement les taux de ces deux paramètres, ce qui impliquait son action néphroprotectrice. Nous suggérons que les ces traitements améliorent les paramètres de la fonction rénale en vertu de leur activité hypoglycémiant.

7. Dosage du Complément C3

Le système du complément est un élément central de système immunitaire et relie l'immunité innée à l'immunité adaptative. Cependant, il peut également transformer ses capacités destructrices contre les cellules hôtes et est impliqué dans de plusieurs pathologies. La modulation thérapeutique du système du complément humain est considérée comme une approche prometteuse pour traiter un certain nombre de pathologies. En raison de sa position centrale dans la cascade, le composant C3 est une cible particulièrement intéressante pour les médicaments spécifiques au complément (Ricklin et Lambris, 2007, 2008). Les preuves d'un rôle potentiel du complément dans le développement et la pathogenèse des complications du diabète sont confirmées par l'identification des protéines du complément activé dans les organes cibles des complications du diabète (néphropathie diabétique, La rétinopathie diabétique, neuropathie diabétique et les maladie cardiovasculaire induit par le diabète) chez des diabétiques (Falk et *al.*, 1983 ; Rosoklija et *al.*, 2000 ; Zhang et *al.*, 2002). Dans cette étude, le groupe qui a consommé le BBG présente la concentration la plus faible du C3 suivi par le groupe COMB, les deux groupes (LAB et METF) ont presque la même la concentration. Le CD 59 est une molécule extracellulaire membranaire qui a pour but l'inactivation de la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) du système du complément, une hyperglycémie prolongée peut provoquer la glycation non enzymatique du CD59 et lui rendre ainsi une molécule inactive et par conséquent une sensibilité accrue aux phénomènes médiés par MAC dans les cellules/tissus porteurs de CD59 inactivés (Ghosh et *al.*, 2015). Les β -glucanes sont des molécules qui sont connues pour leur propriétés immunomodulateur en plus de son rôle hypoglycémiant pourrait par ces deux mécanismes empêcher l'inactivation indirecte du CD 59. Plusieurs études ont confirmé que la modulation du système du complément avec de petites molécules ou des produits biologiques est maintenant considérée comme une stratégie prometteuse dans la découverte de médicaments tel que le compstatine, inhibiteur peptidique qui inhibe l'étape centrale de la cascade du complément en empêchant le clivage de C3 ; et ARC1905, un inhibiteur C5, aptamère qui inhibe le clivage de C5 en C5a et C5b) (Ricklin et Lambris, 2007, 2013). Sur la base des nombreuses preuves cliniques et expérimentales soutenant un rôle de complément dans la pathogenèse des complications du diabète, il est

concevable que dans le futur, l'inhibition du complément puisse offrir un point d'intervention précoce qui pourrait retarder, prévenir ou même inverser la progression de ces complications.

8. Le rapport Neutrophiles/Lymphocytes (N/L)

Plusieurs études ont montré le rôle de l'inflammation dans le diabète. Le N/L en tant que marqueur est plus fiable aux autres paramètres leucocytaires (par exemple le nombre de neutrophiles, de lymphocytes et de leucocytes totaux) en raison de la stabilité du N/L comparée aux dénombrements absolus qui pourraient être altérés par divers facteurs physiologiques, pathologiques et physiques. De plus, le N/L représente une combinaison de deux marqueurs d'un état inflammatoire chronique incontrôlé (nombre des neutrophiles élevé et des lymphocytes faible). Des études antérieures ont montré l'importance de N/L comme marqueur fiable pour le diagnostic et le pronostic des complications du diabète (néphropathies (Azab et *al.*, 2012), neuropathies (Liu et *al.*, 2017), rétinopathies (Wang et *al.*, 2015) et la résistance à l'insuline (Lou et *al.*, 2015). Les résultats de cette étude montrent une diminution significative du rapport N/L chez les groupes traités par le BBG et COMB, et une diminution non significative chez les groupes LAB et metformine. L'effet exercé par le BBG pourrait être dû à leur rôle dans la physiologie de la réponse immunitaire ainsi que son effet sur la glycémie et par conséquent son effet positif dans la relation inflammation-diabète. L'effet de la metformine est du probablement à son effet sur la glycémie et la résistance à l'insuline. Plusieurs études ont montré l'effet antiinflammatoire des probiotiques (Jones et Versalovic, 2009 ; Kekkonen et *al.*, 2008 ; Rachmilewitz et *al.*, 2004) qui pourrait expliquer la diminution du rapport N/L chez ce groupe.

9. Le dosage du peptide-C

Le dosage du peptide-C est largement utilisée pour l'évaluation de la fonction des cellules bêta pancréatiques pour leur potentiel insulinosécréteur. Il est produit en quantités équimolaires avec l'insuline endogène et est excrété à un taux plus constant sur une plus longue période. Les tests modernes détectent les niveaux de peptide-C qui peuvent être utilisés pour guider le diagnostic et la prise en charge du diabète. Les taux de peptide-C sont associés au type de diabète et à la durée de la maladie. Plus précisément, un taux de peptide-C inférieur à 0.2 nM est associé à un diagnostic de diabète sucré de type 1 (Leighton et *al.*, 2017). Le niveau de peptide-C peut être en corrélation avec les complications microvasculaires et macrovasculaires du diabète (Jones et Hattersley, 2013). Dans cette étude, tous les groupes traités affichent des moyennes supérieures à celle du groupe diabétiques non traités sans significativité statistique.

Cet effet peut être expliqué toujours par leur pouvoir immunomodulateur qui fait réduire les taux des cytokines proinflammatoires et donc permet la restauration de la fonction pancréatique. Les molécules des β -glucanes de différentes sources, dans des études antérieures ont augmenté significativement le taux du peptide-C par rapport aux rats non traités. de Oliveira Silva et son équipe (2015) ont démontré l'augmentation de la concentration du peptide-C des rats diabétiques avec atteinte parodontale, sous l'effet des β -glucanes de *Saccharomyces cerevisiae*. Une autre étude fait par une équipe chinoise sur des rats rendus diabétiques par l'Alloxane, un traitement par les β -glucanes d'avoine pendant 14 jours a pu restaurer la fonction des cellules β et son mécanisme est associé à l'inhibition du gène apoptotique p53 et à l'amélioration de l'expression du gène anti-apoptotique bcl-2 (Wang et al., 2006).

10. La fonction des cellules β et la résistance périphérique à l'insuline

L'hyperglycémie chronique dans le diabète peut entraîner des complications métaboliques, notamment une résistance à l'insuline, une dyslipidémie, une augmentation des marqueurs inflammatoires et la propriété insulinosécréteur des cellules β , qui est connue pour être des caractéristiques physiopathologiques importantes du diabète (Krentz, 2003). Nous avons démontré que la fonction des cellules β est très légèrement restaurés chez les groupes traités, sans significativité statistique, en comparaison avec le groupe diabétique sans traitement. Environ 95% du microbiote intestinal chez les personnes en bonne santé est constitué des espèces appartenant à trois phylums de la bactérie (Bacteroidetes, Firmicutes et Actinobacteria). L'effet observé des probiotiques n'est pas difficile à approuver, compte tenu des données disponibles sur le rôle du microbiote intestinal sain sur le métabolisme glucidique et les relations synergiques des aliments prébiotiques avec le microbiote intestinal (Arumugam et al., 2011 ; Barrett et al., 2012). Une nouvelle théorie suggère que le microbiote intestinal joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique et provoque des maladies métaboliques et une résistance à l'insuline (Moreno-Indias et al., 2014). Il est démontré que le diabète de type 2 est associé à des changements dans le microbiote intestinal. Par exemple, il a été démontré que le rapport Bacteroidetes/Firmicutes est associé au diabète de type 2 (Barrett et al., 2012). Tajadadi-Ebrahimi et son équipe (2014) ont prouvé que la consommation du pain synbiotique diminuait significativement les taux d'insuline sérique, les scores HOMA-IR et HOMA-B, mais n'affectait pas les niveaux du QUICKI ou la CRP par rapport aux pains probiotiques et témoins. Conformément à notre étude, Raso et al. (2014) ont observé une amélioration de nombreux aspects de la résistance à l'insuline, comme la réponse à jeun, l'homéostasie hormonale et le contrôle glycémique, suite à la consommation d'un symbiotique

composé de *L. paracasei* et d'arabinogalactane et de fructo-oligosaccharides. Dans une étude finlandaise, 256 femmes enceintes ont reçu des probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* GG et *Bifidobacterium lactis* Bb12) ou un placebo. Il a été constaté que les taux de glucose sanguin ainsi que les indices HOMA-IR et QUICKI étaient les plus bas dans le groupe recevant les probiotiques concluant qu'un meilleur contrôle de la glycémie pouvait être atteint par un conseil diététique associé aux probiotiques même chez les femmes enceintes à glycémie normale (Laitinen et al., 2009).

Conclusion

L'objectif principal de cette thèse était d'évaluer l'éventuel effet de l'association des β -glucanes de l'orge et des bactéries lactiques isolées du lait de chamelle sur le diabète induit par la STZ chez le rat Wistar et les complications du diabète.

La première partie de la thèse est consacrée à l'extraction des BBG à partir d'une variété locale de l'orge (SAIDA). Le rendement de l'extraction était de 4.99 % du poids de la farine de l'orge et de 79.29 % par rapport à la quantité des β -glucanes totale, les conditions initiales fixées pour l'extraction des β -glucanes de l'orge avec de l'eau (55°C, pH 7 et rapport 1/10) permettent d'obtenir des meilleurs rendements d'extraction. La teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes des BBG est de 76.47 ± 2.10 μg GAE/mg et 47.06 ± 2.12 μg QE/mg d'extrait sec respectivement. Le BBG présente un pouvoir antioxydant dose dépendante faible par rapport aux standards utilisés, en appliquant les tests suivant : DPPH, ABTS, CUPRAC, blanchiment de bêta-carotène, superoxyde DMSO alcalin et piégeage du radical hydroxyle. L'activité enzymatique des cholinestérases et l'alpha-glucosidase est faiblement inhibée par le BBG en comparant avec les standards.

La caractérisation et la détermination des propriétés probiotiques des bactéries lactiques isolées du lait de chamelle présent l'un des objectifs de cette étude. Après isolement des LAB, des caractérisations phénotypique (examen microscopique et macroscopique), la coloration de Gram, test de catalase, croissance à différentes températures ont été appliqués. Pour déterminer les propriétés probiotiques, différents tests ont été appliqués tels que la résistance au pH acide et aux sels biliaires, l'activité antimicrobienne et les tests de résistance aux antibiotiques. Après la détermination des isolats probiotiques potentiels, ceux-ci ont été caractérisés en utilisant les galerie API 50 CH. Enfin, seulement 3 d'entre elles ont montré une résistance au pH acide, une tolérance aux sels biliaires, une activité antimicrobienne et une sensibilité aux antibiotiques.

Afin d'étudier l'effet de l'association des bêta-glucanes de l'orge avec des bactéries lactiques isolées du lait de chamelle sur le diabète *in vivo*, des rats Wistar non diabétiques et des rats rendus diabétiques, par l'administration de streptozotocine (60 mg/kg) ont été utilisés dans cette étude. Les rats ont suivi un traitement à base de BBG, des bactéries lactiques ou les deux ensembles pendant 28 jours. L'étude porte sur les changements du comportement, la glycémie, HBA1c, l'évolution pondérale, le poids relatif de certains organes, et enfin le dosage des différents paramètres biochimiques et lipidiques.

Les résultats obtenus montrent que chez le groupe traité par le BBG, l'hyperglycémie a diminuée au cours de l'expérimentation pour retrouver une moyenne finale de 2.17 g/L au bout de 4 semaines. Le bilan lipidique de ce groupe est positivement affecté par le traitement par le BBG en augmentant le taux de l'HDL-CHL tout en diminuant celui du cholestérol total et de LDL-CHL ainsi que les triglycérides et par conséquent la diminution de l'indice athérogénique et des maladies coronariennes. Les paramètres hépatiques (l'ALAT et ASAT) ne sont pas affectés par les BBG. Un effet immunomodulateur du BBG est observé par la diminution significative de la concentration du complément-C3 et du rapport N/L chez les rats. Aucun effet de BBG n'est observé sur la fonction des cellules bêta pancréatiques qui se traduit par aucune augmentation dans la concentration sérique du peptide-C.

La glycémie du groupe traité par les LAB est nettement diminuée par rapport au groupe témoin pour atteindre une valeur de 2.24 g/L à la fin de l'expérimentation, cette diminution se traduit aussi par une diminution dans le taux de l'HbA1c sans différence significative. Tous les paramètres lipidiques et rénaux sont positivement affectés par l'administration des LAB aux rats diabétiques. Toutefois, la consommation des LAB n'a aucun effet significatif sur les enzymes hépatiques, le peptide-C ainsi que les paramètres immunologiques.

L'administration concomitante de BBG et des LAB aux rats diabétiques présente certains avantages par rapport à l'administration de BBG ou LAB seul sans aucune significativité statistique décelée ; La moyenne de la glycémie de ce groupe est diminuée au cours de cette étude jusqu'à une valeur de 2.09 g/L au bout de 28 jours, un effet positif remarquable sur les paramètres lipidiques et rénaux et une diminution significative de la concentration du complément-C3 et le rapport N/L est observée chez ce groupe sans aucun effet remarquable sur le taux du peptide-C et par conséquent la fonction des cellules bêta du pancréas.

En définitive, ce travail a contribué à défricher une partie des effets de l'administration de BBG et des bactéries lactiques isolées de lait de chamelle seuls ou en association sur la physiologie des rats diabétiques. Par conséquent, certaines études futures approfondies devraient être effectuées telles que :

- Identification, caractérisation de bêta- glucane de l'orge.
- Pour les bactéries lactiques isolées : 1) Il sera bénéfique de les identifier par des techniques de biologie moléculaire 2) caractériser profondément leur propriété probiotique (résistance aux enzymes de tractus gastro-intestinal, adhésion à la surface de la muqueuse

intestinale, études cliniques sur la santé humaine et propriétés technologiques « stabilité des souches et résistance aux bactériophages »).

- Pour l'étude *in vivo* il serait intéressant de 1) Evaluer les paramètres du stress oxydatif (dosage de la Catalase, Peroxydases, SOD, MDN) 2) étudier les mécanismes moléculaires intimes par lesquels le BBG et les LAB agiraient sur le diabète.

CONCLUSION

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, R. D., Wilson, P. W., Kannel, W. B., and Castelli, W. P. (1988). High density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening, and myocardial infarction. The Framingham Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 8, 207-211.
- Adrian, J., Potus, J., Poiffat, A., and Dauvillier, P. (1998). Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires.
- Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., and Ahmed, Z. (2010). Extraction and characterization of β -d-glucan from oat for industrial utilization. *International journal of biological macromolecules* 46, 304-309.
- Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., and Din, A. (2009). Physicochemical and functional properties of barley β -glucan as affected by different extraction procedures. *International journal of food science & technology* 44, 181-187.
- Ahmadvand, H., Noori, A., Dehnoo, M. G., Bagheri, S., and Cheraghi, R. A. (2014). Hypoglycemic, hypolipidemic and antiatherogenic effects of oleuropein in alloxan-induced Type 1 diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4, S421-S425.
- Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Mehrabi, M., Jamshidi, S., Farhangi, A., Verdi, A. A., Mofidian, S., and Rad, B. L. (2007). Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22, 60-64.
- Alladi, S., and Radha Shanmugasundaram, K. (1989). Induction of hypercholesterolemia by supplementing soy protein with acetate generating amino acids. *Nutrition reports international* 40, 893-900.
- Amaretti, A., di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., and Bordoni, A. (2013). Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Applied microbiology and biotechnology* 97(2):809–17.
- Anastasi, E., Di Segni, C., Tudini, S., Gennarini, G., and Angeloni, A. (2016). Evaluation of an Automated CLIA System for the Determination of Carbohydrate Antigen 19-9. *Anticancer research* 36, 5281-5285.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., and Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition reviews* 67, 188-205.
- Aoki, S., Iwai, A., Kawata, K., Muramatsu, D., Uchiyama, H., Okabe, M., Ikesue, M., Maeda, N., and Uede, T. (2015). Oral administration of the *Aureobasidium pullulans*-derived β -glucan effectively prevents the development of high fat diet-induced fatty liver in mice. *Scientific reports* 5, 10457.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 7970-7981.
- Appleby, P., Thorogood, M., Mann, J., and Key, T. (1998). Low body mass index in non-meat eaters: the possible roles of animal fat, dietary fibre and alcohol. *International journal of obesity* 22, 454.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., and Batto, J.-M. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *nature* 473, 174.
- Ashraf, R., and Shah, N.P. (2011). Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. *International Food Research Journal* 18(3): 837-853.

- Atlan, D., Béal, C., and Champomier-Vergès, M. (2008). *Métabolisme et ingénierie métabolique. Bactéries Lactiques—De la génétique aux ferments*, 271-509.
- Atlas, I. D. (2013). Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2013. International Diabetes Federation (IDF) 6^e edition.
- Atlas, I. D. (2017). Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2017. International Diabetes Federation (IDF) 8^e edition.
- Axelsson, L. (2004). "Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology."
- Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M.C., Bover-Cid, S., and Hugas, M. (2006). Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 100: 40-49.
- Azab, B., Daoud, J., Naeem, F. B., Nasr, R., Ross, J., Ghimire, P., Siddiqui, A., Azzi, N., Rihana, N., and Abdallah, M. (2012). Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of worsening renal function in diabetic patients (3-year follow-up study). *Renal failure* 34, 571-576.
- Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, D., and Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology* 21, 579-588.
- Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., and Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales " arabia et kabyle". *Sciences & Technologie C*, 30-37.
- Bae, I. Y., and Lee, H. G. (2014). In vitro starch digestion and cake quality: impact of the ratio of soluble and insoluble dietary fiber. *International journal of biological macromolecules* 63, 98-103.
- Bantle, J. P., Wylie-Rosett, J., Albright, A. L., Apovian, C. M., Clark, N. G., Franz, M. J., Hoogwerf, B. J., Lichtenstein, A. H., Mayer-Davis, E., and Mooradian, A. D. (2008). Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes care* 31, S61-S78.
- Baranyi, J., and Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International journal of food microbiology* 23, 277-294.
- Barrett, A. M., Lucero, M. A., Le, T., Robinson, R. L., Dworkin, R. H., and Chappell, A. S. (2007). Epidemiology, public health burden, and treatment of diabetic peripheral neuropathic pain: a review. *Pain medicine* 8.
- Barrett, H. L., Callaway, L. K., and Nitert, M. D. (2012). Probiotics: a potential role in the prevention of gestational diabetes? *Acta diabetologica* 49, 1-13.
- Begley, M., Hill, C., and Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and environmental microbiology* 72, 1729-1738.
- Behall, K. M., Scholfield, D. J., and Hallfrisch, J. G. (2006). Barley β -glucan reduces plasma glucose and insulin responses compared with resistant starch in men. *Nutrition Research* 26, 644-650.
- Bekir, J., Mars, M., Souchard, J. P., and Bouajila, J. (2013). Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food and chemical toxicology* 55, 470-475.
- Bell, R. H., and Hye, R. J. (1983). Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *Journal of surgical Research* 35, 433-460.

- Bell, S., Goldman, V. M., Bistran, B. R., Arnold, A. H., Ostroff, G., and Forse, R. A. (1999). Effect of β -glucan from oats and yeast on serum lipids. *Critical reviews in food science and nutrition* 39, 189-202.
- Bellamy, L., Casas, J.-P., Hingorani, A. D., and Williams, D. (2009). Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet* 373, 1773-1779.
- Betteridge, J. (1997). Lipid disorders in diabetes mellitus. *Textbook of diabetes* 31, 1-55.
- Bill, J., Catimel, B., Bannerman, E., Jacquet, C., Yersin, M.N., Caniaux, I., et al. (1992). API Listeria a new and promising one-day system to identify Listeria isolates. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 58: 1857-1860.
- Botes, M., van Reenen, C. A., and Dicks, L. M. (2008). Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastro-intestinal model with infant milk formulations as substrate. *International journal of food microbiology* 128, 362-370.
- Bourne, M. (2002). "Food texture and viscosity: concept and measurement," Elsevier.
- Brand-Miller, J., Hayne, S., Petocz, P., and Colagiuri, S. (2003). Low-glycemic index diets in the management of diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes care* 26, 2261-2267.
- Brennan, C. S., and Cleary, L. J. (2005). The potential use of cereal (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)- β -D-glucans as functional food ingredients. *Journal of cereal Science* 42, 1-13.
- Brigidi, P., Vitali, B., Swennen, E., Bazzocchi, G., and Matteuzzi, D. (2001). Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Research in microbiology* 152, 735-741.
- Brockman, D. A., Chen, X., and Gallaher, D. D. (2013). Consumption of a high β -glucan barley flour improves glucose control and fatty liver and increases muscle acylcarnitines in the Zucker diabetic fatty rat. *European journal of nutrition* 52, 1743-1753.
- Brown, G. D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews Immunology* 6, 33.
- Burkus, Z., and Temelli, F. (2005). Rheological properties of barley β -glucan. *Carbohydrate polymers* 59, 459-465.
- Burns, A.J., and Rowland, I.R. (2000). Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 1(1): 13-24.
- Burns, P., Vinderola, G., Binetti, A., Quiberoni, A., de Los Reyes-Gavilan, C., and Reinheimer, J. (2008). Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *International Dairy Journal* 18, 377-385.
- Burton, R. A., and Fincher, G. B. (2009). (1, 3; 1, 4)- β -d-Glucans in cell walls of the Poaceae, lower plants, and fungi: a tale of two linkages. *Molecular Plant* 2, 873-882.
- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Khan, M. K. I., Shabir, R., and Butt, M. S. (2008). Oat: unique among the cereals. *European journal of nutrition* 47, 68-79.
- Cameron-Smith, D., Collier, G., and O'dea, K. (1994). Effect of soluble dietary fibre on the viscosity of gastrointestinal contents and the acute glycaemic response in the rat. *British Journal of Nutrition* 71, 563-571.

- Cani, P. D., Osto, M., Geurts, L., and Everard, A. (2012). Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut microbes* 3, 279-288.
- Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Smiderle, F. R., Rosado, F. R., Sasaki, G. L., Gorin, P. A., and Iacomini, M. (2006). A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydrate Polymers* 66, 252-257.
- Carr, F. J., Chill, D., and Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology* 28, 281-370.
- Cavallero, A., Empilli, S., Brighenti, F., and Stanca, A. (2002). High (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)- β -glucan barley fractions in bread making and their effects on human glycemic response. *Journal of Cereal Science* 36, 59-66.
- Chakib, M. (2011). Prévalence du diabète en Algérie : La valse des chiffres. *Santé-mag*, Décembre 2011. p.31.
- Chambers, E. S., Morrison, D. J., and Frost, G. (2015). Control of appetite and energy intake by SCFA: what are the potential underlying mechanisms? *Proceedings of the Nutrition Society* 74, 328-336.
- Chan, G. C.F., Chan, W. K., and Sze, D. M.-Y. (2009). The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of hematology & oncology* 2, 25.
- Chang, S. T., Wu, J.-H., Wang, S.-Y., Kang, P.-L., Yang, N.-S., and Shyur, L.-F. (2001). Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3420-3424.
- Chapman, C. M., Gibson, G. R., and Rowland, I. (2011). Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *European journal of nutrition* 50(1):1-17.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., and Collins, J.K. (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology* 35(1): 1- 27.
- Chaudhary, V., Gupta, S., Gupta, P., and Prasad, S. (2017). Serum vitamin-D level among type 2 diabetes mellitus subjects in mullana, haryana. *International Education and Research Journal* 3.
- Chen, J., and Raymond, K. (2008). Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. *Vascular health and risk management* 4, 1265.
- Chen, J., and Seviour, R. (2007). Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-glucans. *Mycological research* 111, 635-652.
- Choi, J. S., Kim, H., Jung, M. H., Hong, S., and Song, J. (2010). Consumption of barley β -glucan ameliorates fatty liver and insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Molecular nutrition & food research* 54, 1004-1013.
- Choi, J. S., Kim, H., Jung, M. H., Hong, S., and Song, J. (2010). Consumption of barley β -glucan ameliorates fatty liver and insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Molecular nutrition & food research* 54, 1004-1013.
- Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American journal of clinical nutrition* 71, 621s-629s.
- Chung, H., Kim, Y., Chun, S., and Ji, G. E. (1999). Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. *International journal of food microbiology* 47, 25-32.

- Chutkan, R., Fahey, G., Wright, W. L., and McRorie, J. (2012). Viscous versus nonviscous soluble fiber supplements: Mechanisms and evidence for fiber-specific health benefits. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners* 24, 476-487.
- Clark, M. J., and Slavin, J. L. (2013). The effect of fiber on satiety and food intake: a systematic review. *Journal of the American College of Nutrition* 32, 200-211.
- Collar, C., and Angioloni, A. (2014). Nutritional and functional performance of high β -glucan barley flours in breadmaking: mixed breads versus wheat breads. *European Food Research and Technology* 238, 459-469.
- Collart, F. (2003). Insuffisance rénale, protéinurie et néphropathie diabétique. *Revue médicale de Bruxelles* 24, A257-A262.
- Comité d'experts en diabétologie. (2015). Guide de bonnes pratiques en diabétologie à l'usage des praticiens. MSPRH, Alger, Algérie, 120p.
- Corzo, G., and Gilliland, S. (1999). Bile Salt Hydrolase Activity of Three Strains of *Lactobacillus acidophilus* 1. *Journal of Dairy Science* 82, 472-480.
- Corzo, G., and Gilliland, S.E (1999). Measurement of bile salt hydrolase activity from *Lactobacillus acidophilus* based on disappearance of conjugated bile salts. *Journal of Dairy Science* 82: 466-471.
- Dailey, G., and Wang, E. (2014). A review of cardiovascular outcomes in the treatment of people with type 2 diabetes. *Diabetes Therapy* 5, 385-402.
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., Biavati, B. (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *Int J Food Microbiol* 115(1):35-42.
- Daneman, D. (2006). Type 1 diabetes. *The Lancet* 367, 847-858.
- Dashinamzhilov, Z., Azhunova, T., Lonshakova, K., and Nikolayev, S. (1997). The effect of the complex plant preparation polyphytochol on the course of alcoholic hepatitis. *Rastitel'nye Resursy* 33, 64-68.
- Das, D., Baruah, R., Goyal, A. (2014). A food additive with prebiotic properties of an α -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *Int J Biol Macromol* 69:20-6.
- Davies, M., Brophy, S., Williams, R., and Taylor, A. (2006). The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes. *Diabetes care* 29, 1518-1522.
- de Moreno de Leblanc, A., Perdigon, G. (2010). The application of probiotic fermented milks in cancer and intestinal inflammation. *The Proceedings of the Nutrition Society* 69(3):421-8.
- de Oliveira Silva, V., Lobato, R. V., Andrade, E. F., de Macedo, C. G., Napimoga, J. T. C., Napimoga, M. H., Messoria, M. R., Murata, R. M., and Pereira, L. J. (2015). β -Glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) reduce glucose levels and attenuate alveolar bone loss in diabetic rats with periodontal disease. *PLoS one* 10, e0134742.
- De Vrese, M., and Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. In "Food biotechnology", pp. 1-66. Springer.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., and Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research* 54, 2325-2340.

- Deng, C., Hu, Z., Fu, H., Hu, M., Xu, X., and Chen, J. (2012). Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of a β -d-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*. *International journal of biological macromolecules* 51, 70-75.
- Denham, E., Mohn, B., Tucker, L., Lun, A., Cleave, P., and Boswell, D. R. (2007). Evaluation of immunoturbidimetric specific protein methods using the Architect ci8200: comparison with immunonephelometry. *Annals of clinical biochemistry* 44, 529-536.
- Devendra, D., Liu, E., and Eisenbarth, G. S. (2004). Type 1 diabetes: recent developments. *British Medical Journal* 328, 750.
- Dhewantara, F. (2016). Cholesterol-Lowering Effect of Beta Glucan Extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in Rats. *Scientia pharmaceutica* 84, 153-165.
- Dikeman, C. L., and Fahey Jr, G. C. (2006). Viscosity as related to dietary fiber: a review. *Critical reviews in food science and nutrition* 46, 649-663.
- DiRienzo, D. B. (2014). Effect of probiotics on biomarkers of cardiovascular disease: implications for heart-healthy diets. *Nutrition reviews* 72, 18-29.
- Dong, J., Cai, F., Shen, R., and Liu, Y. (2011). Hypoglycaemic effects and inhibitory effect on intestinal disaccharidases of oat beta-glucan in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food chemistry* 129, 1066-1071.
- Dongowski, G., Huth, M., Gebhardt, E., and Flamme, W. (2002). Dietary fiber-rich barley products beneficially affect the intestinal tract of rats. *The Journal of nutrition* 132, 3704-3714.
- Doublier, J.-L., and Wood, P. J. (1995). Rheological Properties of Aqueous Solutions of (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)-bD-Glucan from Oats (*Avena sativa* L.). *Cereal chemistry* 72, 335-340.
- Du, B., Bian, Z.-X., and Xu, B. (2014). "Skin Health Promotion Effects of Natural Beta-Glucan Derived from Cereals and Microorganisms: A Review."
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., and Morrissey, D. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vitro findings. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 386-392.
- El-Amine Bendaha, M., Mebrek, S., Naimi, M., Tifrit, A., Belaoui, H., and Abbouni, B. (2012). Isolation and comparison of rhamnolipids production in *Pseudomonas aeruginosa* PB: 2 and *Pseudomonas fluorescens* PV: 10. *Sci Rep* 1, 544.
- El-Gawad, I. A. A., El-Sayed, E., Hafez, S., El-Zeini, H., and Saleh, F. (2005). The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. *International Dairy Journal* 15, 37-44.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology* 7, 881-905.
- Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R., and Lenzen, S. (2000). Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43, 1528-1533.
- Engelgau, M. M., Narayan, K. V., Saaddine, J. B., and Vinicor, F. (2003). Addressing the burden of diabetes in the 21st century: better care and primary prevention. *Journal of the American Society of Nephrology* 14, S88-S91.

- English, P., and Williams, G. (2004). Hyperglycaemic crises and lactic acidosis in diabetes mellitus. *Postgraduate medical journal* 80, 253-261.
- Erejuwa, O. O., Nwobodo, N. N., Akpan, J. L., Okorie, U. A., Ezeonu, C. T., Ezeokpo, B. C., Nwadike, K. I., Erhiano, E., Abdul Wahab, M. S., and Sulaiman, S. A. (2016). Nigerian honey ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in alloxan-induced diabetic rats. *Nutrients* 8, 95.
- Erkkilä, A. T., and Lichtenstein, A. H. (2006). Fiber and cardiovascular disease risk: how strong is the evidence? *Journal of Cardiovascular Nursing* 21, 3-8.
- Erkol, H., Kahramansoy, N., Kordon, Ö., Büyükaşık, O., Serin, E., and Ulaş, N. (2011). Effects of beta-glucan on hepatic damage caused by obstructive jaundice.
- Falk, R. J., Scheinman, J. I., Mauer, S. M., and Michael, A. F. (1983). Polyantigenic expansion of basement membrane constituents in diabetic nephropathy. *Diabetes* 32, 34-39.
- Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S. I., and Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis* 24, 1043-1048.
- Fowler, M. J. (2011). Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical Diabetes* 29, 116-122.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I., and Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry* 18, 499-502.
- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M., Sánchez-Zapata, E., and Pérez-Álvarez, J. (2010). Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International* 43, 931-942.
- Gæde, P., Vedel, P., Larsen, N., Jensen, G. V., Parving, H.-H., and Pedersen, O. (2003). Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine* 348, 383-393.
- Gao, R., Wang, Y., Wu, Z., Ming, J., and Zhao, G. (2012). Interaction of Barley β -Glucan and Tea Polyphenols on Glucose Metabolism in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of food science* 77.
- Gardiner, T. (2000). β -glucan biological activities: A review. *Glycoscience and Nutrition* 1, 1-6.
- Ghosh, P., Sahoo, R., Vaidya, A., Chorev, M., and Halperin, J. A. (2015). Role of complement and complement regulatory proteins in the complications of diabetes. *Endocrine reviews* 36, 272-288.
- Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition* 125, 1401-1412.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., and Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition research reviews* 17, 259-275.
- Giese, E. C., Gascon, J., Anzelmo, G., Barbosa, A. M., da Cunha, M. A. A., and Dekker, R. F. (2015). Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. *International journal of biological macromolecules* 72, 125-130.
- Gomes, A. C. and Bueno, A. A. Machado de Souza, R. G., and Mota, J. F. (2014). Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutrition Journal* 13:60.

- Gómez, M., Moraleja, A., Oliete, B., Ruiz, E., and Caballero, P. A. (2010). Effect of fibre size on the quality of fibre-enriched layer cakes. *LWT-Food Science and Technology* 43, 33-38.
- Goodridge, H. S., Wolf, A. J., and Underhill, D. M. (2009). β -glucan recognition by the innate immune system. *Immunological reviews* 230, 38-50.
- Greaves, R. F., Northfield, J.-A. T., and Cameron, F. J. (2005). Haemoglobin A1c: evaluation of three point of care analysers for use in a paediatric diabetes clinic. *Annals of clinical biochemistry* 42, 124-129.
- Grunewald, K. (1982). Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Science* 47, 2078-2079.
- Guillon, F., and Champ, M. (2000). Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Research International* 33, 233-245.
- Gunness, P., and Gidley, M. J. (2010). Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food & function* 1, 149-155.
- Hafsa, M. B., Ismail, M. B., Garrab, M., Aly, R., Gagnon, J., and Naghmouchi, K. (2017). Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and anticholinesterase activities of water-soluble polysaccharides extracted from microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Serb. Chem. Soc.*
- Haghshenas, M., Hosseini, H., Nayebzadeh, K., Kakesh, B. S., Mahmoudzadeh, M., and Fonood, R. K. (2015). Effect of beta glucan and carboxymethyl cellulose on lipid oxidation and fatty acid composition of pre-cooked shrimp nugget during storage. *LWT-Food Science and Technology* 62, 1192-1197.
- Haider, A., Inam, W., Khan, S. A., Mahmood, W., and Abbas, G. (2016). β -glucan attenuated scopolamine induced cognitive impairment via hippocampal acetylcholinesterase inhibition in rats. *Brain research* 1644, 141-148.
- Hallfrisch, J., and Behall, K. M. (2003). Physiological Responses of Men and Women to Barley and Oat Extracts (Nu-trimX). I. Breath Hydrogen, Methane, and Gastrointestinal Symptoms. *Cereal chemistry* 80, 76-79.
- Halliwell, B. (1989). Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. *Free radical in biology and medicine*, 86-123.
- Hammes, W. P., and Hertel, C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In "The prokaryotes", pp. 320-403. Springer.
- Hamon, E., Horvatovich, P., Izquierdo, E., Bringel, F., and Marchionil, E. (2011). Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiology* 11: 63-69.
- Hariri, A., Ouis, N., Sahnouni, F., and Bouhadi, D. (2009). Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. *Rev. microbiol. ind. san et environn.* 37-55.
- Havenaar, R., Brink, B.T., and Huis in't Veld, J. H. J. (1992). Probiotics: Selection of strains for probiotic use. In: Fuller, R. (ed.) *The Scientific Basis*. Chapman and Hall. London, pp. 209-221.
- Hazra, B., Biswas, S., and Mandal, N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC complementary and Alternative Medicine* 8, 63.

- Heenan, C. N., Adams, M. C., Hosken, R. W. and Fleet, G. H. (2002). Growth Medium for Culturing Probiotic Bacteria for Applications in Vegetarian Food Products. *LWT-Food Science and Technology* 35, 171-176.
- Hemant, C., and Harshada, J. (2015). Antagonistic effect of *Lactobacillus* isolates from cow milk on selected pathogenic bacteria. *Research Journal of Recent Sciences* 4: 173-176.
- Henry, R. (1987). Pentosan and (1→3),(1→4)- β -glucan concentrations in endosperm and wholegrain of wheat, barley, oats and rye. *Journal of Cereal Science* 6, 253-258.
- Hiller, G., Sternby, M., Sundler, R., and Wijkander, J. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase in zymosan-and bacteria-induced signalling to mobilisation of arachidonic acid in macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1485, 163-172.
- Hirai, F. E., Tielsch, J. M., Klein, B. E., and Klein, R. (2011). Ten-year change in vision-related quality of life in type 1 diabetes: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 118, 353-358.
- Hobbs, F. R. (2006). Reducing cardiovascular risk in diabetes: beyond glycemic and blood pressure control. *International journal of cardiology* 110, 137-145.
- Hongpattarakere, T., Chertong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., and Rastall, R. A. (2012). In vitro prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers* 87, 846-852.
- Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 1841-1856.
- Hughes, S. A., Shewry, P. R., Gibson, G. R., McCleary, B. V., and Rastall, R. A. (2008). In vitro fermentation of oat and barley derived β -glucans by human faecal microbiota. *FEMS microbiology ecology* 64, 482-493.
- Hulston, C. J., Churnside, A. A., and Venables, M. C. (2015). Probiotic supplementation prevents high-fat, overfeeding-induced insulin resistance in human subjects. *British Journal of Nutrition* 113, 596-602.
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., and Thongnoi, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 261-264.
- Inglett, G. E., Carriere, C. J., Maneepun, S., and Tungtrakul, P. (2004). A soluble fibre gel produced from rice bran and barley flour as a fat replacer in Asian foods. *International journal of food science & technology* 39, 1-10.
- Irshaid, F., Mansi, K., Bani-Khaled, A., and Aburjia, T. (2012). Hepatoprotective, cardioprotective and nephroprotective actions of essential oil extract of *Artemisia sieberi* in alloxan induced diabetic rats. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* 11, 1227.
- Jacob, J. P., and Pescatore, A. J. (2014). Barley β -glucan in poultry diets. *Annals of translational medicine* 2.
- Jeppesen, J., Hein, H. O., Suadicani, P., and Gyntelberg, F. (2003). High triglycerides/low high-density lipoprotein cholesterol, ischemic electrocardiogram changes, and risk of ischemic heart disease. *American heart journal* 145, 103-108.

- Johansson, L., Karesoja, M., Ekholm, P., Virkki, L., and Tenhu, H. (2008). Comparison of the solution properties of (1→3),(1→4)-β-d-glucans extracted from oats and barley. *LWT-Food Science and Technology* 41, 180-184.
- Jones, A., and Hattersley, A. (2013). The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabetic Medicine* 30, 803-817.
- Jones, S. E., and Versalovic, J. (2009). Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC microbiology* 9, 35.
- Juntunen, K. S., Laaksonen, D. E., Autio, K., Niskanen, L. K., Holst, J. J., Savolainen, K. E., Liukkonen, K.-H., Poutanen, K. S., and Mykkänen, H. M. (2003). Structural differences between rye and wheat breads but not total fiber content may explain the lower postprandial insulin response to rye bread. *The American journal of clinical nutrition* 78, 957-964.
- Kahn, S. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia* 46, 3-19.
- Kalra, S., and Jood, S. (2000). Effect of dietary barley β-glucan on cholesterol and lipoprotein fractions in rat. *Journal of Cereal Science* 31, 141-145.
- Kaplan, H., and Hutkins, R.W. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 66: 2682-2684.
- Karaca, T., Yoruk, M., Yoruk, I. H., and Uslu, S. (2010). Effects of extract of green tea and ginseng on pancreatic beta cells and levels of serum glucose, insulin, cholesterol and triglycerides in rats with experimentally streptozotocin-induced diabetes: a histochemical and immunohistochemical study. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9, 102-107.
- Kardono, L. B., Tjahja, I. P., Artanti, N., and Manuel, J. (2013). Isolation, Characterization and α-glucosidase Inhibitory Activity of Crude Beta Glucan from Silver Ear Mushroom (*Tremella fuciformis*). *Journal of Biological Sciences* 13, 406-411.
- Katalinić, M., Rusak, G., Barović, J. D., Šinko, G., Jelić, D., Antolović, R., and Kovarik, Z. (2010). Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *European journal of medicinal chemistry* 45, 186-192.
- Katz, A., Nambi, S. S., Mather, K., Baron, A. D., Follmann, D. A., Sullivan, G., and Quon, M. J. (2000). Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85, 2402-2410.
- Keddari, S., Benaoum, N., Boufadi, Y., Belhocine, M., and Riazi, A. (2016). Antioxidant Activity and in vitro Fermentation of Dietary Fiber Extracts from Durum Wheat Bran. *Journal of Food and Nutrition Research* 4, 508-514.
- Keevil, J. G., Cullen, M. W., Gangnon, R., McBride, P. E., and Stein, J. H. (2007). Implications of cardiac risk and low-density lipoprotein cholesterol distributions in the United States for the diagnosis and treatment of dyslipidemia: data from National Health and Nutrition Examination Survey 1999 to 2002. *Circulation* 115, 1363-1370.
- Kekkonen, R. A., Lummela, N., Karjalainen, H., Latvala, S., Tynkkynen, S., Järvenpää, S., Kautiainen, H., Julkunen, I., Vapaatalo, H., and Korpela, R. (2008). Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World journal of gastroenterology: WJG* 14, 2029.
- Khan, A. A., Gani, A., Masoodi, F., Amin, F., Wani, I. A., Khanday, F. A., and Gani, A. (2016). Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of β-d-glucan extracted

- from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)—Effect of γ -irradiation. *Carbohydrate polymers* 140, 442-450.
- Kiho, T., Morimoto, H., Sakushima, M., Usui, S., and Ukai, S. (1995). Polysaccharides in fungi. XXXV. Anti-diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 18, 1627-1629.
- Kim, D.-O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H.-Y., and Lee, C. Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6509-6515.
- Kimoto-Nira, H., Kobayashi, M., Nomura, M., Sasaki, K., and Suzuki, C. (2009). Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition: analysis by using different growth media. *International journal of food microbiology* 131, 183-188.
- Kitabchi, A. E., Umpierrez, G. E., Murphy, M. B., Barrett, E. J., Kreisberg, R. A., Malone, J. I., and Wall, B. M. (2001). Management of hyperglycemic crises in patients with diabetes. *Diabetes care* 24, 131-153.
- Klinger, J.M., Stowe, R.P., Obenhuber, D.C., Groves, T.O., Mishra, S.K., and Pierson, M.D. (1992). Evaluation of the biology automated microbial identification system. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 58: 2089-2092.
- Knowler, W., Barrett-Connor, E., Fowler, S., Hamman, R., Lachin, J., Walker, E., and Nathan, D. (2003). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 13, 208.
- Kodama, N., Komuta, K., and Nanba, H. (2003). Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the activation of NK cells in cancer patients. *Journal of medicinal food* 6, 371-377.
- Kofuji, K., Aoki, A., Tsubaki, K., Konishi, M., Isobe, T., and Murata, Y. (2012). Antioxidant activity of β -glucan. *ISRN pharmaceutics* 2012.
- König, H., Unden, G., and Fröhlich, J. (2009). "Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine," Springer.
- Kouidhi, S., Berrhouma, R., Rouissi, K., Jarbouli, S., Clerget-Froidevaux, M.-S., Seugnet, I., Bchir, F., Demeneix, B., Guissouma, H., and Elgaaied, A. B. (2013). Human subcutaneous adipose tissue Glut 4 mRNA expression in obesity and type 2 diabetes. *Acta diabetologica* 50, 227-232.
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvic, M. M., Todorović, N., Jakovljević, D., and Van Griensven, L. J. (2012). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of food composition and analysis* 26, 144-153.
- Krentz, A. J. (2003). Lipoprotein abnormalities and their consequences for patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 5.
- Kurokawa, K., Nangaku, M., Saito, A., Inagi, R., and Miyata, T. (2002). Current issues and future perspectives of chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* 13, S3-S6.
- Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachoui, M., and Ouhssine, M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *BULLETIN-SOCIETE DE PHARMACIE DE BORDEAUX* 144, 237.

- Laitinen, K., Poussa, T., and Isolauri, E. (2009). Probiotics and dietary counselling contribute to glucose regulation during and after pregnancy: a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition* 101, 1679-1687.
- Lam, C. D., and Flores, R. A. (2003). Effect of particle size and moisture content on viscosity of fish feed. *Cereal Chemistry* 80, 20-24.
- Larsen, N., Vogensen, F. K., van den Berg, F. W., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., and al. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS one* 5(2):e9085.
- Leighton, E., Sainsbury, C. A., and Jones, G. C. (2017). A practical review of C-peptide testing in diabetes. *Diabetes Therapy* 8, 475-487.
- Leisner, J. J., Rusul, G., Wee, B. W., Boo, H. C., and Muhammad, K. (1997). Microbiology of chili bo, a popular Malaysian food ingredient. *Journal of Food Protection* 60, 1235-1240.
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51, 216-226.
- Leveau, J.-Y., and Bouix, M. (1993). *Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'interet industriel*.
- Levrat, M.-A., Favier, M.-L., Moundras, C., Rémésy, C., Demigné, C., and Morand, C. (1994). Role of dietary propionic acid and bile acid excretion in the hypocholesterolemic effects of oligosaccharides in rats. *The Journal of nutrition* 124, 531-538.
- Lia, A., Hallmans, G., Sandberg, A.-S., Sundberg, B., Aman, P., and Andersson, H. (1995). Oat beta-glucan increases bile acid excretion and a fiber-rich barley fraction increases cholesterol excretion in ileostomy subjects. *The American journal of clinical nutrition* 62, 1245-1251.
- Liu, C., Zhang, Z., Dong K., Yuan, J., and Guo, X. (2009). Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Journal of Biomedical and Environmental Sciences* 22: 401-412.
- Liu, M., Zhang, Y., Zhang, H., Hu, B., Wang, L., Qian, H., and Qi, X. (2016). The anti-diabetic activity of oat β -d-glucan in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic mice. *International journal of biological macromolecules* 91, 1170-1176.
- Liu, S., Willett, W. C., Manson, J. E., Hu, F. B., Rosner, B., and Colditz, G. (2003). Relation between changes in intakes of dietary fiber and grain products and changes in weight and development of obesity among middle-aged women. *The American journal of clinical nutrition* 78, 920-927.
- Liu, S., Zheng, H., Zhu, X., Mao, F., Zhang, S., Shi, H., Li, Y., and Lu, B. (2017). Neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes patients. *Diabetes research and clinical practice* 130, 90-97.
- Lo, H.-C., Tsai, F.-A., Wasser, S. P., Yang, J.-G., and Huang, B.-M. (2006). Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Retz.: Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats. *Life sciences* 78, 1957-1966.
- Lotfy, M., Adeghate, J., Kalasz, H., Singh, J., and Adeghate, E. (2017). Chronic complications of diabetes mellitus: A mini review. *Current diabetes reviews* 13, 3-10.

- Lou, M., Luo, P., Tang, R., Peng, Y., Yu, S., Huang, W., and He, L. (2015). Relationship between neutrophil-lymphocyte ratio and insulin resistance in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus patients. *BMC endocrine disorders* 15, 9.
- Ludwig, D. S. (2003). Dietary glycemic index and the regulation of body weight. *Lipids* 38, 117-121.
- Lund, D., and Lorenz, K. J. (1984). Influence of time, temperature, moisture, ingredients, and processing conditions on starch gelatinization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 20:4, 249-273.
- Madrigal-Santillán, E., Madrigal-Bujaidar, E., Álvarez-González, I., Sumaya-Martínez, M. T., Gutiérrez-Salinas, J., Bautista, M., Morales-González, Á., y González-Rubio, M. G.-L., Aguilar-Faisal, J. L., and Morales-González, J. A. (2014). Review of natural products with hepatoprotective effects. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 20, 14787.
- Maity, P., Sen, I. K., Maji, P. K., Paloi, S., Devi, K. S. P., Acharya, K., Maiti, T. K., and Islam, S. S. (2015). Structural, immunological, and antioxidant studies of β -glucan from edible mushroom *Entoloma lividoalbum*. *Carbohydrate polymers* 123, 350-358.
- Makhloufi, K. M. (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat en Microbiologie, Biochimie. Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. France. 200p.
- Manigandan, T., Mangaiyarkarasi, S. P., Hemaltha, R., Hemaltha, V. T., and Murali, N. P. (2012). Probiotics, prebiotics and synbiotics-A review. *Biomed. Pharmacol. J.* 5, 295–304
- Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 45, 594-598.
- Markowiak, P. and Slizewska K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* 9, 1021.
- Martín-Timón, I., Sevillano-Collantes, C., Segura-Galindo, A., and del Cañizo-Gómez, F. J. (2014). Type 2 diabetes and cardiovascular disease: have all risk factors the same strength? *World journal of diabetes* 5, 444.
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., and Holzapfel, W. H. (2004). Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *International journal of food microbiology* 94, 269-278.
- McClea, B. V., and Glennie-Holmes, M. (1985). Enzymic quantification of (1→3)(1→4)- β -d-glucan in barley and malt. *Journal of the Institute of Brewing* 91, 285-295.
- McDonald, L., Fleming, H., and Hassan, H. (1990). Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2120-2124.
- Mellbin, L. G., Anselmino, M., and Lars, R. (2010). Diabetes, prediabetes and cardiovascular risk. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* 17, s9-s14.
- Mengual, L., Roura, P., Serra, M., Montasell, M., Prieto, G., and Bonet, S. (2010). Multifactorial control and treatment intensity of type-2 diabetes in primary care settings in Catalonia. *Cardiovascular diabetology* 9, 14.
- Meyer, C., Stumvoll, M., Nadkarni, V., Dostou, J., Mitrakou, A., and Gerich, J. (1998). Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* 102, 619-624.

- Miller, H. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society* 48, 91-91.
- Miller, K. M., Foster, N. C., Beck, R. W., Bergenstal, R. M., DuBose, S. N., DiMeglio, L. A., Maahs, D. M., and Tamborlane, W. V. (2015). Current state of type 1 diabetes treatment in the US: updated data from the T1D Exchange clinic registry. *Diabetes care* 38, 971-978.
- Mitsou, E. K., Panopoulou, N., Turunen, K., Spiliotis, V., and Kyriacou, A. (2010). Prebiotic potential of barley derived β -glucan at low intake levels: A randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical study. *Food Research International* 43, 1086-1092.
- Mizuno, M., Kawakami, S., and Fujitake, N. (2003). Macrophages stimulated by polysaccharide purified from *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al.(Agaricomycetidae) enhance mRNA expression of Th1 cytokine including IL-12 and 18. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 5.
- Mohamadshahi, M., Veissi, M., Haidari, F., Shahbazian, H., Kaydani, G. A., Mohammadi, F. (2014). Effects of probiotic yogurt consumption on inflammatory biomarkers in patients with type 2 diabetes. *BioImpacts* 4(2):83–8.
- Monnier, L., and Thuan, J. (2007). Type 1 diabetes of the child and the adult. Type 2 diabetes of the adult. *Complications of diabetes. La Revue du praticien* 57, 653.
- Moreno-Indias, I., Cardona, F., Tinahones, F. J., and Queipo-Ortuño, M. I. (2014). Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in microbiology* 5, 190.
- Moslehi, J., and Libby, P. (2012). You can't run from inflammation: lower extremity ischemia, hypoxia signaling, and macrophage subtypes. *Circulation research* 110, 1045-1046.
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P.V., Jain, S. and Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. *FEMS Microbiol. Lett* 334, 1–15.
- Nandi, A. K., Samanta, S., Maity, S., Sen, I. K., Khatua, S., Devi, K. S. P., Acharya, K., Maiti, T. K., and Islam, S. S. (2014). Antioxidant and immunostimulant β -glucan from edible mushroom *Russula albonigra* (Krombh.) Fr. *Carbohydrate polymers* 99, 774-782.
- Nantakornsuttanan, N., Thuphairo, K., Kukreja, R., Charoenkiatkul, S., and Suttisansanee, U. (2016). Anti-cholinesterase inhibitory activities of different varieties of chili peppers extracts. *International Food Research Journal* 23.
- Nelson, L. H., and Tucker, L. A. (1996). Diet composition related to body fat in a multivariate study of 203 men. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 96, 771-777.
- Nerlich, A., and Schleicher, E. (1991). Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. *The American journal of pathology* 139, 889.
- Neu, H.C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257: 1064-1078.
- Neyrinck, A. M., Mouson, A., and Delzenne, N. M. (2007). Dietary supplementation with laminarin, a fermentable marine β (1–3) glucan, protects against hepatotoxicity induced by LPS in rat by modulating immune response in the hepatic tissue. *International immunopharmacology* 7, 1497-1506.
- Nguyen, T., Fleet, G., and Rogers, P. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied microbiology and biotechnology* 50, 206-212.

- Nilsson, L.-M., Abrahamsson, A., Sahlin, S., Gustafsson, U., Angelin, B., Parini, P., and Einarsson, C. (2007). Bile acids and lipoprotein metabolism: effects of cholestyramine and chenodeoxycholic acid on human hepatic mRNA expression. *Biochemical and biophysical research communications* 357, 707-711.
- Nilsson, M., Åman, P., Härkönen, H., Hallmans, G., Knudsen, K. E. B., Mazur, W., and Adlercreutz, H. (1997). Content of nutrients and lignans in roller milled fractions of rye. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73, 143-148.
- Nouwen, A., Nefs, G., Caramlau, I., Connock, M., Winkley, K., Lloyd, C. E., Peyrot, M., Pouwer, F., and Consortium, E. D. i. D. R. (2011). Prevalence of depression in individuals with impaired glucose metabolism or undiagnosed diabetes: a systematic review and meta-analysis of the European Depression in Diabetes (EDID) Research Consortium. *Diabetes Care* 34, 752-762.
- Ogier, J.-C., Casalta, E., Farrokh, C., and Saïhi, A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *International journal of food microbiology* 126, 286-290.
- Olsson, S., and Sundler, R. (2007). The macrophage β -glucan receptor mediates arachidonate release induced by zymosan: essential role for Src family kinases. *Molecular immunology* 44, 1509-1515.
- Ooi, L.-G., Ahmad, R., Yuen, K.-H., and Liang, M.-T. (2010). *Lactobacillus acidophilus* CHO-220 and inulin reduced plasma total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol via alteration of lipid transporters. *Journal of dairy science* 93, 5048-5058.
- Orhan, I., Naz, Q., Kartal, M., Tosun, F., and Şener, B. (2007). In vitro anticholinesterase activity of various alkaloids. *Zeitschrift für Naturforschung C* 62, 684-688.
- Ouwehand, A., Kirjavainen, P., Grönlund, M.-M., Isolauri, E., and Salminen, S. (1999). Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal* 9, 623-630.
- Oyaizu, M. (1986). Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44, 307-315.
- Öztürk, M., Duru, M. E., Kivrak, Ş., Mercan-Doğan, N., Türkoglu, A., and Özler, M. A. (2011). In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology* 49, 1353-1360.
- Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Celik, S. E., Baki, S., Yıldız, L., Karaman, Ş., and Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical methods* 3, 2439-2453.
- Pandey, K. R., Naik, S. R., and Babu, V. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-A review. *J. Food. Sci. Technol.* 52, 7577-7587.
- Panwar, H., Rashmi, H. M., Batish, V. K., and Grover, S. (2013). Probiotics as potential biotherapeutics in the management of type 2 diabetes—prospects and perspectives. *Diabetes/metabolism research and reviews* 29, 103-112.
- Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P., and Kanaka-Gantenbein, C. (2017). Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. *Diabetes/metabolism research and reviews* 33.
- Parnell, J.A., and Reimer, R.A. (2012). Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter bacteroidetes and firmicutes in lean and obese JCR:LA-cp rats. *Br. J. Nutr.* 107, 601-613.

- Picon, A., García-Casado, M., and Nuñez, M. (2010). Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *International dairy journal* 20, 156-162.
- Pincus, T., Gibofsky, A., Weinblatt, M.E. (2002). Urgent care and tight control of rheumatoid arthritis as in diabetes and hypertension: Better treatments but a shortage of rheumatologists. *Arthritis & Rheumatism*. 46(4), p.851-854.
- Polovina, M. M., and Potpara, T. S. (2014). Endothelial dysfunction in metabolic and vascular disorders. *Postgraduate medicine* 126, 38-53.
- Pop-Busui, R., Boulton, A. J., Feldman, E. L., Bril, V., Freeman, R., Malik, R. A., Sosenko, J. M., and Ziegler, D. (2017). Diabetic neuropathy: a position statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care* 40, 136-154.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., and Gopal, P.K. (1998). Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. *International Dairy Journal* 8: 993-1002.
- Queenan, K. M., Stewart, M. L., Smith, K. N., Thomas, W., Fulcher, R. G., and Slavin, J. L. (2007). Concentrated oat β -glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomized controlled trial. *Nutrition Journal* 6, 6.
- Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., and Takabayashi, K. (2004). Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126, 520-528.
- Radenković, M., Stojanović, M., and Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 78, 13-31.
- Rajamanikandan, S., Sindhu, T., Durgapriya, D., Sophia, D., Ragavendran, P., and Gopalakrishnan, V. (2011). Radical scavenging and antioxidant activity of ethanolic extract of *Mollugo nudicaulis* by invitro assays. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 45, 310-316.
- Ramachandran, A., Snehalatha, C., Salini, J., and Vijay, V. (2004). Use of glimepiride and insulin sensitizers in the treatment of type 2 diabetes—a study in Indians. *JAPI* 52, 459.
- Rani, V. U., and Pradeep, P.B. (2014). Isolation, identification and characterisation of a novel probiotic strain (*Lactobacillus paracasei* KUMBB005) from cow milk samples and its antibacterial activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 395: 599-612.
- Raso, G. M., Simeoli, R., Iacono, A., Santoro, A., Amero, P., Paciello, O., Russo, R., D'Agostino, G., Di Costanzo, M., and Canani, R. B. (2014). Effects of a *Lactobacillus paracasei* B21060 based synbiotic on steatosis, insulin signaling and toll-like receptor expression in rats fed a high-fat diet. *The Journal of nutritional biochemistry* 25, 81-90.
- Rastall, R. A., and Gibson, G. R. (2015). Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology* 32, 42-46.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine* 26, 1231-1237.
- Ricklin, D., and Lambris, J. D. (2007). Complement-targeted therapeutics. *Nature biotechnology* 25, 1265.

- Ricklin, D., and Lambris, J. D. (2008). Compstatin: a complement inhibitor on its way to clinical application. In "Current Topics in Complement II", pp. 262-281. Springer.
- Ricklin, D., and Lambris, J. D. (2013). Progress and trends in complement therapeutics. In "Complement Therapeutics", pp. 1-22. Springer.
- Riddle, M. C. (2011). Glycemic control and cardiovascular mortality. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 18, 104-109.
- Ritchie, M. L., and Romanuk, T. N. (2012). A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PLoS One* 7, e34938.
- Roberfroid, M. (1993). Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 33, 103-148.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., and Stahl, B. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition* 104, S1-S63.
- Rodrigues, M. J., Soszynski, A., Martins, A., Rauter, A. P., Neng, N. R., Nogueira, J. M., Varela, J., Barreira, L., and Custódio, L. (2015). Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Industrial Crops and Products* 77, 315-322.
- Rosoklija, G. B., Dwork, A. J., Younger, D. S., Karlikaya, G., Latov, N., and Hays, A. P. (2000). Local activation of the complement system in endoneurial microvessels of diabetic neuropathy. *Acta neuropathologica* 99, 55-62.
- Roubroeks, J., Andersson, R., and Åman, P. (2000). Structural features of (1→3),(1→4)-β-D-glucan and arabinoxylan fractions isolated from rye bran. *Carbohydrate Polymers* 42, 3-11.
- Saarela, M., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. (2002). Safety aspects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species originating from human oro-gastrointestinal tract or from probiotic products. *Microbial Ecology in Health and Disease Journal* 14: 233-240.
- Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Pérez-Heras, A., and Ros, E. (2006). Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases. *British Journal of Nutrition* 96, S45-S51.
- Salminen, S., and Von Wright, A. (2004). "Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects," CRC Press.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 8, 121-137.
- Sanja, S., Sheth, N., Patel, N., Patel, D., and Patel, B. (2009). Characterization and evaluation of antioxidant activity of *Portulaca oleracea*. *Int J Pharm Pharm Sci* 1, 5-10.
- Santos, A., Mauro, M.S., Sanchez, A., Torres, J.M., and Marguina, D. (2003). The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology* 26(3): 434-437.
- Saris, W. H. (2003). Glycemic carbohydrate and body weight regulation. *Nutrition reviews* 61, S10-S16.
- Sarkhail, P., Rahmanipour, S., Fadyevatan, S., Mohammadirad, A., Dehghan, G., Amin, G., Shafiee, A., and Abdollahi, M. (2007). Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: effects on hepatic cells lipid

- peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Pharmacological Research* 56, 261-266.
- Sathishsekar, D., and Subramanian, S. (2005). Antioxidant properties of *Momordica Charantia* (bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 14, 153.
- Savijoki, K., Ingmer, H., and Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology* 71, 394-406.
- Schaafsma, G., Meuling, W., Van Dokkum, W., and Bouley, C. (1998). Effects of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. *European journal of clinical nutrition* 52, 436.
- Schilliager, U., Geisen, R., Holzapfel, W. H. (1997). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of food. *Trends in Food Science and Technology* 7: 158-164.
- Schorey, J., and Lawrence, C. (2008). The pattern recognition receptor Dectin-1: from fungi to mycobacteria. *Current drug targets* 9, 123-129.
- Sekhon, B.S., and Jairath, S. (2010). Prebiotics, probiotics and synbiotics: An overview. *J. Pharm. Educ. Res.* 1, 13–36.
- Selvarajah, D., Wilkinson, I. D., Emery, C. J., Harris, N. D., Shaw, P. J., Witte, D. R., Griffiths, P. D., and Tesfaye, S. (2006). Early involvement of the spinal cord in diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Care* 29, 2664-2669.
- Shah, A., Gani, A., Masoodi, F., Wani, S. M., and Ashwar, B. A. (2017). Structural, rheological and nutraceutical potential of β -glucan from barley and oat. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 10, 10-16.
- Shai, L. J., Masoko, P., Mokgotho, M. P., Magano, S. R., Mogale, A., Boaduo, N., and Eloff, J. N. (2010). Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa, South Africa. *South African Journal of Botany* 76, 465-470.
- Shakeri, H., Hadaegh, H., Abedi, F., Tajabadi-Ebrahimi, M., Mazroii, N., Ghandi, Y., and Asemi, Z. (2014). Consumption of synbiotic bread decreases triacylglycerol and VLDL levels while increasing HDL levels in serum from patients with type-2 diabetes. *Lipids* 49, 695-701.
- Sharma, B., Balomajumder, C., and Roy, P. (2008). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food and chemical toxicology* 46, 2376-2383.
- Sharma, P., Tomar, S.K., Goswami, P., Sangwan, V., and Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International* 57: 176-195.
- Sierra, M., García, J. J., Fernández, N., Diez, M. J., and Calle, A. (2002). Therapeutic effects of psyllium in type 2 diabetic patients. *European journal of clinical nutrition* 56, 830.
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients* 5, 1417–1435.
- Slinkard, K., and Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture* 28, 49-55.
- Soomro, A.H., and Masud, T. (2012). Probiotic characteristics of *Lactobacillus* spp. Isolated from fermented milk product Dahi. *Food Science and Technology Research* 18(1): 91-98.

- Stone, B., and Fincher, G. B. (2004). Chemistry of non-starch polysaccharides from cereal grains.
- Suskovic, J., Kos, B., Goreta, J., and Matosic, S. (2001). Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in symbiotic effect. *Food Technology and Biotechnology* 39: 227-235.
- Symons, L., and Brennan, C. (2004). The Influence of (1→3)(1→4)-β-D-Glucan-rich Fractions from Barley on the Physicochemical Properties and In Vitro Reducing Sugar Release of White Wheat Breads. *Journal of Food Science* 69.
- Tajadadi-Ebrahimi, M., Bahmani, F., Shakeri, H., Hadaegh, H., Hijjafari, M., Abedi, F., and Asemi, Z. (2014). Effects of daily consumption of synbiotic bread on insulin metabolism and serum high-sensitivity C-reactive protein among diabetic patients: a double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Annals of Nutrition and Metabolism* 65, 34-41.
- Tanko, Y., Yerima, M., Mahdi, M., Yaro, A., Musa, K., and Mohammed, A. (2008). Hypoglycemic activity of methanolic stem bark of *adansonia digitata* extract on blood glucose levels of streptozocin-induced diabetic wistar rats. *International Journal of Applied Research in Natural Products* 1, 32-36.
- Taranto, M., Medici, M., Perdigon, G., Holgado, A. R., and Valdez, G. (1998). Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *Journal of Dairy Science* 81, 2336-2340.
- Temelli, F. (1997). Extraction and functional properties of barley β-glucan as affected by temperature and pH. *Journal of food science* 62, 1194-1201.
- Thondre, P., Ryan, L., and Henry, C. (2011). Barley β-glucan extracts as rich sources of polyphenols and antioxidants. *Food Chemistry* 126, 72-77.
- Tokunaka, K., Ohno, N., Adachi, Y., Miura, N. N., and Yadomae, T. (2002). Application of *Candida* solubilized cell wall β-glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice. *International immunopharmacology* 2, 59-67.
- Topping, D. L., and Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews* 81, 1031-1064.
- Tougu, V. (2001). Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents* 1, 155-170.
- Uddin, M. J., Alam, M. N., Biswas, K., and Rahman, M. A. (2016). In vitro antioxidative and cholinesterase inhibitory properties of *Thunbergia grandiflora* leaf extract. *Cogent Food & Agriculture* 2, 1256929.
- Vasudevan, D. M., Sreekumari, S., and Vaidyanathan, K. (2013). "Textbook of biochemistry for medical students," JP Medical Ltd.
- Vaughan, E.E., Mollet, B., and Devos, W.M. (1999). Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 505-510.
- Viana, G. S., Medeiros, A. C. C., Lacerda, A. M. R., Leal, L. K. A., Vale, T. G., and de Abreu Matos, F. J. (2004). Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. *BMC pharmacology* 4, 9.
- Volman, J. J., Ramakers, J. D., and Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by β-glucans. *Physiology & behavior* 94, 276-284.

- Wang, H., Liu, D., Wang, H., Cui, B., and Xie, B. (2006). Effect of oat β glucan on pancreatic function in diabetic rats. *Acta Nutr. Sin* 28, 54-57.
- Wang, J., Rosell, C. M., and de Barber, C. B. (2002). Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. *Food chemistry* 79, 221-226.
- Wang, Q., Chen, S., Han, L., Lian, M., Wen, Z., Jiayinaguli, T., Liu, L., Sun, R., and Cao, Y. (2014). Antioxidant activity of carboxymethyl (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan (from the sclerotium of *Poria cocos*) sulfate (in vitro). *International journal of biological macromolecules* 69, 229-235.
- Wang, R.-t., Zhang, J.-r., Li, Y., Liu, T., and Yu, K.-j. (2015). Neutrophil-lymphocyte ratio is associated with arterial stiffness in diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Journal of diabetes and its complications* 29, 245-249.
- Wang, Y. (2009). Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Res. Int.* 42, 8-12.
- Wannamethee, S. G., Whincup, P. H., Thomas, M. C., and Sattar, N. (2009). Associations between dietary fiber and inflammation, hepatic function, and risk of type 2 diabetes in older men: potential mechanisms for the benefits of fiber on diabetes risk. *Diabetes care* 32, 1823-1825.
- Weickert, M. O., Möhlig, M., Schöfl, C., Arafat, A. M., Otto, B., Viehoff, H., Koebnick, C., Kohl, A., Spranger, J., and Pfeiffer, A. F. (2006). Cereal fiber improves whole-body insulin sensitivity in overweight and obese women. *Diabetes care* 29, 775-780.
- Weir, G. C., and Bonner-Weir, S. (2004). Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53, S16-S21.
- Weir, G. C., and Bonner-Weir, S. (2013). Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1281, 92-105.
- Wémeau, J.-L., Schlienger, J.-L., and Vialettes, B. (2014). "Endocrinologie, diabète, métabolisme et nutrition pour le praticien," Elsevier Masson.
- Williams, A., Noble, J., and Banks, J. (2001). Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 11, 203-215.
- Wood, P., Siddiqui, I., and Paton, D. (1978). Extraction of high-viscosity gums from oats. *Cereal Chem* 55, 1038-1049.
- Xiao, H., Cai, X., Fan, Y., and Luo, A. (2016). Antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from *Brasenia schreberi*. *Pharmacognosy magazine* 12, 193.
- Xin-Zhong, H., Xia-lu, S., Xiao-ping, L., Liu, L., Jian-mei, Z., and Xing-yun, C. (2015). Effect of dietary oat β -glucan on high-fat diet induced obesity in HFA mice. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5, 79-85.
- Xu, F., Sun, J., Geng, Z., Liu, C., Ren, J., Sun, R., Fowler, P., and Baird, M. (2007). Comparative study of water-soluble and alkali-soluble hemicelluloses from perennial ryegrass leaves (*Lolium perenne*). *Carbohydrate Polymers* 67, 56-65.
- Yadav, H., Jain, S., Sinha, P. R. (2008). Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. *The Journal of dairy research* 75(2):189-95.
- Yalçın, E., and Çelik, S. (2007). Solubility properties of barley flour, protein isolates and hydrolysates. *Food chemistry* 104, 1641-1647.

- Yang, G., Luo, C., Yan, X., Cheng, L., and Chai, Y. (2011). Extracorporeal shock wave treatment improves incisional wound healing in diabetic rats. *The Tohoku journal of experimental medicine* 225, 285-292.
- Yang, L., Zhao, J., Milutinovic, P. S., Brosnan, R. J., Eger, E. I., and Sonner, J. M. (2007). Anesthetic properties of the ketone bodies β -hydroxybutyric acid and acetone. *Anesthesia & Analgesia* 105, 673-679.
- Yun, S. I., Park, H. O., and Kang, J. H. (2009). Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *Journal of applied microbiology* 107(5):1681-6.
- Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suàrez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., and Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology* 28, 1033-1040.
- Zhang, J., Gerhardinger, C., and Lorenzi, M. (2002). Early complement activation and decreased levels of glycosylphosphatidylinositol-anchored complement inhibitors in human and experimental diabetic retinopathy. *Diabetes* 51, 3499-3504.
- Zhang, J., Zhao, S., Yin, P., Yan, L., Han, J., Shi, L., Zhou, X., Liu, Y., and Ma, C. (2014). α -Glucosidase inhibitory activity of polyphenols from the burs of *Castanea mollissima* Blume. *Molecules* 19, 8373-8386.
- Zhang, M., Cheung, P. C., Ooi, V. E., and Zhang, L. (2004). Evaluation of sulfated fungal β -glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. *Carbohydrate research* 339, 2297-2301.
- Zhu, F., Du, B., Bian, Z., and Xu, B. (2015). Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: characteristics, physicochemical and biological activities. *Journal of Food Composition and Analysis* 41, 165-173.




ANNEXES

Annexe I


SAIDA 183

FICHE VARIETALE


Variété : Saida 183
 Obtenteur : ITGC Khroub
 Demandeur : ITGC
 Origine : Algérie
 Année d'inscription : 1995
 Pedigree : sélection généalogique


DESIGNATION DU CARACTERE



Plante: port au tallage
 Feuille de la base: pilosité de la gaine
 Dernière feuille: port
 Dernière feuille: pigmentation anthocyanique des oreillettes
 Dernière feuille: Glaucescence de la gaine
 Epoque d'épiaison: 1er épillet visible sur 50% des plantes
 Barbes: pigmentation anthocyanique des pointes
 Barbes: intensité de la pigmentation anthocyanique des pointes
 Epi: glaucescence
 Epi: port
 Plante: hauteur (tige, épi et barbe)



Epi: nombre de rangs
 Epi: Forme
 Epi: compacité
 Barbes: longueur par rapport à l'épi
 Barbes: denticulation des nervures dorsales
 Rachis: longueur du premier article
 Rachis: incurvation du premier article
 Epillet médian: longueur de la glume ou de l'arête par rapport au grain



Grain: type de la pilosité de la baguette
 Grain: glumelles
 Grain: pigmentation anthocyanique des nervures de la glumelle inférieure
 Grain: denticulation des nervures dorsales internes de la glumelle inférieure
 Grain: pilosité du sillon
 Grain: position des lodicules

Type de développement

NIVEAU D'EXPRESSION

Mi-dressé Mi-étalé
 Présente
 Légèrement récurvé
 Absente
 Moyenne
 Tardive
 Présente
 Faible
 Nulle à très faible
 Droit
 Longue

Plus de deux
 Pyramidale
 Très lâche
 Plus longues
 Très forte
 Court
 Faible
 De même longueur

Courte
 Présente
 Nulle à très faible
 Forte
 Absente
 Latérale

Hiver

Fiche variétale de l'orge utilisée (Centre National de Contrôle et de Certification des semences et plantes)



Original Research Article

Antioxidant, anti-cholinesterase, anti- α -glucosidase and prebiotic properties of beta-glucan extracted from Algerian barley

Saad Mebrek^{1,2*}, Hanene Djeghim², Yamina Mehdi^{3,1}, Asma Meghezzi², Anwar Sirajudheen⁴, Ali Awadh A. Nasser⁵ and Mohammed Benali¹

Abstract

Beta-glucan, such as barley-derived beta-glucan (BBG), are homopolysaccharides that have attracted attention by their nutritional and therapeutic properties. The aim of this study was to evaluate the antioxidant power of BBG extracted from local Algerian variety of barley (SAIDA 183), and its acetylcholinesterase, alpha glucosidase inhibitory activity as well as its prebiotic potential by fermentation with lactic acid bacteria isolated from camel's milk, namely *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (Lc.l.l) and *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* (Ln.m.m). The results revealed that BBG exhibited low activity against DPPH and ferric-reducing power (IC₅₀ 4018.61 ± 656.69 and A_{0.5} at 359.88 ± 63.64 µg/mL respectively), in contrast to other antioxidant tests (ABTS, Beta-carotene and CUPRAC) where BBG demonstrated a moderate activity (IC₅₀ 529.91 ± 26.37, IC₅₀ 161.013 ± 13.322, A_{0.5} 529.79 ± 48.65 µg/mL). The scavenging ability of hydroxyl radical and superoxide radical by BBG with an IC₅₀ at 2268.38 ± 101.57 µg/mL and IC₅₀ 345.26 ± 62.32 µg/mL, respectively, while enzymatic inhibition by BBG exhibited for AChE at IC₅₀ 859.164 ± 64.46 µg/mL, BChE at IC₅₀ at 725.470 ± 30.95, α -Amylase inhibitory activity at IC₅₀ 2986.785 ± 37.046. The bacterial growth of the two strains used in this study is favorably affected by the use of BBG as the only carbon source, in comparison with glucose as a control. In light of these findings, it can be concluded that BBG have shown moderate antioxidant and enzyme inhibitory activities and can be used as a prebiotic by acting synergistically with probiotics in functional food matrices.

Keywords: β Glucan; antioxidant; anti-cholinesterase; anti- α -glucosidase and prebiotic

Introduction

The polysaccharides non-cellulosic β -D-glucans occur as a principal component of the cell walls of bacteria, fungi, algae and cereals such as barley and oats (2.5 -11.3% and 2.2 - 7.8%, respectively). The primary structure of beta glucan consisting of β -D-glucopyranose units connected by (1 → 4) and (1 → 3) glycosidic bonds in case of cereals and (1 → 6) glycosidic bonds in case of fungal sources [1]. The physicochemical properties of β -glucans (BBG) differ depending on characteristics of

their primary structure, including linkage type, degree of branching, molecular weight, and conformation [2]. Various benefits of BBG in health have been approved. Including stimulate the immune system, modulating humoral and cellular immunity, growth inhibition of tumor cells and thereby have beneficial effect in fighting bacterial, viral, fungal and parasitic infections [1]. BBG have been demonstrated to reduce blood lipid levels, including cholesterol and triglyceride levels and control the postprandial glycaemia, it also has potential against different types of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals who are closely involved in various human diseases, such as cerebral ischemia, diabetes, Alzheimer, inflammation, atherosclerosis and cancer, as well as aging processes [3]. Many reports show that BBG exhibit scavenging these free radicals in preventing oxidative damage in living organisms [4]. It was reported that the BBG possess neu-

*Correspondence: saad.mebrek@gmail.com

¹Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, Laboratory of Biototoxicology, University of Djilali Liabes, Sidi Bel Abbes 22000, Algeria

²Ali Mendjli Nouvelle ville UV 03, Constantine 25000, Biotechnology Research Centre, Algeria

Full list of author information is available at the end of the article.

Received: 24 Jan 2018, Accepted: 19 Mar 2018



roprotective effect and improve spatial memory deficits in rat model [5].

Antioxidant activity of these macromolecules is related to species, variety, environmental factors and several structural parameters (solubility, viscosity, molecular weight, composition, type of glycosidic linkages and degree of branching by side-chain functional groups [6]. Recent studies have shown that derivatives of BBG by carboxymethylation, sulphation or phosphorylation as well as physical modifications such as γ -irradiation [7] have an effect on the antioxidant and biological properties of these macromolecules.

Several studies have demonstrated the beneficial effect of probiotics, prebiotics or the combination of both (synbiotic effect) in humans as well as in animals [8]. Long-chain carbohydrates such as BBG are not assimilated by the human digestive system, and will subsequently be fermented by the intestinal flora, generating fermentation metabolites such as Short Chain fatty acids (SCFA), which have a positive effect on human and animal health. [9].

However, the antioxidant activity, anti-cholinesterase activity and prebiotic potential of Algerian barley β -glucan (SAIDA 183 cultivar) have not been extensively investigated. The objective of the present study was to investigate the in-vitro antioxidant effect of beta-glucan isolated from SAIDA barley cultivar, by testing its ability to scavenging different free radicals such as ABTS and DPPH and reactive oxygen species (ROS), such as hydroxyl radical and superoxide radical implicated in many pathological processes. Furthermore, inhibition of cholinesterase enzyme is implicated in various pharmacotherapeutical applications; its inhibition by BBG is also investigated in this work. Finally, the ability of two strains of lactic acid bacteria (2 strains) to grow in a medium containing BBG as a sole source of carbon is studied, in order to confirm the prebiotic potential of BBG.

Material and Methods

β -Glucan extraction

For this study, whole barley flour from the SAIDA 183 cultivar was used, provided by ITGC (Technical Institute of Great Cultures), Constantine, Algeria. The whole barley was milled to flour by a high-speed electric mill (Model MF 10.1, IKA), equipped with 0.50-mm screen. The β -Glucan was extracted from whole barley flour by a hot water extraction method according to [10], 50 g of flour was suspended in 500 ml of water, adjusted to pH 7 with sodium carbonate (20%, w/v) followed by vigorous stirring for 30 minutes at 55°C. The mixture was centrifuged (refrigerated centrifuge 3-30 KS, Sigma-Aldrich, Ger-

many) for 15 min at 15,000 x g at 4°C to remove the solids. To precipitate the proteins, the pH of the supernatant was adjusted to 4.5 with 2M HCl and then centrifuged again (20 min at 21,000 x g, 4°C). β -glucan was precipitated by adding an equal volume of absolute ethanol (99.9%) to the supernatant slowly with stirring. After 12 hours at 4°C, the precipitate was recovered by centrifugation (10 min at 3300 x g, 4°C). The pellet was resuspended in ethanol, and then air-dried in an oven (Memmert) at 25°C with forced air circulation for 90 min. The β -glucan extract was stored at 4°C.

Determination of β -glucan content

The gum was analyzed for β -glucan content using megazyme assay kit for mixed linkage β -glucan analysis (Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland) by hydrolysing with lichenase (1000 U/ml) and b-glucosidase (40 U/ml). β -glucan concentration is expressed as % (weight) of the total sample.

Determination of total phenolic concentration

The phenolic concentration of β -glucans extracted from barley was determined by the Folin-Ciocalteu's phenol reagent [11]. First, 250 μ L of β -glucans or gallic acid standard were added to 1.25 mL of freshly made 10-fold diluted Folin-Ciocalteu reagent (0.2N). After 05 min at room temperature, 1 mL of 7% (w/v) Na_2CO_3 solution was added and mixed. After incubation for 60 min, the absorbance was monitored at 750 nm versus a blank. Eight concentrations (10-80 μ g/mL) of Gallic acid solutions in methanol were prepared and used as standard. The phenolic concentration was expressed as μ g gallic acid equivalent (GAE)/mg of sample. The sample was analyzed in triplicate.

Determination of total flavonoid concentration

The amount of flavonoid was determined according to the colorimetric method described by Öztürk et al [12]. The β -glucan's flavonoid content was based on the complexation with Al^{3+} . 500 μ L of β -glucans solution in methanol was added to test tubes containing 1.9 mL methanol, 50 μ L of potassium acetate (1M) and 50 μ L aluminum nitrate (10%). After incubation at room temperature for 40 min, the absorbance was determined at 415 nm. Quercetin was used as a standard at varying concentration (0-200 μ g). The flavonoid content was expressed as μ g quercetin equivalent/mg of sample. The sample was analyzed in triplicate.

DPPH free radical scavenging activity

The radical scavenging activity of β -glucans was determined using DPPH assay according to Shah et al with minor modifications [13]. The decrease in the absorption of the DPPH solution after the addition of an antioxidant was measured at 517nm. The

reaction requires preparing a mixture of 40 μL of β -glucans at various concentrations (0.0625–4 mg/mL) with 160 μL DPPH solution (0.02% prepared in DMSO). For each concentration, a blank is prepared by mixing 40 μL of samples with 160 DMSO. A control containing 40 μL DMSO and 160 μL DPPH is also prepared. Alpha-tocopherol (4mg/mL) was used as standard. After incubation for 30 min in the dark, the decrease in the absorption of the DPPH solution was measured at 517nm using a 96-well microplate reader (Enspire Multimode plate reader, Perkin Elmer). Scavenging activity was expressed as IC_{50} (Concentration in $\mu\text{g}/\text{mL}$ of β -glucans that reduces the absorbance of DPPH by 50%). The anti-radical activity is determined using the formula:

$$\text{DPPH radical scavenging activity}(\%) = \frac{[A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}]}{[A_{\text{control}}]} \times 100$$

ABTS free radical scavenging activity

The decolorization test of 2,2'-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) free radical cations was carried out using an improved method of Öztürk et al with slight modifications [12]. A stock solution of ABTS^+ was produced by the oxidation of ABTS 7.0 mM in water and 2.5 mM potassium persulfate for 16 h in the dark at room temperature, after that, the solution ABTS^+ was diluted with absolute ethanol to an absorbance of 0.8-0.9 at 734 nm before being used in the test. Then, 160 μL of ABTS^+ solution was added to 40 μL of β -glucans in DMSO at different concentrations. After 10 min, the absorbance was monitored at 734 nm by using a 96-well microplate reader. DMSO was used as a control, while BHA was used as standard. Results were expressed as IC_{50} . The capability to scavenge the ABTS^+ radical was calculated using the following equation:

$$\text{ABTS radical - scavenging activity}(\%) = \frac{[A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}]}{[A_{\text{control}}]} \times 100$$

Antioxidant activity with the β -carotene bleaching method

The antioxidant activity of β -glucans was evaluated with the beta-carotene bleaching protocol according to the method of Öztürk et al, with slight modifications [12]. 0.5 mg of β -carotene was solubilized in 1 mL of chloroform, then 25 μL of linoleic acid and 200 mg of Tween 40 were added. After, the chloroform in the mixture was evaporated; 50 mL of oxygenated-ultra pure water was added with vigorous stirring. To 40 μL of the sample at different concentrations was added 160 μL of β -carotene/linoleic acid mixture, followed by initial absorbance measured at 470 nm using a 96-well microplate reader. After incubation of the plate for 2 h at 50 °C., the absorbance was measured again. DMSO was used as a control. BHT was used as

standard. Using the following equation, the anti-oxidant activity of β -glucans was calculated in terms of percent inhibition:

$$\text{Antioxidant activity} \% = [1 - (A_{s\ t=0} - A_{s\ t=120} / A_{c\ t=0} - A_{c\ t=120})] \times 100$$

Where $A_{s\ t=0}$: absorbance of the sample at $t = 0$, $A_{s\ t=120}$: absorbance of the sample at $t = 2\text{h}$, $A_{c\ t=0}$: absorbance of control at $t = 0$, $A_{c\ t=120}$: Absorbance of control at $t = 2\text{h}$.

Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

For measuring of reducing antioxidant capacity of β -glucans, the cupric ions (Cu^{2+}) method was used according to Özyürek et al with slight modification [14]. The solutions of 10 mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 1 M $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ were prepared in bidistilled water, while the Neocuproine solution at 7.5 mM concentration was prepared in ethanol 96%. 40 μL of β -glucans solution at different concentrations was added to the reaction mixture consisting of 60 μL $\text{Cu}(\text{II})$, 50 μL Nc and 50 μL $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ solutions. Then, the reaction mixture was let to stand for 30 minutes to achieve equilibrium. Absorbance was measured of the resulting cuprous-neocuproine complex at 450 nm using a 96-well microplate reader against a reagent blank. The extract concentration providing 0.5 of absorbance (EC_{50}) was calculated from the graph of absorbance at 450 nm against β -glucans concentration. BHA and BHT were used as standard.

Ferric- reducing antioxidant power (FRAP)

The ability of to reduce Fe^{3+} was estimated by the method described by Shah et al [7], which is based on the capacity of molecules to convert the oxidation form of iron Fe^{3+} to its reduced state Fe^{2+} . 10 μL of β -glucans solution at varying concentrations was mixed with 40 μL of 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.6) and 50 μL of 1% w/v potassium ferricyanide. The mixture was incubated at 50°C for 20min, the reaction was terminated by adding 50 μL of trichloroacetic acid (10% w/v), 40 μL of water and 10 μL of 0.1% w/v FeCl_3 were then added. The absorbance was then measured at 700nm using a 96-well microplate reader. 1mg/mL of EDTA was used as standard. The intensity of the absorbance is proportional to the reducing power of the reaction mixture. The extract concentration providing 0.5 of absorbance (EC_{50}) was calculated from the graph of absorbance at 700 nm against β -glucans concentration.

Scavenging of superoxide radical by alkaline DMSO method

The superoxide radical scavenging ability was measured in terms of inhibition of generation of O_2^- using alkaline DMSO according to Sanchez-Moreno with modifications [15]. Method adapted to 96-well microplates. The reaction mixture consisted of 40 μL of β -glucans at varying concentrations (0-4mg/mL in

DMSO), 130 μL of alkaline DMSO (1 mL DMSO containing, 5 mM NaOH in 0.1 mL water) and 30 μL NBT (1 mg/mL in DMSO). The mixture was incubated at 25 °C for 5 min, and absorbance was measured at 560 nm using a 96-well microplate reader. Ascorbic acid was used as positive control. The scavenging activity is determined using the equation:

$$\text{Scavenging activity} = \frac{[A_{\text{sample}} - A_{\text{control}}]}{[A_{\text{sample}}]} \times 100$$

Hydroxyl radical scavenging activity

Scavenging activity of hydroxyl radical of the extract was measured according to the method of Rajamanikandan et al [16]. 200 μL of the final reaction solution consisted of aliquots (80 μL) of various concentrations of β -glucans, 24 μL FeSO_4 (8 mmol/L), 20 μL of H_2O_2 (20 mmol/L) and 80 μL sodium salicylate (3 mmol/L). The reaction mixture was incubated for 1 h at 37 °C. L-Ascorbic acid was used as the standard. The color development was measured at 560 nm using a 96-well microplate reader against a blank. The scavenging activity is determined using the formula:

$$\text{Scavenging activity} = \frac{[A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}]}{[A_{\text{control}}]} \times 100$$

Determination of anticholinesterase activity

The enzymatic assay for Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase activity was performed utilizing a slightly modifying spectrophotometric method by Ellman et al [17]. In this study, AChE from electric eel and BChE from horse serum were used, while acetylthiocholine iodide (AChI) and butyrylthiocholine chloride (BChC) were employed as substrates of the reaction. Briefly, 110 μL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0), 20 μL of AChE (or BuChE) solution and 50 μL of β -glucans solution at different concentrations (1000 μg -62.5 μg) were added in a 96-well microplate. After an incubation period of 15 min at 25 °C, the reaction was then initiated by the addition of 10 μL of DTNB and 10 μL of substrate (AChI or BChC). The amount of DMSO in the mixture does not exceed 1.20%. The formation of the yellow 5-thio-2-nitrobenzoate anion as a result of the reaction was monitored spectrophotometrically at 412 nm using a 96-well microplate reader against a blank. Galanthamine was used as positive control. The results were given as IC₅₀ value ($\mu\text{g}/\text{mL}$) corresponding to the concentration shows 50% inhibition. Percent AChE enzyme inhibition was calculated using following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{[A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}]}{[A_{\text{control}}]} \times 100$$

In-vitro Yeast α -Glucosidase Inhibition Assay

Yeast α -glucosidase enzyme inhibition assays using p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (p-NPG) as substrate were carried out on 96-well microplates in accordance with the method described by Zhang et al, with minor modifications [18]

. Briefly, the reaction mixture contains: α -glucosidase (15 μL , 1.0 unit/mL in 100 mM phosphate buffer, pH 6.8) mixed with different concentrations of BBG (7 mg/mL – 0.219 mg/mL) and 40 μL of phosphate buffer in a 96-well plate. After incubation at 37 °C for 10 min, 45 μL of p-NPG solution (2 mM in 0.1 mM phosphate buffer, pH 6.8) was added to start the reaction. Acarbose was used as standard (7 mg/mL – 0.219 mg/mL). Enzymatic activity was monitored by measuring the p-nitrophenol released from PNP-glycoside at 405 nm every 45 sec for 3 min. The control samples were prepared without BBG. Results were expressed as a concentration of BBG resulting in 50% inhibition of enzyme activity (IC₅₀). The inhibition percentage was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{[A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}]}{[A_{\text{control}}]} \times 100$$

In-vitro prebiotic potential of BBG

The growth simulation of probiotic bacteria, namely *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc Mesenteroides Ssp Mesenteroides*, in presence of BBG or glucose as sole source of carbon were determined according to modified method of Das et al [19]. The overnight grown probiotic bacterial culture (1.5×10^8 CFU/mL) was inoculated separately to the 10 ml MRS broth, containing 1% (w/v) of glucose (as positive control) or 1% (w/v) BBG and incubated at 37 °C under anaerobic conditions for 24 h. The growth of the bacterial culture was classified as CFU/mL, by counting colonies, which appeared on spreading 100 μL of culture after 24 h of incubation on MRS agar plate, and the plates were incubated at 37 °C for 18 h. The prebiotic activity assay was expressed as total counts of probiotic bacteria (log 10 CFU/mL).

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate (n = 3) and data are presented as mean \pm SD. The concentration giving 50% inhibition (IC₅₀) was calculated with Microsoft Excel 2013 and Kaleida Graph version. The dose–response curve was obtained by plotting the percentage inhibition versus concentration. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) using XLSTAT. Significant differences between means were determined by Turkey method and differences at the level $P < 0.05$ were considered to be significant.

Results & Discussion

Extraction and recovery of β -glucan

Yield of gum product represent the weight of gum obtained from 100 g of whole barley flour. In this experiment, yield of gum

was 4.99 ± 0.21 %. This pellet did not represent the whole quantity of β -glucan isolated (In addition to β -glucan, this gum also contained some impurities such as fat, protein, starch and minerals). To determine the efficiency of extraction method, β -glucan recovery (wt. of β -glucan in gum product/wt. of β -glucan in 50g flour) should be calculated. The percentage of recovery was identified and it was found to be of 79.29 ± 2.48 %. The extraction of the BBG was carried out at a pH of 7 and a temperature of 55°C . Several studies have shown that the yield of the extraction is strongly linked to the extraction conditions (extraction solvent, T° and pH) [10] found that there was an increase with T° in the percentage of β -glucan recovered at pH 7.0 and 8.0 and decreased at higher pH (9-10). The extraction procedures used by [20] are characterized by the addition of a refluxing step with ethanol at 80%. Highest recovery (83.1%) was obtained in hot water extraction method followed by 81.4% and 80.4% in enzymatic and acidic extraction process. Least recovery (78.1%) was obtained in alkaline extraction process.

Determination of total phenolics and flavonoid contents

Phenolic compounds may contribute directly to antioxidative action. They are also very important plant constituents because their hydroxyl groups confer scavenging ability. The total phenolics content of BBG was determined by Folin-Ciocalteu assay and expressed in terms of microgram of gallic acid equivalent GAE/mg. Using the standard curve of gallic acid ($R^2 = 0.7152$). The total phenolic content of BBG was 76.47 ± 2.12 μg GAE/mg. Thondre et al revealed that the extraction of phenolic compounds in barley β -glucan with 70% methanol gave better yield than 70% ethanol [21]. The flavonoid content determined by the aluminum nitrate method for BBG was reported in μg equivalent quercetin /mg ($R^2 = 0.9867$). The results show that BBG have flavonoid content (47.06 ± 2.12 μg QE/mg) (Table 1). Based on these data, it can be deduced that the flavonoids represent 61.54% of the total phenols in the methanol extract. The study achieved by Keddari et al revealed that the amounts of the flavonoids in soluble dietary fiber and insoluble dietary fiber extracts from durum wheat bran were 0.52 ± 0.012 and 0.46 ± 0.119 mg EQ/g, respectively [22]. The content of polyphenol and flavonoids in cereals is largely affected by species, variety, environmental factors and extraction methods.

Antioxidant activity

Evaluation of the antioxidant power of the various extracts is carried out by the DPPH test, which is considered to be a relatively stable free radical. The discoloration of DPPH is directly proportional to the ability of bioactive molecules to reduce it. The DPPH scavenging activity of BBG at different concentrations and alpha-tocopherol as standard are represented in Ta-

ble 2. From these results, it can be seen that the BBG showed 50% inhibition IC_{50} at a concentration of 4018.16 ± 656.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The levels of inhibition of DPPH recorded in the presence of the various concentrations of BBG are lower than observed with standard BHA, BHT and α -Tocopherol (6.14 ± 0.41 , 12.99 ± 0.41 & 13.02 ± 5.17 respectively). Shah et al reported that the β -glucan from oat and barley at a concentration of 20 mg/mL produced 20.96 and 15.22 % scavenging effect which increased up to 52.23 and 47.31 % at 100 mg/mL respectively but were less in comparison to that of the standard α -tocopherol (69.28%), at the same concentration [13].

According to Kozarski et al, carbohydrates have a low antioxidant power, due in large part to the presence of hydrogen in their structure. In the case of carbohydrate polymers, where the monosaccharides are linked together by glycosidic linkages, this activity increases (multiplier effect), but it is still relatively low [23]. Wang et al reported that the scavenging effect is much more effective while the hydroxyl groups in polysaccharide are substituted by carboxymethyl or sulfate groups [6]. It illustrates that the presence of sulfate groups and carboxymethyl groups acting on β -glucan can enhance the antioxidant capability comparing with any compounds with single sulfate or carboxymethyl groups.

The ABTS assay is based on the generation of a blue/green ABTS^+ that can be reduced by antioxidants and the decolorization reflects the capacity of an antioxidant to donate electrons or hydrogen atoms to deactivate the radical species. The results shown in Table 2 indicate that BBG demonstrate high ABTS+ scavenging effects. The IC_{50} value of the BBG was found to be 529.1 ± 26.37 when compared with standard BHA and BHT (IC_{50} 1.81 ± 0.10 & 1.29 ± 0.30 respectively). Khan et al reported an increase in the ABTS scavenging activity with the increase in the concentration of irradiated β -glucan and the degree of irradiation [24].

The antioxidant potential of a plant extract can be evaluated by determining the ability to inhibit β -carotene oxidation. Table 2 shows the total antioxidant activity of the extracts of BBG compared with BHT and BHA as standards. Total antioxidant activity increased with increasing amount of BBG in the reaction. All the concentrations tested of BBG showed lower antioxidant activity than BHT and BHA. The BBG showed 50% inhibition at a concentration of $161,01 \pm 13,32$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, whereas standard BHA and BHT with IC_{50} value of 1.05 ± 0.03 and 0.91 ± 0.01 respectively. These results are similar to those observed by Nandi et al with an inhibition of 68 % at 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and IC_{50} at concentration of 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [25]. The β -carotene-linoleic acid method is important to understand the type of H-donor antioxidant and the level of inhibition of lipid peroxida-

tion [26]. This method is also important to understand the antioxidants responsible for singlet oxygen scavenging causing radicals in lipids.

The Antioxidant Copper Reduction Capacity Test (CUPRAC) is a method of measuring the antioxidant potential used for a wide variety of polyphenols, including acids Phenolics, hydroxycinnamic acids, flavonoids, carotenoids, anthocyanins, as well as thiols and synthetic antioxidants, vitamins C and E [14]. The cupric reducing antioxidant capacity of the BBG is shown in Table 2, with the increase in concentration, there is an increase in the absorbance of the samples thus, increased percentage reduction. The reducing antioxidant capacity of BBG was much weaker than those of BHA and BHT. The BBG concentration corresponds to the absorbance 0.5 was $529.79 \pm 48.65 \mu\text{g/mL}$, whereas absorbance 0.5 of BHA and BHT was $5,35 \pm 0.71$ & 8.97 ± 3.94 respectively. Haghshenas et al reported that β -glucan addition in shrimp nugget formulation exhibited increasing significantly ($p < 0.05$) antioxidant activity [27]. TEACCUPRAC value of free phenolic extract of the sample with β -glucan and control sample were 3.12 and 1.02 mmol trolox/g sample respectively.

The antioxidant activity of the BBG was evaluated using the FRAP method. The results are shown in Table 2. The reducing power capacity increased with the amount of BBG in the mixture. The BBG concentration which gives the absorbance was $359.88 \pm 63.64 \mu\text{g/mL}$. These results were weakly compared to the standards used in this study (ascorbic acid, alpha-tocopherol and tannic acid), which showed concentrations corresponding to 0.5 absorbance equal to 6.77 ± 1.15 , 34.93 and $5.39 \pm 0.91 \mu\text{g/mL}$ respectively. Several previous studies have proven the reducing power of β -glucan from different sources, Nandi et al reported that the B -glucans from from edible mushroom *Russulaalbionigra*, at concentration of $500 \mu\text{g/ml}$ showed reducing power of 0.5 [25]. This result suggests that BBG has power to provide electron to reactive free radicals, converting them into more stable non-reactive molecules

Superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) is one of the six major reactive oxygen species (ROS) causing oxidative damage to cellular components as it is the precursor of several reactive species [3, 26]. Therefore, superoxide radical scavenging assay is very important to reveal potential antioxidant property. In this assay the concentration of superoxide concentration is proportional to the color intensity at 560 nm. Table 2 shows the superoxide radical scavenging activity of different concentrations of BBG. The BBG showed a dose-response relationship. The IC₅₀ value of BBG was found to be a $345.26 \pm 62.32 \mu\text{g/mL}$; the IC₅₀ value of alpha tocopherol and tannic acid are 31.52 ± 2.22 & 7.59 ± 1.16 respectively. In a study published by Wang et al. car-

ried out on three derivatives of β -glucan. The results show that the scavenging of the radical superoxide increased with the concentration increasing and can reached 69.68 % for the carboxyl-methyl (1-3)- β -d-glucan sulfatederivative at a concentration of $1600 \mu\text{g/mL}$ [6].

The hydroxyl assay shows the capacities of BBG to inhibit hydroxyl radical. In our protocol, Hydroxyl radicals were generated by Fenton reaction (Fe^{2+} -ascorbate- H_2O_2 system). The BBG exhibited obvious scavenging activity on hydroxyl radical in a concentration-dependent manner. The IC₅₀ value of the BBG was determined $2268,38 \pm 101.57 \mu\text{g/mL}$. The β -glucan extracted from edible mushroom *Entolomalividoalbum* studied by Maity et al exhibited an IC₅₀ for the Hydroxyl radical scavenging ability at $400 \mu\text{g/mL}$ [28]. Kofuji et al reported that pectin from apple or citrus, chitosan, and xanthan gum which are used as food additives showed hydroxyl radical scavenging activity inferior to that of β -glucan extracted from barley [29].

Table 1 Total Phenolic and Flavonoid content in BBG

Compound	Total phenolic content $\mu\text{g GAE/mg dried extract}$	Total Flavonoid Content $\mu\text{g QE/mg dried extract}$
β -Glucan	76.47 ± 2.10	47.06 ± 2.12

A IC₅₀ and A0.50 values expressed are means \pm SD of three parallel measurements ($p < 0.05$). B Reference compounds: BHA: butylated hydroxyanisole; BHT: butylated hydroxytoluene.

Determination of anticholinesterase activity

Several pathogenic pathways are implicated in the progression of Alzheimer's disease (AD) such as cholinergic deficit and oxidative stress. The brain of AD patients presents several signs of free radical attacks such lipid peroxidation, protein oxidation, damage to mitochondrial and nuclear DNA [30]. However, the antioxidants may reduce the Alzheimer's disease progression and minimize the neuronal degeneration by inhibition of the cholinesterase enzymes [31]. The BBG was further evaluated for its AChE and BChE inhibitory activities using the modified Ellman's colorimetric method in a 96-well microplate. Galantamine was used as the standard. In comparison with the standard, BBG showed a low activity compared to the standard. BBG showed IC₅₀ $859.164 \pm 64.46 \mu\text{g/ml}$ compared to galantamine ($6.27 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$) (Table 3). This finding is in accordance with the previous reported by Haider et al [5]. In this study, β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* exhibited dose dependent inhibition of AChE enzyme, at initial concentration of 20 mg/ml, β -glucan showed a percentage inhibition at 70%. The

Table 2 Antioxidant activity of BBG

Com- pound	DPPH assay (IC 50 $\mu\text{g/mL}^a$)	ABTS assay (TEAC value) (IC 50 $\mu\text{g/mL}^a$)	β -carotene bleaching assay (IC 50 $\mu\text{g/mL}^a$)	Cupric assay $A_{0.5}$ $\mu\text{g/mL}^a$	FRAP assay $A_{0.5}$ $\mu\text{g/mL}^a$	DMSO Alkaline assay (IC 50 $\mu\text{g/mL}^a$)	Hydroxy Scavenging activity IC50 $\mu\text{g/ml}^a$
β - Glucan	4018.61 ± 656.69	529.91 ± 26.37	161.013 ± 13.322	529.79 \pm 48.65	359.88 ± 63.64	345.26 \pm 62.32	2268.38 \pm 101.57
BHA ^b	6.14 \pm 0.41	1.81 \pm 0.10	1.05 \pm 0.03	5.35 \pm 0.71	-	-	-
BHT ^b	12.99 \pm 0.41	1.29 \pm 0.30	0.91 \pm 0.01	8.97 \pm 3.94	-	-	-
Alpha Tocopherol ^b	13.02 \pm 5.17	-	-	-	34.93 \pm 2.3 8	31.52 \pm 2.22	-
Ascor- bic acid	-	-	-	-	6.77 \pm 1.15	7.59 \pm 1.16	-
Tanni- c acid	-	-	-	-	5.39 \pm 0.91	-	-

IC₅₀ value of β -glucan was found to be $680 \pm 80 \mu\text{g/mL}$. The BChE inhibitory activity of the BBG was increased with increasing concentration. Galantamine as positive control, showed the best percent inhibition at all concentrations and at different times. IC₅₀ value of BBG was $725,470 \pm 30.95 \mu\text{g/ml}$, while that of galantamine was $34.75 \pm 1.99 \mu\text{g/mL}$ (Table 3). These results show that BBG could interact with both enzymes with different degrees of inhibition. It has been previously found that the BChE is an enzyme that can accept a wide range of substrates over AChE, because of its low substrate specificity [32]. The active site of the AChE is composed of several phenylalanine residues which makes the catalytic pocket very narrow and therefore does not accept larger substrates, and would be preferable for the small substrates. In contrast, the BCHE which has a catalytic site rich in small amino acids residues (valine and leucine), making it able to hydrolyze larger substrates even in excess. This property of the two enzymes gives the BCHE the ability to cleave various esters, including those with larger acyl fragments, while AChE is an esterase with more specificity for ACh due to its structure but has a low ability to remove esters with larger acyl fragments. Consequently, in this experiment, the strong inhibition of BChE compared to that of AChE by BBG could be explained by the structural difference of their active site.

***In-vitro* Yeast α -Glucosidase Inhibition Assay**

Alpha-glucosidase is a key enzyme involved in carbohydrate metabolism in the gut that represents one of the therapeutic approaches to fighting type 2 diabetes. In this study, we tested the ability of BBG to inhibit α -glucosidase activity in-vitro, and consequently a possible antidiabetic effect. The inhibitory effect of BBG against α -glucosidase is shown in Table 3. The BBG showed inhibition effect to α -glucosidase activity at dose-dependent manner. However, IC₅₀ value of BBG was $2986.79 \pm 37.05 \mu\text{g/mL}$ and that of acarbose was $115.22 \pm 10.91 \mu\text{g}$

/mL. These finding showed that BBG has a low inhibitory activity compared to acarbose. Dong et al, found that the activity of three intestinal disaccharidases (sucrase, lactase and maltase) is inhibited by oat β -(1,3)(1,4)-glucans in a dose-dependent manner in-vivo and in-vitro [33]. Brockman et al have demonstrated the effect of Barley beta glucan on postprandial blood glucose; this effect could be explained by its possible effect on the activity of intestinal α -glucosidase in addition to its effect on glucose absorption in the intestine [34].

Table 3 Enzyme inhibition activity by BBG

Compound	AChE (IC50 $\mu\text{g/mL}^a$)	BChE (IC50 $\mu\text{g/mL}^a$)	α -Amylase inhibitory activities (IC50 $\mu\text{g/mL}^a$)
B Glucan	859.164 ± 64.46	725.470 ± 30.95	2986.785 ± 37.046
Galantamine^b	6.27 \pm 1.15	34.75 \pm 1.99	-
Acarbose	-	-	115.221 \pm 10.911

a IC₅₀ values expressed are means \pm SD of three parallel measurements ($p < 0.05$). b Reference compounds: Galantamine and Acarbose

***In-vitro* prebiotic potential of BBG**

Prebiotics are mostly fibers that are non-digestible food ingredients and beneficially affect the host's health, by selectively stimulate the beneficial microbiota, and potentially suppress the harmful bacteria dominant [35]. There are several in-vitro tests used to screen and classify a food ingredient as a prebiotic, such as; 1) Resistant to the actions of acids in the stomach, bile salts and other hydrolyzing enzymes in the intestine, 2) Should not be absorbed in the upper gastrointestinal tract, 3) Be easily fermentable by the beneficial intestinal microflora and 4) stimulating the growth and/or activity of some genera of microorganisms in the colon that promote

gut health [35]. In-vitro anaerobic fermentation of BBG by two lactic acid bacteria, namely *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* are shown in table 4. The growth of these lactic acid bacteria in presence of BBG and glucose were comparable at 37°C after 12 and 24 h incubation ($p > 0.05$). The results showed that the β -glucan extract from barley stimulated the growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*, by increasing its number from 08.14 ± 0.024 to 10.45 ± 0.009 and 7.99 ± 0.021 to 10.21 ± 0.021 log₁₀ CFU/ml, respectively. It has been reported that the end products of fermentation, the SCFAs butyrate, acetate, and propionate, are considered to benefit the gut in many different ways. SCFAs production in the intestinal tract will lower the colonic pH, which limits growth of pathogens. These SCFA also supplied energy for colonic epithelium and modulation of cholesterol and lipid metabolism [9]. The data suggested that β -glucan extracts from barley had ability to be prebiotics for these lactic acid bacteria.

Table 4 In-vitro prebiotic potential of BBG

Bacteria	Glucose ^a		
	0 h	12 h	24 h
<i>Lactococcus lactis</i>	08.14±0.024	09.57±0.018	10.51±0.012
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	07.99±0.021	09.12±0.032	10.18±0.019
	BBG ^a		
	0 h	12 h	24 h
<i>Lactococcus lactis</i>	08.14±0.024	09.26 ±0.036 ^b	10.45±0.009 ^b
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	07.99±0.021	09.02±0.021 ^b	10.21±0.028 ^b

^aMean bacterial count \pm standard error ($n=3$), ^b significantly different from the population at 0 h ($P \leq 0.05$).

Conclusions

Results indicated that the β -glucan extracted from Saida 183 barley variety has weak ability to scavenging free radical DPPH and weakly activity to ferric reducing power in contrast to that to ABTS. Moreover, the BBG showed a moderate activity toward a lipid peroxidation in the beta-carotene bleaching and cation bivalent chelation in CUPRAC method. These results indicated that wheat bran dietary fiber may replace synthetic antioxidant in food formulations and play a major role in human health. The present study provides the cognition enhancing potential of β -glucan by inhibiting ACHE activity. It can be considered as economic therapeutic option against cognitive disorders associated with decline in cholinergic neurotransmission. Additionally moderate alpha glucosidase inhibition activity has been reported this demonstrate as BBG as antidiabetic agent. In

this work we reported the prebiotic action β -D-glucan of cereal origin on two probiotic LAB strains (*Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*). In particular, our results showed that all the investigated bacterial strains were able to use BBG as a substrate for their growth. Moreover, BBG could stimulate the growth of probiotic bacteria, namely. This study strongly proved that BBG can be used as a prebiotic ingredient in food industry to modulate intestinal microbiota into health beneficial direction.

Authors' contributions

Saad Mebrek performed the experiments and wrote the paper, Hanene Djeghim performed the experiments, Yamina Mehdi and Asma Meghezzi reviewed the data, Anwar Sirajudheen analyzed, reviewed and wrote the paper, Ali Awadh A. Nasser reviewed the paper, and Mohammed Benali conceived idea and designed the work.

Acknowledgements

This research was supported by the Center of Biotechnology Research (CRBt) of Algeria and biotoxicology laboratory of Sidi Bel-Abbes University, Algeria. The authors wish to express their gratitude to Mr. Bensouici Chawki (CRBt), Djamil Boularbague, Kheira Guenaoui and Sihem Mekiou, life sciences and nature faculty, Sidi Bel-Abbes University, Algeria, for their technical assistance.

Author details

¹Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, Laboratory of Biotoxicology, University of Djilali Liabes, Sidi Bel Abbes 22000, Algeria. ²Ali Mendjli Nouvelle ville UV 03, Constantine 25000, Biotechnology Research Centre, Algeria. ³Institute of Sciences, Nour elbachir University Center, Department of Biology, AL Bayadh 32000, Algeria. ⁴Department of Medicinal Chemistry, College of Clinical Pharmacy, Pharmacology and Toxicology unit, Albaha University Albaha, Kingdom of Saudi Arabia. ⁵Department of Pharmacognosy, Albaha University, College of Clinical Pharmacy, Albaha, Kingdom of Saudi Arabia.

References

- [1] Rahar S, Swami G, Nagpal N, Nagpal MA, Singh GS. Preparation, characterization, and biological properties of beta-glucans. *J Adv Pharm Technol Res.* 2011;2(94-103).
- [2] Tada R, Tanioka A, Iwasawa H, Hatashima K, Shoji Y, K-i I, et al. Structural characterisation and biological activities of a unique type β -D-glucan obtained from *Aureobasidium pullulans*. *Glycoconj J.* 2008;25(9):851-861.

- [3] Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA; 2015;944.
- [4] Tsiapali E, Whaley S, Kalbfleisch J, Ensley HE, Browder IW, Williams DL. Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(4):393-402.
- [5] Haider A, Inam W, Khan SA, Mahmood W, Abbas G. β -glucan attenuated scopolamine induced cognitive impairment via hippocampal acetylcholinesterase inhibition in rats. *Brain Res*. 2016;1644:141-148.
- [6] Wang Q, Chen S, Han L, Lian M, Wen Z, Jiayinaguli T, Liu L, Sun R, Cao Y. Antioxidant activity of carboxymethyl (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan (from the sclerotium of *Poria cocos*) sulfate (in vitro). *Int J Biol Macromol*. 2014;69:229-235.
- [7] Shah A, Ahmad M, Ashwar BA, Gani A, Masoodi FA, Wani IA, Wani SM, Gani A. Effect of γ -irradiation on structure and nutraceutical potential of β -d-glucan from barley (*Hordeum vulgare*). *Int. J Biol. Macromol*. 2015;72:1168-1175.
- [8] Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM, Bressollier P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Sci Technol*. 2013;50(1):1-16.
- [9] Belobrajdic DP, Jobling SA, Morell MK, Taketa S, Bird AR. Wholegrain barley β -glucan fermentation does not improve glucose tolerance in rats fed a high-fat diet. *Nutr Res*. 2015;35(2):162-168.
- [10] Temelli F. Extraction and functional properties of barley β -glucan as affected by temperature and pH. *J Food Sci*. 1997;62(6):1194-1201.
- [11] Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY, Lee CY. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J Agric Food Chem*;22(6509-6515).
- [12] Öztürk M, Duru ME, undefined Kivrak, N MD, A T, MA Ö. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(6):1353-1360.
- [13] Shah A, Gani A, Masoodi F, Wani SM, Ashwar BA. Structural, rheological and nutraceutical potential of β -glucan from barley and oat. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibres*. 2017;10:10-16.
- [14] Özyürek M, Güçlü K, Tütem E, Başkan KS, Erçağ E, Celik SE, Baki S, Yıldız L, Karaman Ş, Apak R. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Anal. Methods*. 2011;3(11):2439-2453.
- [15] Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos*. 2002;8(3):121-137.
- [16] Rajamanikandan S, Sindhu T, Durgapriya D, Sophia D, Ragavendran P, Gopalakrishnan V. Radical scavenging and antioxidant activity of ethanolic extract of *Mollugo nudicaulis* by invitro assays. *Ind J Pharm Educ Res*. 2011;45(4):310-316.
- [17] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*; 1961;7(2):88IN191-9095.
- [18] Zhang J, Zhao S, Yin P, Yan L, Han J, Shi L, et al. α -Glucosidase inhibitory activity of polyphenols from the burs of *Castanea mollissima* Blume. *Molecules*. 2014;19(6):8373-8386.
- [19] Das D, Baruah R, Goyal A. A food additive with prebiotic properties of an α -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *Int J Biol Macromol*. 2014;69:20-26.
- [20] Ahmad A, Anjum FM, Zahoor T, Nawaz H, Din A. Physicochemical and functional properties of barley β -glucan as affected by different extraction procedures. *Int J Food Sci Technol*. 2009;44(1):181-187.
- [21] Thondre P, Ryan L, Henry C. Barley β -glucan extracts as rich sources of polyphenols and antioxidants. *Food Chem*. 2011;126(1):72-77.
- [22] Keddari S, Benaoum N, Boufadi Y, Belhocine M, Riazi A. Antioxidant Activity and in vitro Fermentation of Dietary Fiber Extracts from Durum Wheat. *Bran J Food Nutr Res*. 2016;4(8):508-514.
- [23] Kozarski M, Klaus A, Nikšić M, Vrvic MM, Todorović N, Jakovljević D, et al. Griensven LJ. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *J Food Compost Anal*. 2012;26(1):144-153.
- [24] Khan AA, Gani A, Masoodi F, Amin F, Wani IA, Khanday FA, et al. Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of β -d-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)—Effect of γ -irradiation. *Carbohydr Polym*. 2016;140:442-450.
- [25] Nandi AK, Samanta S, Maity S, Sen IK, Khatua S, Devi KSP, Acharya K, Maiti TK, Islam SS. Antioxidant and immunostimulant β -glucan from edible mushroom *Russula albonigra* (Krombh.) Fr. *Carbohydr. Polym*. 2014;99:774-782.
- [26] Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*;p. 2005-53.
- [27] Haghshenas M, Hosseini H, Nayeibzadeh K, Kakesh BS, Mahmoudzadeh M, Fonood RK. Effect of beta glucan and carboxymethyl cellulose on lipid oxidation and fatty acid composition of pre-cooked shrimp nugget during storage. *LWT-Food Sci. Technol*. 2015;62(2):1192-1197.
- [28] Maity P, Sen IK, Maji PK, Paloi S, Devi KSP, Acharya K, Maiti TK, Islam SS. Structural, immunological, and antioxidant studies of β -glucan from edible mushroom *Entoloma lividoalbum*.

- Carbohydr. Polym. 2015;123:350-358.
- [29] Kofuji K, Aoki A, Tsubaki K, Konishi M, Isobe T, Murata Y. Antioxidant activity of β -glucan. *ISRN Pharmaceutics*. 2012;2012..
- [30] Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am. J. Alz Dis*. 2000;71(2):621-629.
- [31] Hafsa MB, Ismail MB, Garrab M, Aly R, Gagnon J, Naghmouchi K. Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and anticholinesterase activities of water-soluble polysaccharides extracted from microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata*. *J Serb Chem Soc*. 2017.
- [32] Orhan I, Naz Q, Kartal M, Tosun F, Şener B. In vitro anticholinesterase activity of various alkaloids. *Z Naturforsch [C]*. 2007;62(9-10):684-688.
- [33] Dong J, Cai F, Shen R, Liu Y. Hypoglycaemic effects and inhibitory effect on intestinal disaccharidases of oat beta-glucan in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food Chem*. 2011;129(3):1066-1071.
- [34] Brockman DA, Chen X, Gallaher DD. Consumption of a high β -glucan barley flour improves glucose control and fatty liver and increases muscle acylcarnitines in the Zucker diabetic fatty rat. *Eur. J Nutr*. 2013;52(7):1743-1753.
- [35] Gibson GR, Probert HM, Van Loo J, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 2004;17(2):259-275.

ان انتشار مرض السكري أخذ في الارتفاع على المستوى العالمي. ومن المعروف أن الإجهاد التأكسدي الناتج عن مرض السكري يؤثر على الكبد والبنكرياس والكليتين والأعضاء التناسلية بشكل مرضي. وقد أثبتت عدة دراسات سابقة أن البروبيوتيك والألياف الغذائية (البريبايوتك) دورا هاما في علاج مرض السكري ومضاعفاته. في هذا السياق، فإن الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تأثير مركب بيتا جلوكان المستخرج من الشعير (BBG) وثلاث سلالات من الخمائر اللبنية (LAB) المعزولة من حليب الإبل كل على حدا أو مع بعضها على نسبة السكر في الدم والدهون، فضلا عن المعلمات البيوكيميائية على ذكور الجرذان الطبيعية لسلالة Wistar أو الجرذان المصابة بمرض السكري من جراء حقن الجرذان بمادة الستيروئيدوتوسين. تم تقسيم ستة وثلاثون جرذ إلى ستة مجموعات كالاتي : المجموعة السلبية الشاهدة (الجرذان غير المصابة بداء السكري دون علاج) ، المجموعة الايجابية الشاهدة (الجرذان المصابة بداء السكري دون علاج) ، مجموعة الميتفورمين (الجرذان المصابة بداء السكري المعالجة بـ 200 ملغم/كغم من وزن الجسم من الميتفورمين) ، مجموعة LAB (الجرذان المصابة بداء السكري المعالجة بـ 10^{+8} CFU/mL) ، المجموعة BBG (الجرذان المصابة بداء السكري المعالجة بـ 50 مجم/كغم من وزن الجسم) ، ومجموعة COMB المعالجة مع كلا المركبين (الجرذان المصابة بداء السكري المعالجة بـ 50 مجم BBG / كجم من وزن الجسم + LAB 10^{+8} CFU/mL) لمدة أربعة أسابيع. في نهاية التجربة، تتم التضحية بالجرذان واخذ عينات من الدم لإجراء التحاليل. أظهرت النتائج أن جميع العلاجات قد خفضت من نسبة السكر في الدم إلى حوالي 02 غم/لتر بعد 4 أسابيع من العلاج. كان لعلاج BBG تأثير مهم جدا على الحالة الدهنية من خلال زيادة HDL-CHL وخفض الكوليسترول الكلي والدهون الثلاثية والدهون LDL-CHL وبالتالي خفض خطر الإصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية، لوحظ نفس التأثير الإيجابي لنسبة اليوريا والكرياتينين في الدم. المجموعة التي عولجت مع LAB ومجموعة COMB كان لها أيضا تأثير إيجابي على جميع المواد الدهنية وكذلك نسبة اليوريا في الدم ومستويات الكرياتينين. ويلاحظ أيضا وجود تأثير إيجابي على أنزيمات الكبد (ALAT و ASAT) ولكن من دون أي تأثير ذو دلالة إحصائية. سجلت مجموعة COMB انخفاضا ملحوظا في تركيز C3 ونسبة N/L ، على عكس LAB ، التي ليس لها تأثير كبير على هذين المتغيرين. لا يكشف تحليل نسبة الببتيد C عن أي تأثير للعلاجات المختلفة على هذا المعامل وبالتالي لا يؤثر على وظائف خلايا بيتا في البنكرياس. في الختام، لدى BBG و LAB تأثيرات على نسبة السكر الدم للجرذان المصابة بداء السكري بالإضافة إلى المضاعفات الأخرى، في حين أن ارتباطها لا يُظهر أي تأثير تآزري كبير على التحاليل المدروسة.

الكلمات المفتاحية: بيتا-جلوكان الشعير، الخمائر اللبنية، حليب الإبل، داء السكري، تأثير تآزري، ستربتوزوتوسين، جرذان سلالة Wistar

Abstract

The global prevalence of diabetes mellitus is rising. It is known that the oxidative stress induced by diabetes affects the liver, pancreas, kidneys and reproductive organs pathologically. It has been suggested that probiotics and dietary fiber as prebiotics play an important role in the management of diabetes and their complications. In this context, the objective of this study is to evaluate the effect of the administration of beta-glucan extracted from barley (BBG) and three strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from camel milk, alone or associated, on glycemic and lipid metabolism as well as biochemical parameters on normal Wistar male rats or streptozotocine induced diabetic rats. Thirty-six male rats were divided into 06 groups: negative control (non-diabetic rats untreated), positive control (diabetic rats without treatment), metformin group (diabetic rats treated with 200 mg/kg BW of metformin), LAB group diabetic rats treated with 10^{+8} CFU/mL, BBG group (diabetic rats treated with 50 mg/kg BW), and COMB group treated with both compounds (diabetic rats treated with 50 mg/kg BW + 10^{+8} CFU/mL) for four weeks. At the end of the experiment, the rats are sacrificed and the blood is removed. The results show that all treatments decreased hyperglycemia to about 02 g/L after 4 weeks. BBG had a very significant effect on lipid status by increasing HDL-CHL and decreasing total cholesterol, triglycerides and LDL-CHL and therefore the risk of cardiovascular disease, the same positive effect is observed for blood dosage of urea and creatinine. The group treated with LAB and the COMB group also had a positive effect on all lipid parameters as well as serum urea and creatinine levels. A positive effect on liver enzymes (ASAT and ALAT) is also observed in all treated groups without any statistically significant difference. The COMB group recorded a significant decrease in the C3 complement concentration and the Neutrophils/Lymphocytes (N/L) ratio, unlike LAB, which have no significant effect on these two parameters. The serum determination of the C-peptide reveals no effect of the different treatments on this parameter and consequently no effect on the functions of the beta cells of the pancreas. In conclusion, BBG and LAB have effects on hyperglycemia in diabetic rats as well as other complications, whereas their association shows no significant synergistic effect on the studied parameters.

Key words: Barley beta-glucans, lactic acid bacteria, camel milk, diabetes, synergetic effect, rat Wistar, streptozotocine.

Résumé

La prévalence mondiale du diabète sucré est en hausse. On sait que le stress oxydatif induit par le diabète affecte le foie, le pancréas, les reins et les organes reproducteurs pathologiquement. Il a été suggéré que les probiotiques et les fibres alimentaires en tant que prébiotiques jouent un rôle important dans la gestion du diabète et de ses complications. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de l'administration de bêta-glucane extrait de l'orge (BBG) et trois souches de bactéries lactiques (LAB) isolées du lait de chamelle, seuls ou associés, sur l'équilibre glycémique et le métabolisme lipidique ainsi que des paramètres biochimiques sur des rats mâles Wistar normaux ou rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine. Trente-six rats mâles sont répartis en 06 groupes : contrôle négatif (rats non diabétiques non traités), contrôle positif (rats diabétiques sans traitement), groupe metformine (rats diabétiques traités avec 200 mg/kg P.C. de metformine), groupe LAB (rats diabétiques traités avec 10^{+8} UFC/mL), groupe de BBG (rats diabétiques traités avec 50 mg/kg P.C.), et groupe COMB traité par les deux composés (rats diabétiques traités avec 50 mg/Kg P.C. + 10^{+8} UFC/mL) pendant quatre semaines. A la fin de l'expérimentation, les rats sont sacrifiés et le sang est récupéré. Les résultats montrent que tous les traitements ont entraîné une diminution de l'hyperglycémie à environ 02 g/L au bout de 04 semaines. Le BBG a un effet très significatif sur le bilan lipidique en augmentant le HDL-CHL et en diminuant le taux de cholestérol total, les triglycérides et le LDL-CHL et par conséquent le risque des maladies cardiovasculaires. Le même effet positif est observé pour le dosage sanguin de l'urée et la créatinine. Le groupe traité par les LAB et le groupe COMB ont connu aussi un effet positif sur tous les paramètres lipidiques ainsi que les taux sériques de l'urée et la créatinine. Un effet positif sur les enzymes hépatiques (ASAT et ALAT) est également observé chez tous les groupes traités sans aucune différence statistiquement significative. Le groupe COMB enregistre une diminution significative dans la concentration du complément-C3 ainsi que le rapport Neutrophiles/Lymphocytes (N/L) contrairement aux LAB qui n'ont aucun effet significatif sur ces deux paramètres. Le dosage sérique du peptide-C ne révèle aucun effet des différents traitements sur ce paramètre et par conséquent aucun effet sur les fonctions des cellules bêta du pancréas. En conclusion, le BBG et les LAB ont des effets sur l'hyperglycémie chez les rats diabétiques ainsi que sur d'autres complications, alors que leur association ne montre aucun effet synergique significatif sur les paramètres étudiés.

Mots clés : Bêta-glucane de l'orge, bactéries lactiques, lait de chamelle, diabète, effet synergique, rat Wistar, streptozotocine.