

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Dr Tahar Moulay – Saida
Faculté des Sciences
Département de Biologie



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : "Biochimie et Physiologie Cellulaire"

Thème

**Contribution à la recherche de l'impact de quelques
lactobacilles et bifidobactéries sur la flore intestinale
du rat Wistar.**

Présenté par :

- Mlle Benchaib Imene
- Mlle Selmoun Fatna

Soutenu le : 16 Juin 2015 devant la commission de jury composée de :

Président	: M Halla Nouredine	Maitre assistant A	Université de Saida.
Examineur	: M Benreguig Mokhtar	Maitre de conférence B	Université de Saida.
Examineur	: M Ammam abdelkader	Maitre assistant A	Université de Saida.
Encadreur	: Mlle Amara Sabrina	Maitre assistant B	Université de Saida.

Année universitaire : 2014 – 2015

Remerciements

Avant tout nous remercions « Allah » tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*J'adresse mes plus vifs remerciements à notre encadreur **Melle AMARA SABRINA** maitre assistante à l'université de Saida, pour m'avoir proposé ce sujet, pour ses conseils scientifiques judicieux et son suivi durant la période de réalisation de ce travail malgré ses charges professionnelles.*

Je remercie vivement les membres de jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail et plus particulièrement :

*Monsieur **Halla Nouredine** qui nous fait aujourd'hui le grand honneur de présider le jury de notre mémoire malgré ses diverses activités, qu'il nous soit permis de lui exprimer notre profonde reconnaissance et notre haute considération.*

*Monsieur **Benreguig Mokhtar**, pour avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examineur, nous sommes reconnaissantes pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et nous tenons à lui exprimer à cet égard nos sincères remerciements.*

*Monsieur **Ammam Abdelkader**, qui a bien voulu faire partie du jury en qualité d'examineur de notre travail, nous vous remercions de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail, je vous prie de croire en mon éternel respect et ma sincère gratitude.*

Nous remercions également tous nos professeurs qui nous ont enseigné durant notre cursus universitaire à la faculté de biologie.

Aussi nous tenons à remercier nos collègues d'étude, particulièrement ceux de notre promotion.

Enfin, nous remercions tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci.

Dédicace

Avec une énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie mon travail à mes très chers, respectueux et magnifiques parents qui m'ont soutenus tout au long de ma vie ainsi à mon frère, et en particulier à mon encadreur M^{elle} Amara Sabrina.

A ma chère fiancée Samy pour ton soutien et ta compréhension.

A mes chers amis : Fatima, ismahane, chahinaz, nasima qui mont accompagné dans la réalisation de ce travail.

A toute ma famille et à tous ceux qui m'ont, jusqu'à ce jour, soutenu avec peine et courage.

Ainsi a toutes personnes qui m'ont encouragé et soutenu durant mo parcours scolaires et académique.

IMENE

Dédicace

*Je rends grâce a «ALLAH » le tout puissant pour tout le bien fait dont
il m'a comblé.*

Ce mémoire ayant été rédigé, je le dédie :

*A mes chers parents : ma mère et mon père, je vous aime beaucoup
pour m'avoir soutenu tout au long de mes études, qu'ALLAH le tout
puissant vous bénisse.*

*Particulièrement a mes frères : sofiane, houssem Eddine et a mes
sœurs : zineb, karima, aya, ikram beaucoup souffert pour que je
réussisse dans mes études.*

A tout mes cousins, mes cousines et mes oncles.

A mes amis : fatna, soumia, souria, imene.

A tout la promotion de master 2014-2015.

A tout les personnes qui m'ont aidé au long des mes études.

FATNA

Résumé :

Les probiotiques, notamment les lactobacilles sont des microorganismes vivant qui, ingérés en quantité suffisante, rééquilibrent le microbiote intestinal. Ils sont largement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, notamment dans la production des yaourts et d'autres produits laitiers fermentés.

Au cours de notre étude nous avons travaillé sur 2 volets, La premier partie *in vitro* consistait à sélectionner les souches à potentiel probiotiques par des tests tels que la survie aux condition hostiles rencontrées le long du tractus digestif, le pouvoir antagoniste contre quelques bactéries pathogènes et la résistance aux antibiotiques, parmi les 11 souches des lactobacilles et bifidobactéries étudiées , seules 02 souches ont répondu positivement à l'ensemble des critères de sélection, La deuxième partie *in vivo* nous a permis de confirmer l'effet des deux souches sélectionnées additionnées de prébiotiques sur différents lots de rats Wistar, l'ensemble des tests réalisés indiquent que les animaux consommant des probiotiques montrent des améliorations considérables sur leur santé, notamment l'équilibre de la flore intestinale et la réduction des microorganismes pathogènes.

Mots clé : probiotique, lactobacilles, bifidobactéries, microbiote intestinales, antibiotiques, antagonisme, rats Wistar.

Abstract

Probiotics, including lactobacilli are living microorganisms that, when ingested in sufficient quantities, rebalance the intestinal microbiota. They are widely used in the food industry, especially in the production of yogurt and other fermented dairy products.

During our study we worked on 2 sectors. The first part *in vitro*, consisted to select the probiotic strains for potential tests such as survival in hostile conditions encountered along the digestive tract, the opposing power against some pathogenic bacteria and antibiotic resistance among 11 strains of lactobacilli studied only 02 strains responded positively to the selection criteria, Part enable *in vivo* confirm the effect of the two strains selected on Wistar rats, All the realized tests indicates that animals consuming probiotics show considerable improvements on their health, in particular the balance of the intestinal flora and the reduction of the pathogenic microorganisms.

Keywords: probiotic, lactobacillus, intestinal microbiota, antibiotic, antagonisme, Wistar rats.

الملخص:

البروبيوتيك، بما في ذلك العصيات اللبنية والكائنات الحية الدقيقة و التي، عند تناولها بكميات كافية، تقوم بإعادة توازن الجراثيم المعوية. وتستخدم على نطاق واسع في الصناعات الغذائية، وخاصة في إنتاج اللبن الزبادي وغيرها من منتجات الألبان المخمرة.

ومن خلال دراستنا وعملنا على جانبيين، كان أول جزء في المختبر لتحديد إمكانات في سلالات الاختبارات بروبيتك مثل البقاء على قيد الحياة في ظروف معادية واجهتها على طول الجهاز الهضمي، قوة المعارضة ضد بعض أنواع البكتيريا المسببة للأمراض و المقاومة للمضادات الحيوية بين 11 سلالات من البكتريا المكونة والبفيدوبكتيريا درس، وردت 02 فقط سلالات إيجابي لجميع معايير الاختيار، والجزء الثاني في الجسم الحي سمح لنا لتأكيد أثر اثنين من سلالات مختارة من البريبايونكس أضافت على دفعات مختلفة من الفئران وبستار، نفذت جميع الاختبارات تظهر أن الحيوانات يظهر المستهلكة البروبيوتيك تحسينات كبيرة على صحتهم، بما في ذلك الرصيد من البكتيريا الموجودة في الأمعاء والحد من الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض.

كلمات البحث: العصيات اللبنية بروبيتك، البفيدوبكتيريا، الجراثيم المعوية، والمضادات الحيوية، والعداء، فئران وبستار

Tables des matières

• Groupe III.....	12
I.3.-Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé	13
a) Les probiotiques et les infections gastro-intestinales	13
b) Les probiotiques et l'intolérance au lactose	13
c) les probiotiques et le cholestérol	14
d) Les probiotiques et la prévention du cancer du colon	14
e) Les probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin	14
f) Les probiotiques et la perméabilité intestinale	14
g) Les probiotiques et la motilité de l'intestin	15
I.4.- MICROFLORE INTESTINALE ET PROBIOTIQUES	15
I.4.1- Microflore intestinale : un écosystème complexe	16
I.4.2- Composition de la microflore intestinale	16
I.4.3-composition classique d'une flore intestinale humaine	16
• Flore dominante	18
• Flore sous dominante	19
• Flore résiduelle	19
• Flore fécale	19
I.4.4 - Persistance et survie des probiotiques dans l'environnement digestif	19
I.5.les prébiotiques	19
I.5.1 Définition	20
I.5.2-Action des prébiotiques	20
I.6 - Les rats de laboratoire	21
I.6.1. la flore du rat	21
I.6.2 -L'appareil digestif du rat	21
1-. Wistar	22
2-Pourquoi avoir choisie cette souche ?.....	23
Chapitre02 : Matériels et Méthodes	23
2-1.Matériel	24
2-1-1. Les souches bactériennes	24
*Les souches de bactéries lactiques (Indicatrice)	24
*Sources des bactéries pathogènes.....	24

Tables des matières

2-1-2-Les animaux	24
2-1-3. Les milieux de culture.....	25
2-1-4-les Antibiotiques.....	25
2.1.5-Les prébiotiques	26
2-2. Méthodes	28
2-2-1. Purification des bactéries lactiques	29
• Conservation des souches.....	29
2-2-3. Sélection des souches à caractère probiotique.....	29
2-2-3-1. Recherche de la résistance en milieu acide	29
2-2-3-2. Test de résistance aux sels biliaires	29
2-2-3-3. Test de résistance aux antibiotiques	30
2-2-3-4. Recherche de l'antagonisme des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes.....	30
• Test en milieu solide.....	30
2.2.3.5-Croissance des souches lactiques en présence de fructooligosaccharides (F.O.S)	31
• Test en milieu solide	31
2-2-5. Expérimentation in vivo.....	31
2-2-5-1. Conditions d'élevage des rats	32
• Habitat et nourriture.....	32
• Nourriture et conditions d'élevage	32
2-2-5-2. Techniques d'administration des différentes souches lactiques.....	32
• Préparation du lait fermenté.....	33
2-2-6. Paramètre zootechniques.....	33
2-2-6-1. Consommation.....	33
• Nourriture consommée	33
• Pesée des animaux.....	33
2-2-6-2. Paramètres de croissances.....	34
• Gain de poids moyen par semaine.....	33
• L'indice de consommation.....	33
• Le poids vif moyen.....	34
2-2-6-3. Paramètres microbiologiques	34
• Dénombrement des bactéries lactiques dans la matière fécale.....	34
• Dénombrement de la flore totale (FTAM).....	35
• Dénombrement des coliformes fécaux	34

Tables des matières

• Dénombrement des staphylocoques pathogènes.....	35
• Dénombrement des salmonelles et shigelles	35
2.2.7 - Identification des souches probiotiques_.....	36
Chapitre 03 : résultat et discussion.....	36
3.étude in vitro.....	37
3-1. Vérification de la pureté des souches lactiques	37
3-2- Croissance des bactéries lactiques en milieu acide	37
3-3-croissance des bactéries lactiques en présence de sels biliaire.....	38
3-4- AntibioGramme des bactéries lactiques	39
3-5-antagonisme des souches des lactobacilles vis-à-vis des bactéries pathogènes	40
3.6 - croissance des bactéries lactiques en présence de FOS.....	43
3-7.Identification des lactobacilles par les galeries Api 50 CHL medium.....	45
3.8. Partie in vivo	46
3-8-1. Paramètres zootechniques	48
• Consommation en nourriture	48
• Indice de consommation	48
• Gain de poids moyen	49
• Poids vif moyen	50
3-8-2. Paramètres microbiologiques	52
3-8-3. Paramètres de carcasse	53
Chapitre04 : Conclusion et perspectives	62
5-Annexe	63
▪ Annexe 01 : composition des milieux d'isolement des entérobactéries.....	66
▪ Annexes 02 : identification des Lactobacilles.....	65
▪ Annexes 03 : aptitudes des probiotiques sur le rats wistar.....	70
6- Références bibliographique.....	74
	76

Listes des figures

Figure01 : Composition et concentration (cfu/ml) des espèces bactériennes du microbiote du tractus digestif (adapté de Sartor RB, Gastroenterology, 2008).....	17
Figure 02 : l'appareil digestif du rat	22
Figure03 : rat de la souche Wistar	23
Figure 04 : rats âgés de 30 jours dans leur habitat	31
Figure 05 : nourriture destinée aux rats	31
Figure 06 : l'aspect macroscopique des lactobacilles	36
Figure 07 : l'aspect microscopique des lactobacilles.....	36
Figure 08 : aspect des colonies des lactobacilles dans un milieu 0,5%e 5% en présence des sels biliaires.....	38
Figure 09 : aspect des antibiogrammes en milieu MRS solide	40
Figure 10 : Inhibition de EL1 par les bactéries lactiques.....	42
Figure 11 : Inhibition de la souche Bech II ₃ par les bactéries lactiques.....	43
Figure12 : colonies obtenues sur le milieu MRS en présence et en absence des FOS.....	44
Figure 13 : test d'identification de la souche CHEVRE ₁₀ par la galerie API50 CHL.....	45
Figure14 :résultat du test d'identification de la souche NSC ₁₀ par la galerie API50 CHL.....	45
Figure15 : représente l'évolution de la consommation en nourriture pour les différents lots des rats.....	48
Figure 16 : Evolution de l'indice de consommation	49
Figure 17 : Evolution du gain de poids moyen au cours des semaines.....	51
Figure18 : Evolution du poids vif moyen des rats au cour des semaines d'élevage.....	52
Figure 19: milieux de cultures utilisés pour le dénombrement des flores fécales.....	53
Figure20 : évolution de la flore mésophile totale.....	54
Figure 21 : la charge en entérobactéries à la semaine 4.....	55
Figure 22 : évolution de la charge d'entérobactéries fécales	55
Figure23 : évolution des bactéries lactiques	56
Figure 24 : évolution de la charge en salmonelle et shigelle	57
Figure 25 : évolution de la charge de staphylocoque.....	58
Figure 26: représentant le foie des animaux après dissection.....	62
Figure27 : représentant le cœur des animaux après dissection.....	63

Figure 28: représentant le tube digestif des animaux après dissection 63

Liste des tableaux

Tableau 01: Micro-organismes considérés comme probiotiques (d'après Hozalpfel <i>et al.</i> 1998).....	08
Tableau 02: Genres, espèces et sources d'isolement des bactéries lactiques utilisées.....	24
Tableau 03: Souches des bactéries pathogènes utilisées et leurs sources d'isolement	25
Tableau 04: Antibiotiques utilisés, leur famille et leur mode d'action	26
Tableau 05 : croissance des bactéries lactiques en milieu acide	38
Tableau 06: croissance des lactobacilles en présence des sels biliaires.....	40
Tableau 07 : antibiogramme pour les bactéries lactiques.....	42
Tableau 08: inhibition des entérobactéries par les bactéries lactiques	44
Tableau 09 : diamètres des colonies sur le milieu MRS en présence et en absence des FOS.....	45
Tableau 10 : le résultat de logiciel d'identification de la souche CHEVRE ₁₀	47
Tableau 11: le résultat de logiciel d'identification de la souche NSC ₁₀	47
Tableau 12: nombre des différents microorganismes dans le tube digestif des animaux témoins.	59
Tableau 13: nombre des différents microorganismes dans le tube digestif des animaux du lot NSC ₁₀	60
Tableau 14: nombre des différents microorganismes dans le tube digestif des animaux du lot chèvre 10.....	60
Tableau 15: poids des différents organes.....	62

Glossaire

-Abiotique : il peut désigne un processus qui n'implique aucune réaction biologique. Il est également utilisé pour définir un lieu impropre à abriter ou à voir la vie se développer contraire de biotique, synonyme de vivant.

- **Anaérobie** : qualifie un organisme qui vit ou fonctionne en absence d'air ou un milieu dépourvu d'air.

-Antibiotique : sont les médicaments les plus connus du public .ce sont des substances qui ont la propriété de détruire les bactéries. Les antibiotiques sont inactifs contre les virus et ne s'attaquent qu'aux bactéries. ce sont plus que des « bactériostatique » qui sont des substances qui empêchent la multiplication des bactéries sans pour autant les détruire , et que les « antiseptique » qui évitent seulement le développement de germes en général.

-Bactériocine : est un peptide antimicrobien produit par des bactéries et qui tue d'autres bactéries ; la bactériocine est finalement une toxine spécifique produite par les bactéries

-Bifidobactéries : ce genre de bactéries se trouve dans l'intestin humain. Les espèces sont nombreuses : bifidobactérium.... Etc. certaines bifidobactéries qui ont des effets positifs démontrés scientifiquement sur le transit intestinale pouvant être qualifiés de probiotique.

-Biotope : milieu défini par les caractéristique physicochimique stables et abritant une communauté d'être vivants (ou biocénose). (Le biotope et sa biocénose constituent un écosystème).

-Dominante (flore dominante) : se dit des bactéries les plus représentée dans la flore d'un écosystème. Dans le colon on retient par définition des concentrations supérieures ou égale à 10⁸.g-1 de selles ou supérieure à 1° /° de la flore totale.

-Ecosystème intestinale : l'écosystème intestinal est composé de trois éléments indissociables : la flore, la muqueuse et le système immunitaire. de son équilibre dépend un bon état de santé. De nombreux facteurs peuvent perturber cet écosystème (stress, intolérance, prise de médicament...).

-Entérobactéries : ensemble d'espèces bactériennes ayant toutes une forme de bâtonnets (bacilles) et de couleur rose à la coloration dite de gram (bacilles gram négatif), se retrouvent toutes dans les matières fécales des animaux et des humains.

-FOS (fructo-oligosaccharide) : sont des substances composées de deux sucres, le glucose et le fructose, les FOS ne sont pas assimilables par l'organisme mais sont digérés par la flore intestinale. Les fructo-oligosaccharide font partie des substances dites Prébiotiques, c'est-à-dire qui favoriseraient la prolifération des bactéries probiotiques.

-Lactobacilles : sont des bactéries immobiles, non flagellés, non sporogones. Forment un genre de bactéries à Gram positif de la famille des lactobacillaceae, sont homofermentaire produisant à partir du glucose plus de 85 % d'acide lactique et ayant des besoins nutritionnels.

-Microbiote : c'est l'autre nom de la flore intestinale, il s'agit donc de l'ensemble des micro-organismes, qui se trouvent dans le tube digestif humain, essentiellement au niveau du colon, ou gros intestin. La colonisation du tube digestif commence dès la naissance. Le microbiote contribue notamment aux défenses immunitaires et au transit intestinal.

-Mucus : est une substance fluide ou légèrement solide, de consistance visqueuse. D'aspect translucide, sécrétée par les glandes muqueuses et par les cellules caliciformes ou cellule glandulaire.

-Muqueuse intestinale : elle couvre toute la paroi du tube digestif et présente des capacités remarquables de filtre sur une immense surface d'échange entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme.

-Résistant : est la capacité d'un micro-organisme à résister aux effets des antibiotiques, c'est une des formes de pharmaco résistances.

-Sensible : sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit.

-Souche : les bactéries sont classées en grandes familles appelées genre, comme les bifidobactéries et les lactobacilles, chaque genre comprend plusieurs espèces, pour chaque espèce il existe différentes souches caractérisées par un nom de code ou une marque.

-Yaourt : est un lait fermenté par le développement des seules bactéries lactiques thermophiles *Lactobacillus delbrueckii* subs. *Bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* qui

doivent êtreensemencés simultanément et se trouver vivantes dans le produit fini. C'est la définition officielle française depuis 1963 précise par le décret de 1988.

Les abréviations

BL : Bactéries Lactique.

Cm : centimètre.

C°: Degré Celsius.

DO: densité optique.

E: Escherichia.

FOS: Fructo- Oglucosaccharide.

g: gramme.

GN: Gélose Nutritive.

Gras: Generally regarded as safe.

G+C: Guanine +Cytosine.

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

L : litre ;

Lb: Lactobacille.

Mcg : microgramme .

ML : Millimètre.

MRS : de Man-Rogosa et Sharp.

Na cl : Chlorure de sodium.

Pg : phosphogluconate.

Ph : Potentiel d'hydrogène.

Pk : phosphokétolase.

R : résistant.

S : sensible.

SS : salmonelle et schigalle.

Sp : Espèce non précisé.

UFC : Unité formant colonie (unité de mesure des bactéries par culture).

Ug : microgramme.

Introduction

Introduction

L'homme à l'instar des animaux vit continuellement en association avec la population de microorganismes complexe habitant son tractus gastro-intestinal. L'un des principaux effets bénéfiques émanant de leur alliance est la protection et l'amélioration de la résistance aux maladies infectieuses de l'organisme-hôte. Cependant, la composition de cette flore peut être altérée par divers facteurs alimentaires et environnementaux, qui rendent l'organisme-hôte susceptible aux maladies ou aux désordres digestifs.

Le microbiote intestinal est connu comme étant un élément actif de la physiologie intestinale avec des fonctions métaboliques. La flore a le rôle de barrière et de stimulation du système immunitaire intestinal (Campeotto et al., 2007).

Les travaux de Metchnikoff (1907) ont démontré que la consommation d'aliments fermentés permet de rétablir la flore intestinale en générant des effets bénéfiques sur la santé de l'homme et des animaux. Les investigations ont mis en évidence le rôle crucial que joue la microflore intestinale dans le maintien et l'amélioration de la santé. Certains de ces travaux ont montré que les animaux conventionnels pourvus d'une microflore intestinale complète sont plus résistants aux infections que les animaux axéniques (germ-free) dépourvus de microflore.

En effet, de nombreuses études scientifiques ont rapporté les propriétés prophylactiques et thérapeutiques de certains microorganismes présents dans les aliments fermentés, ces microorganismes favorables pour la santé de l'homme et de l'animal ont reçu le nom de « probiotique ». Ce concept a été développé tout particulièrement après l'émergence, ces dernières décennies, des bactéries résistantes aux antibiotiques et l'intérêt suscité par les agents naturels d'inhibition pour le contrôle des germes pathogènes.

Des études récentes ont dévoilé que la consommation de produits alimentaires enrichis en probiotiques produit plusieurs effets favorables sur l'organisme tels que l'amélioration des mécanismes de la réponse immunitaire, le rétablissement de l'équilibre microbien dans le colon, le traitement de certaines infections intestinales et uro-génitales, la réduction des risques d'allergie, de cancer, d'ulcère, etc.

Les microorganismes probiotiques sélectionnés en alimentation humaine sont représentés essentiellement par les bactéries lactiques, particulièrement celles appartenant au genre

Introduction

Lactobacillus et *Bifidobacterium*. Aujourd'hui, ces deux genres bactériens sont largement utilisés dans la fabrication de produits laitiers fermentés.

Avec les nouveaux résultats qui prouvent que les probiotiques peuvent avoir non seulement une activité antibactérienne, une activité stimulatrice du système immunitaire, mais aussi une activité anti-virale, il serait important de continuer à rechercher et caractériser les nouvelles bactéries probiotiques pour contribuer à la lutte contre le VIH/SIDA et d'autres infections létales.

* Au vu de ceci, nous nous sommes donnés pour objectif principal d'étudier les effets des lactobacilles et des bifidobactéries sur la flore intestinale du rat wistar.

Notre travail est subdivisé en deux principaux axes :

En premier lieu nous avons testé *in vitro* le potentiel probiotique d'un ensemble de souches lactiques, ce caractère est révélé par leur aptitude à résister aux diverses conditions hostiles rencontrées le long du tractus intestinal.

Pour démontrer ce potentiel nous avons testé la croissance des souches lactiques en milieu acide, en présence de sels biliaires et de divers antibiotiques. Le pouvoir inhibiteur des lactobacilles et bifidobactéries vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes rencontrées au niveau intestinal a également été recherché.

La 2^{ème} partie de cette étude s'est focalisée sur l'impact de la consommation des 2 souches sélectionnées sur la flore intestinale du rat Wistar et sur ses paramètres de croissance.

Enfin une identification des 2 souches probiotiques a été réalisée en utilisant les galeries biochimiques API 50CHL.

Chapitre I : étude bibliographique

Chapitre I : étude bibliographique

I-1- généralités sur les bactéries lactiques :

I-1-1 Définition :

Avant le vingtième siècle ,le terme bactéries lactiques (lactic acid bacteria) à été utilisé pour signifier les organismes qui acidifient le lait (milk-souring organisms), la première culture pure à avoir été isolée de ces bactéries était celle de *Lactococcus lactis* en 1873, des progrès importants sont apparus dans la classification de ces bactéries lorsque des similarités ont été observées entre les bactéries acidifiantes du lait et les autres bactéries productrices d'acide lactique étaient (Axelsson 2004). Les bactéries lactiques sont généralement associées aux habitats riches en nutriments comme divers produits alimentaires (lait, viandes, boisson, végétaux) mais certaines de ces bactéries font également partie de la flore normale de la bouche ,l'intestin et le vagin des mammifères (Salminen, 2004 et Carina Audisio et al; 2010), la monographie d'Orla-Jensen (1919) constitue la référence pour l'étude des bactéries lactiques, Orla Jensen utilisa les caractéristiques suivantes comme base de classification: la morphologie (cocci ou bâtonnets, formation tétrade), le mode de fermentation du glucose (homo ou hétérofermentation), la croissance à certaines températures (ex :10°C et 45°C), les types de sucres utilisés ,ces caractéristique sont toujours très importantes dans la classification des bactéries lactiques (Stiles et Holzappel,1997 ;Carret al. ,et Axelsson, 2004).

I-1-2 Propriétés générales :

D'une façon générale le groupe se compose de bactéries sous forme, de coque ou de bâtonnets à Gram positif non sporulant, et produisant l'acide lactique comme produit final principale pendant la fermentation des hydrates de carbones (Kandler, 1983).

Les BL sont, selon la voie qu'elles empruntent pour fermenter les hexoses, homofermentaire ou hétérofermentaires la voie de la glycolyse (Embden-Meyerhof-Parnas), ayant pour produit Final principale l'acide lactique ou la voie 6-phosphogluconate/phosphokétolase (6-pg/pk) (Schleifer et Ludurig, 1995) ayant pour résultat l'acide lactique, l'anhydride carbonique, l'acide acétique et l'éthanol. Ce pendant, quelques espèces sont considérées comme hétérofermentaires facultatives, concernant la fermentation des hexoses, ces espèces sont homofermentaires , mais dans certaines

conditions (par exemple si la source disponible de carbone est un pentose), elles induisent la voie 6-pg/pk, ayant pour résultat la fermentation hétérolactique (Axelsson, 2004 et Jozala et al., 2005)

Les BL sont trouvées dans diverses niches écologique, tel que le lait, ainsi que certaines nourritures, la bouche, les régions gastro-intestinales, et urogénitales des humains et des animaux (Lopez-Diaz et al., 2000 ; Navarro et al., 2000 ; El Schei et al., 2000 et Mathara et al., 2004). Elles constituent aussi la flore microbienne dominante responsable de la fermentation des céréales et des plantes fourragères ensilées (Carr et al. 2002), elles exigent des carbohydrates, fermentescibles, des acides aminés, des acides gras, des sels et des vitamines pour leur croissance (Shihata et Shah., 2000; Bjorkroth et Holzapfel, 2003; Hammes et Hertel, 2003) .

Les souches sont généralement faiblement protéolytiques et lipolytiques et exigent des acides aminés, des purines, des pyrimidines et des vitamines pour leur croissance (Staner, 1976; Cogan et Hill, 1993 et Jay, 1996).

Les bactéries lactiques utilisées dans les fermentations laitières peuvent être divisées en deux groupes sur la base de leur croissance optimale (Bissonnette et al, 2000), les bactéries mésophiles avec une température optimum de croissance entre 20°C et 30°C et les thermophiles entre 30°C et 45°C, alors que la majorité de souche se développent à pH 4,0-4,5- certaines sont en activités à pH 9,6 et d'autres à pH 3,2 (Jozala et al., 2005).

L'acide lactique produit peut être sous deux formes stéréoisomérique, L moins fréquemment, D ou un mélange des deux (Who, 1974).

I-1-3. Origine des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont été isolées dans de nombreux milieux naturels végétaux, animaux et **humains** ; certains espèces semblent adaptées à un environnement spécifique et ne semblent guère se retrouver ailleurs que dans leur habitat naturel, grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, les BL peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique (De Roissard et Luquet, 1994).

Selon Desnazeand (1992), les espèces du genre streptococcus, lactococcus et leuconostoc se rencontrent plutôt chez les hommes, ainsi que les animaux, dans le domaine laitier, elle existent en quantité considérable, les espèces du genre lactobacilles sont encore plus répandues dans la

nature. par exemple, on les trouve sur les végétaux ou elles assurent l'acidification de l'ensilage, ou les trouve aussi dans l'intestin des animaux et de l'homme, elles sont également isolées des cavités naturelles de l'organisme (cavité buccales et vaginales) (de Roissard et Luquet, 1995).

I-2- probiotiques

I-2-1- Définition :

La notion de « probiotiques » a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff (1907) qui avait constaté que les paysans bulgares, grand consommateurs de lait fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé. Ainsi, Metchnikoff avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance, de vie (Gournier-Château et al., 1994).

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs « pros » et « bios » qui signifient littéralement « pour la vie » contrairement au terme antibiotique signifiant « contre la vie », ce terme a été introduit pour la première fois par Lilly et Stilwell (1965) pour décrire des substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autre microorganisme . Depuis, plusieurs définitions ont été données aux probiotiques dépendamment de leurs effets sur la santé, selon Parker(1974). « Probiotiques » contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale, cette définition englobant les microorganismes et les métabolites microbiens produits (les antibiotiques), a été modifiée par Fuller (1989) qui redéfinit les probiotiques comme étant : « des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale ». Enfin, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'organisation des nations unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et l'organisation Mondiale pour la santé (OMS) (Report of FAO/Who, 2002). Les probiotiques sont « des microorganismes vivant administrés en quantités adéquates et qui sont bénéfique pour la santé de l'hôte .

I-2-2-les souches probiotiques :

Peuvent faire partie des produits alimentaires de deux façons : soit dans des laits fermentés, ou l'on fait croître les bactéries en tant que ferments, soit dans d'autres types de produits (produits non-fermentés) où elles sont ajoutées en quantité importante. Dans les deux cas, les bactéries

doivent rester viables au cours de la préparation et de l'entreposage du produit. Ainsi, les souches utilisées doivent être en mesure de tolérer le degré d'acidité du produit fermenté et, généralement, la survie des lactobacilles est meilleure que celle des bifidobactéries. Ensuite, une bonne souche probiotique doit être résistante aux sécrétions du système digestif et doit pouvoir proliférer dans l'intestin. La survie des bactéries lactiques aux acides de l'estomac et à la bile de l'intestin dépend, d'une part, des propriétés de l'aliment vecteur et, d'autre part, de leur résistance à l'acidité (Roy, 1996). Les produits fermentés possèdent ce pouvoir tampon favorisant la survie des bactéries lactiques ingérées. Pour qu'un organisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes (Salminen, Isolauri *et al.*, 1996 ; Stanton, Gardiner *et al.*, 2001) :

- Etre un hôte naturel de l'intestin .
- Adhérer aux cellules épithéliales intestinales et exclure ou réduire l'adhérence des bactéries pathogènes.
- Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les microorganismes pathogènes (acides, H₂O₂, bactériocines, etc.)
- Etre non invasif, non carcinogène et non pathogène.
- Etre capable de co-agrégier pour former une flore normale équilibrée.
- Survivre aux différents procédés technologiques de production.
- Demeurer vivant dans la préparation alimentaire.

Toutefois, certains de ces critères sont maintenant remis en question, comme les propriétés d'adhérence (Melmed, Thomas *et al.*, 2003) et la notion de viabilité. Des études récentes, ont clairement démontré que même les souches non viables de probiotiques sont capables d'exercer certains effets positifs sur la santé entre autres la stimulation de certaines fonctions immunitaires (Mottet and Michetti, 2005), l'inhibition de l'adhésion et de l'invasion de certains pathogènes (Ouwehand, Kirjavainen *et al.*, 1999).

I.2-3- Microorganismes probiotiques :

Les principaux microorganismes probiotiques connus à ce jour sont des bactéries (lactobacilles, bifidobactéries, *Escherichia coli* et entérocoques), et des levures (*Saccharomyces boulardii*), présentes ou non dans la microflore intestinale résidente. Les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium* qui appartiennent au groupe des bactéries lactiques sont principalement étudiés et utilisés (Vorland, Ulvatne *et al.*, 1998 ; Kopp-Holihan, 2001). Les bactéries lactiques

sont employées empiriquement depuis des siècles dans la fabrication de nombreux aliments fermentés comme les produits laitiers (yaourts et fromages). L'action de la flore lactique sur la conservation d'un aliment est liée à l'abaissement du pH consécutif à la production d'acide lactique. Les bactéries lactiques peuvent aussi produire de nombreux agents anti-bactériens tels que les bactériocines (Naidu, Bidlack *et al.*, 1999) qui contribuent à inhiber la croissance de flores indésirables. Enfin, elles ont une action déterminante sur les qualités organoleptiques des produits fermentés (texture et arôme par exemple) (Drouanlt et Corthier, 2001). Les bifidobactéries et les lactobacilles sont les deux principales souches de bactéries probiotiques utilisées dans les produits alimentaires

(Tableau I).

Tableau I : Micro-organismes considérés comme probiotiques (d'après Hozalpfel *et al.*1998).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries Lactiques	Autres micro-organismes
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus spp,</i>
<i>L. amylovirus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli strain Nissle</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium Freudenreichii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
<i>L. cellobius</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilis</i>	
<i>L.delbrueckii</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. farciminis</i>		<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. fermentum</i>			
<i>L.gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

I.2.3.1- Bifidobactéries

Les bifidobactéries sont des bactéries à Gram positif, anaérobies strictes, immobiles, non-sporulantes, en forme de bâtonnets aux formes variées dont la plus caractéristique est la forme «Y» (Ballonge, 1993), elles sont, hétéro-fermentaires, avec un pourcentage de bases G + C compris entre 55 et 67%, et dont les compositions en peptidoglycanes sont très variables (Gomes et Malcata, 1999). A la naissance, les bifidobactéries dominent la flore intestinale des enfants. Avec l'âge, et selon les habitudes alimentaires, la population de bifidobactéries est surpassée par d'autres espèces de micro-organismes. Chez l'adulte, elle forme 5 à 10% de la flore intestinale (Roy, 1997). Des 32 espèces de bifidobactéries connues, les espèces *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, et *B. animalis* sont les plus utilisées commercialement. Comme son nom

l'indique, cette dernière espèce est d'origine animale tandis que les deux premières proviennent du tractus intestinal de l'homme. En général, les produits probiotiques commerciaux contiennent un mélange de *Streptococcus thermophilus*, de *Lactobacillus bulgaricus*, de *Lactobacillus acidophilus* et de *Bifidobacterium animalis* (Roy, 1996).

I.2.3.1.1- Classification des bifidobactéries :

- Règne : Bacteria.
- Embranchement : Actinobacteria.
- Classe : Actinobacteria.
- Sous-classe : Actinobacteridal.
- Ordre : Bifidobacteriales.
- Famille : Bifidobacteriaceal.
- Genre : Bifidobacterium, orla-jensen, 1924.

a. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des bifidobactéries :

-Morphologie :

Les bifidobactéries sont des bactéries non-motiles et non- sporulant. Lorsqu'elles sont isolées de solutions fraîches, elles sont souvent retrouvées sous forme de Y. Ces bactéries sont Gram-positif (Rasic et Kunnann, 1983).

-physiologie :

- Type respiratoire :

-Les bifidobactéries sont des microorganismes anaérobies stricts. Cependant, leur intolérance à l'oxygène n'est pas absolue : une tension de 1% d'oxygène est supportée par la plupart des souches cultivées sur milieu solide. Mais la croissance en présence d'une faible tension d'oxygène n'est possible que si le milieu contient un élément réducteur tel que la cystéine.

- Température et pH :

La température optimale de développement des souches d'origine humaine est comprise entre 36 et 38°C. En revanche, pour les souches d'origine animale, elle est légèrement plus élevée, aux environs de 41 à 43°C et peut atteindre 46,5°C (Rasic et Kurmann, 1983). La croissance est nulle à 20°C et en dessous.

Le pH initial optimal de croissance se situe entre 6,5 et 7,0. Aucune croissance ne peut avoir lieu en dessous de 5,0 et au delà de 8,0 (Scardovi, 1986).

- Milieux de culture :

Le choix du milieu de culture est important car il influe qualitativement et quantitativement sur l'isolement des bifidobactéries à partir de flores complexes. Il convient de distinguer trois types de milieux élaborés pour l'isolement, la culture et la caractérisation des bifidobactéries : les milieux complexes, les milieux semi-synthétiques et les milieux synthétiques.

- Effets probiotique de la présence des bifidobactéries :

Plusieurs rôles sont attribués à la présence des bifidobactéries. Un des rôles les Plus importants des bifidobactéries, est l'adhésion de celles-ci aux cellules épithéliales de l'intestin ce qui permet de créer une niche écologique et ainsi d'empêcher l'invasion de bactéries pathogènes. Certaines études ont été faites sur l'effet de l'administration de comprimés de bifidobactéries à des gens ayant la diarrhée et il a été remarqué que l'ingestion de ces comprimés aidait à diminuer les symptômes. L'équipe de Tojo et al. (1987) avait remarqué que les personnes atteintes d'entérites causées par *Cumgylobacter* guérissaient plus vite lorsque des comprimés contenant *Bifidobacterium brève* leur étaient administrés. Romond et Romond (1989) ont aussi constaté l'effet positif de l'administration d'un lait fermenté avec *B. longum* sur la disparition d'un rotavirus. Il a aussi été remarqué que les bifidobactéries ont un rôle nutritionnel car elles produisent des vitamines du groupe B, des acides aminés tels que la valine, l'alanine, l'acide aspartique et la thréonine. De plus, les bifidobactéries produisent seulement de l'acide lactique L+ qui est complètement métabolisé par l'humain (Rasic et Kurxnann, 1983). Il est aussi reconnu que les bifidobactéries ont un effet probiotique qui est imputable à leur métabolisme. Ainsi, il a été reconnu que la présence de bifidobactéries chez l'humain diminuait l'intolérance au lactose puisque les bifidobactéries métabolisent le lactose. De plus, la teneur en lactose des produits laitiers fermentés par des bifidobactéries est moins importante que les produits fermentés sans bifidobactéries ce qui rend ces produits attrayants pour les gens souffrants d'intolérance au lactose. Ainsi, il a été remarqué par Blanchette et al (1996) que la teneur en lactose d'un fromage Cottage fait avec *B. infantis* était 40% moins importante que pour le fromage Cottage sans

Bifidobactéries, après une journée d'entreposage. Le même phénomène a été observé par l'équipe de Roy et al., (1997) dans le cas de yaourts contenant des bifidobactéries et ceux sans bifidobactéries. La présence des bifidobactéries permet aussi de réduire le niveau de cholestérol sérique. Les bifidobactéries aident à la déconjugation des acides biliaires, la réduction des nitrosamines et l'inhibition de la réduction des nitrates (Nagengast et al., 1988). Plusieurs études ont aussi noté que les bifidobactéries pouvaient avoir un effet anti-cancérigène. Ainsi, certains auteurs ont suggéré que le risque du cancer pouvait être réduit en abaissant le pH de l'intestin car cet abaissement empêcherait la colonisation de l'intestin par les bactéries putréfiantes et aurait pour conséquence la réduction de composés potentiellement carcinogènes tels que les produits N-nitroso, les produits phénolés etc. (Modler et al., 1990). Or, comme les bifidobactéries produisent de l'acide acétique et de l'acide lactique, il y a un abaissement du **pH** intestinal.

I.2.3.2 – Lactobacilles :

Les lactobacilles sont des bactéries Gram-positifs, anaérobies facultatives, catalase négative, non-sporulantes et en forme de bâtonnets non flagellés (Gomes et Malcata, 1999). Contrairement aux bifidobactéries, les lactobacilles n'apparaissent dans la flore intestinale de l'humain qu'après la naissance et leur population reste moins importante (Roy, 1996). Plus de 56 espèces de lactobacilles ont été dénombrées, dont 21 ont été trouvées chez l'homme. Leurs principales caractéristiques sont : un métabolisme homofermentaire ou hétérofermentaire, des conditions de croissance anaérobies facultatives, un pourcentage de bases G + C variant de 32 à 55% et une faible variabilité dans la composition des peptidoglycanes (Gill, 1998).

Traditionnellement, les lactobacilles font partie des ferments de départ pour la fabrication de différents produits fermentés dans l'industrie laitière. *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus lactis* sont le plus souvent retrouvés dans des produits tels que le yaourt, les fromages de type suisse ou italien, le beurre bulgare, le kéfir et le koumis. *Lactobacillus helveticus* peut aussi faire partie de certains de ces produits. *Lactobacillus acidophilus* est utilisé dans la production de laits acidifiés et de certains types de yaourts (Marshall et Tamine, 1997). *Lactobacillus casei* fait partie du ferment de départ dans la fabrication du Yakult, un lait fermenté japonais (Mozzi et al., 1994) et est de plus en plus introduite dans les nouvelles générations de yaourt en tant que probiotique. La souche de *Lactobacillus rhamnosus* GG est certainement la plus connue et la plus utilisée dans les produits fermentés comme ferment probiotique. De nombreuses autres souches

ont montré des effets intéressants *in vitro* qui n'ont pas toujours été validés par des études cliniques (Gill, 1998).

I.2.3.2.1- classification des lactobacilles :

Règne : *Bacteria*

Division : *Firmicutes*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Lactobacillales*

Famille : *Lactobacillaceae*

Genre : *Lactobacillus*

Espèces : *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus bulgaricus

Lactobacillus caucasicus

Lactobacillus casei

Lactobacillus plantarum

Lactobacillus reuteri

Lactobacillus fermentum

I.2.3.2.2.-Subdivision du genre Lactobacillus :

Selon Kandler et Weiss, ce genre est subdivisé en trois groupes selon le type de fermentaire :

Groupe I : anciennement appelé *Thermobacterium*, il comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir de glucose. Ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate et possèdent une fructose 1-6-dis phosphate aldolase et une phosphofruktokinase. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (croissance à 45°C) dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus*. (Leveau et Bouix, 1993 ; Sutra et al., 1998) .

Groupe II : nommé auparavant *Streptobacterium*, ce sont des espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration en glucose limite. Les hexoses sont fermentés par la voie d'Embden-Meyerhof en acide lactique, mais les pentoses peuvent être dégradés en empruntant la voie

hétérofermentaire avec production d'acide lactique et d'acide acétique par une phosphocétolase inductible. Ces bactéries ont une forte activité 1,6-diphosphate aldolase, une glucose-6- et une 6-P gluconate déshydrogénase. Ce groupe est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles. (Leveau et Bouix, 1993 ; Sutra et al., 1998).

Groupe III : ce sont des *Betabacterium*, ils sont constitués des espèces hétérofermentaires obligatoires, c'est-à-dire utilisant la voie de pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses. Ils possèdent une forte activité glucose-6-gluconate déshydrogénase. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*. (Leveau et Bouix, 1993 ; Sutra et al., 1998).

I.3.-Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé :

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques.

- Amélioration de la digestion du lactose (sécrétion de lactase).
- Réduction des produits du catabolisme éliminés par le foie et le rein.
- Augmentation de la valeur nutritionnelle (bonne digestion et absorption des minéraux et vitamines).
- Prévention des infections intestinales (virus, *Helicobacter pylori*...) et urogénitales.
- Modulation du système immunitaire Réduction de l'inflammation ou des réactions allergiques.
- Régulation de la motilité intestinale (constipation, syndrome d'irritation intestinale).
- Prévention de : ostéoporose, cancer, hypertension et athérosclérose (réduction du taux de cholestérol).
- Influence positive sur la flore intestinale Bonne croissance et le bien-être.

Il est à noter que la validité scientifique de ces effets bénéfiques est très variable. Pour certains effets, des preuves scientifiques irréfutables appuyées par des études cliniques existent et permettent d'attribuer certaines allégations-santé aux produits probiotiques. Pour d'autres, les allégations demeurent encore à un stade hypothétique et des études plus approfondies demeurent nécessaires pour apporter des preuves scientifiques convaincantes à ces allégations.

a) Les probiotiques et les infections gastro-intestinales: des études cliniques ont démontré que des infections gastro-intestinales causées par *Helicobacter pylori*, la diarrhée du voyageur, diarrhée due aux rotavirus, diarrhée-associée aux antibiotiques comme celle causée par

Clostridium difficile, peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques (Mercenier et al., 2002, Turchet et al., 2003; Wang et al., 2004; Tursi et al., 2004, Plummer et al. 2004). A titre d'exemple Wang et al. (2004) ont rapporté que la consommation régulière de yogourt additionné de *Lactobacillus acidophilus* La5 ou de *Bifidobacterium lactis* Bb12 induit une suppression effective de l'infection due à *H. pylori*. Tandis que Rosenfeldt et al. (2002) ont mentionné que des souches de *L. rhamnosus* et *L. reuteri* ont permis de traiter des gastro-entérites à rotavirus chez des enfants hospitalisés.

b) Les probiotiques et l'intolérance au lactose : il a été rapporté que la consommation de lait ou de yogourt enrichis en probiotiques améliore l'absorption de lactose chez les patients déficients en lactase et réduit les symptômes digestifs dus à l'intolérance au lactose. Jiang et al., 1996 ont démontré que la consommation de lait contenant des souches de *Bifidobacterium longum* réduit les symptômes de la malabsorption de lactose chez des sujets humains suite à une élévation de la sécrétion de β - galactosidase.

c) les probiotiques et le cholestérol: des études préliminaires ont révélé que la consommation de yogourt ou de lait fermenté contenant des probiotiques entraînent une diminution du taux de cholestérol dans le sang, et par conséquent la réduction les risques d'hypercholestérolémie responsable des maladies coronariennes. Par exemple, (Bukowska et al. (1998) ; Amara, 2009 et 2012) ont mis en évidence une diminution du taux de cholestérol sanguin chez des sujets soumis à un régime supplémenté respectivement avec les souches *Lactobacillus plantarum* 299 v , *Lactobacillus brevis* CHTD 27 et *Lactobacillus plantarum* BH14.

d) Les probiotiques et la prévention du cancer du colon: selon certaines études, les bactéries probiotiques ont la propriété d'inhiber les processus conduisant à la formation du cancer du colon chez l'homme. En effet, Matsumoto et Benno (2004) ont mentionné que la consommation de yogourt contenant *Bifidobacterium lactis* LKM512 réduit significativement la mutagénicité dans l'intestin de volontaires par comparaison à un placebo.

e) Les probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin: selon la littérature, les processus inflammatoires impliqués dans les pathologies de l'intestin de l'homme comme la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la pouchite sont contrôlés par les probiotiques. Une étude de Guandalini (2002) a montré que l'ingestion de *Lactobacillus GG* entraîne une amélioration notable de l'état clinique chez des enfants souffrant de la maladie de Crohn. De même Gosselink et al. (2004) ont observé des effets cliniques bénéfiques chez des patients affectés par une colite

ulcéreuse après ingestion de produits fermentés contenant *Lactobacillus GG* ($1-2 \times 10^{10}$ bactéries/jour).

f) Les probiotiques et la perméabilité intestinale : l'altération de la perméabilité intestinale (fonction-barrière) causée par une infection, toxines ou autre facteur favorise un transfert aberrant d'antigènes (y compris la microflore locale) à travers l'intestin en engendrant des réponses immunitaires inappropriées (réactions inflammatoires ou autoimmunes) (Baumgart & Dignass, 2002 ; Gill, 2003). Des études récentes ont montré que la consommation de probiotiques stabilise la fonction barrière de l'épithélium intestinal. Par exemple, Isolauri et al. (1993) ont démontré que *Lactobacillus GG* normalise le processus de perméabilité intestinale chez le rat. En outre, une étude récente de Rosenfeldt et al. (2004) a démontré qu'une administration de probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus reuteri*) permet de stabiliser la fonction-barrière de l'intestin et de diminuer les symptômes gastro-intestinaux chez des enfants souffrant d'une dermatite atopique. Cependant les mécanismes impliqués dans cette normalisation ne sont pas encore bien connus.

g) Les probiotiques et la motilité de l'intestin : la motilité intestinale joue un rôle important dans la réduction de la croissance des microorganismes pathogènes dans l'intestin. Les probiotiques pourraient avoir des effets positifs sur la motilité de l'intestin en réduisant le temps de transit des microorganismes pathogènes (Takiguchi et al., 1998). Une étude de Grimaud et al. (1993) a montré que l'ingestion de lait fermenté avec *Bifidobacterium animalis* entraîne une réduction significative du temps du transit du contenu gastro-intestinal chez des volontaires. Tandis que Verdu et al. (2004) ont rapporté que l'effet de *Lactobacillus paracasei* (probiotique) sur la motilité de l'intestin se traduit par une atténuation de l'hyper contractilité post-infection du muscle. Ils suggèrent que les probiotiques peuvent être utilisés dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable. Dans d'autres cas, les allégations-santé revendiquées demeurent purement hypothétiques et des études scientifiques plus approfondies sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ces allégations. Cette situation est particulièrement vraie pour les effets des probiotiques sur le système immunitaire et pour lesquels très peu de preuves scientifiques et d'études cliniques ont été apportées pour valider ces allégations. Néanmoins, la stimulation du système immunitaire de l'hôte demeure un aspect très important dans le développement du concept « probiotiques ».

I.4.- MICROFLORE INTESTINALE ET PROBIOTIQUES :

I.4.1- Microflore intestinale : un écosystème complexe

De la naissance à la mort, les animaux ainsi que l'homme vivent en équilibre avec une flore microbienne extrêmement dense et variée qu'ils abritent, pour l'essentiel, dans la cavité de leur tube digestif. La flore microbienne est estimée numériquement 10 fois supérieure au nombre de cellules de l'organisme (Savage, 1977). Elle représente un écosystème très complexe d'au moins 500 espèces dont 30 à 40 espèces dominantes regroupant 99 % de la flore totale (Tannock, 1999). L'approche écologique de cette microflore tient compte de plusieurs écosystèmes microbiens successifs. La composition de cette flore est extrêmement stable chez un individu sain, mais très variable d'un individu à un autre, en fonction notamment des habitudes alimentaires. En effet, la flore microbienne forme avec l'hôte qui l'héberge un écosystème dont l'équilibre dépend de la nature des interactions entre différents composants : d'une part, des composants biotiques comme les microbes établis à demeure ou en transit, les cellules du tractus intestinal qui délimitent le biotope et, d'autre part, des composants abiotiques tels que le pH, le degré d'anaérobiose, la disponibilité de substrats, les sites d'adhérence potentiels des micro-organismes à l'épithélium ou au mucus, le transit intestinal et les sécrétions endogènes (salive, sécrétions gastriques, hépatiques et intestinales, cellules issues du renouvellement de la muqueuse). Changer l'un des éléments de cet écosystème risque de déstabiliser l'ensemble de toutes les composantes biotiques et abiotiques interagissant entre elles pour aboutir à un équilibre. Ces mécanismes d'interaction sont très complexes et bien loin d'être élucidés.

I.4.2- Composition de la microflore intestinale :

La composition de la microflore intestinale varie en fonction de l'espèce animale et de son alimentation (Drasar et Barrow, 1985). La flore normale est définie par la présence constante de certaines espèces dans l'intestin. Chez un individu donné, il existe également des variations quantitatives et qualitatives en fonction de la région intestinale (Drasar, 1974). Si l'on exclut la bouche, directement en contact avec le milieu extérieur, les populations bactériennes présentes dans la lumière du tube digestif augmentent progressivement de l'estomac jusqu'à l'anus (**Figure1**).

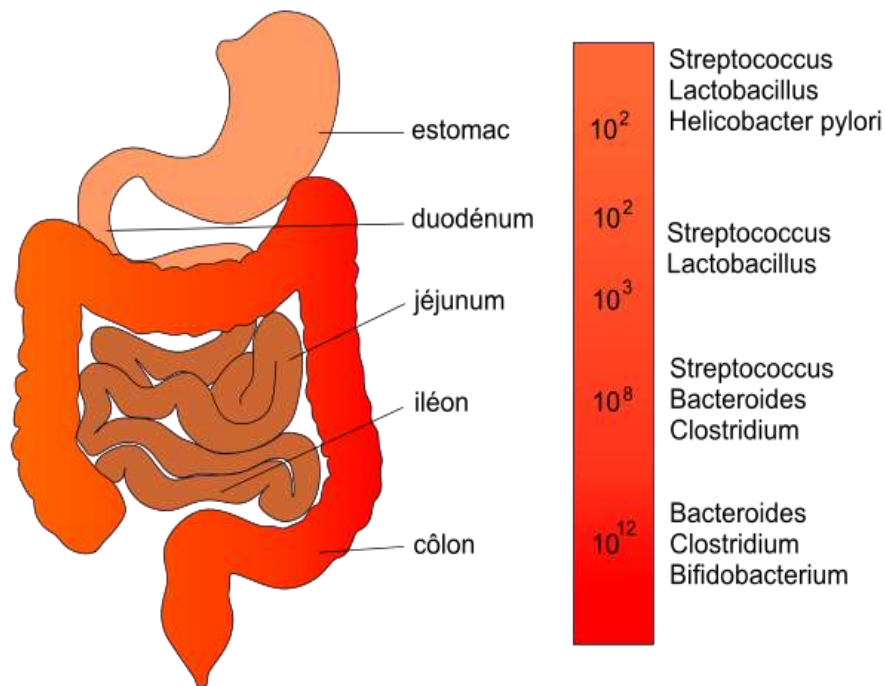


Figure 1 : Composition et concentration (cfu/ml) des espèces bactériennes du microbiote du tractus digestif (adapté de Sartor RB, Gastroenterology, 2008).

L'estomac contient toujours une flore plus abondante lorsque le pH est élevé comme chez le rat, le veau ou le porc et plus faible lorsque le pH est acide comme chez l'homme. En fait, seuls les micro-organismes à Gram positif aérobies ou anaérobies facultatives acidotolérantes sont capables d'y survivre. Cependant, des bactéries anaérobies strictes résistantes à l'acidité gastrique peuvent s'y implanter, c'est notamment le cas d'*Helicobacter pylori* capable de se loger dans la sous-couche du mucus. La principale flore résidente de l'estomac est composée de streptocoques et de lactobacilles.

A l'inverse, l'intestin grêle n'est pas un organe où les bactéries peuvent se multiplier chez un sujet sain, et constitue une région de transit. Lorsque les bactéries y prolifèrent, en particulier parce qu'elles possèdent des facteurs leur permettant d'adhérer à la muqueuse, il s'agit toujours d'un phénomène pathologique. En effet, la croissance bactérienne dans l'intestin grêle est limitée par le transit rapide, les bactériocines (Porter *et al.*, 2002) et les sécrétions biliaires et pancréatiques (Salminen *et al.*, 1998). Les premiers segments de l'intestin grêle comportent une flore très faible, constituée seulement par les bactéries gastriques en transit. Au fur et à mesure

que l'on se rapproche de l'extrémité distale de l'iléon, une augmentation importante de la flore en nombre et en variété a été observée (Gorbach *et al.*, 1967). Ainsi des espèces anaérobies facultatives à Gram négatif (entérobactéries) apparaissent à côté des espèces à Gram positif.

Les espèces anaérobies strictes augmentent progressivement le long du tractus digestif. Ainsi, au niveau **du colon**, leurs proportions deviennent 100 à 1000 fois plus abondantes que les espèces anaérobies facultatives. Le colon est le segment le plus peuplé (10^{10} à 10^{12} bactéries/g de contenu). Les bactéries représentent environ 50% du poids sec des selles (Finegold *et al.*, 1983). Un profil bactérien quantitatif et qualitatif caractérise la flore du colon de chaque espèce animale. Certains genres bactériens comme les *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus* appartiennent communément à la flore dominante de plusieurs espèces animales. Cependant, le genre *Lactobacillus* rencontré dans la flore dominante des rongeurs et du porc, ne se trouve que très occasionnellement dans la flore dominante de l'homme. Inversement, le genre *Bifidobacterium* appartenant à la flore dominante chez l'homme n'est pas répertorié chez les rongeurs.

La microflore fécale est constituée de l'ensemble de micro-organismes qui provient des différents biotopes du tube digestif. Elle reflète surtout l'équilibre microbien existant dans les régions caeco-coliques. Les fèces constituent ainsi un écosystème bactérien. Du fait de la facilité de prélèvement, l'écosystème fécal est le plus étudié chez l'animal et l'homme (Marteau *et al.*, 2001a). Il a été constaté que les populations anaérobies strictes et facultatives sont co-dominantes dans le colon proximal alors que seuls les anaérobies stricts sont dominants dans le colon distal et les matières fécales. Par conséquent, les études de l'écosystème bactérien fécal renseignent particulièrement sur la microflore présente dans la partie terminale du colon.

I.4.3-composition classique d'une flore intestinale humaine

On peut définir de façon "simpliste" une flore normale par l'ensemble des espèces présentes dans l'écosystème de façon constante et capables de s'y multiplier dans les conditions environnementales du tube digestif (Figure 1). Mais il existe de très grandes variations dans les résultats publiés, selon les modes de prélèvement, les méthodes microbiologiques, la présence éventuelle de bactéries d'origine alimentaire, la physiologie intestinale et le contexte environnemental. On est loin de connaître toutes les espèces et leurs différents types, donc de bien appréhender les variations de flore induites par les modifications de régime alimentaire, les bactéries exogènes, les substances antibiotiques.

Les bactéries habituellement présentes dans l'intestin grêle appartiennent aux genres :

Lactobacillus, *Streptococcus*, et à quelques espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* à des concentrations faibles jusqu'à l'iléon où elles apparaissent dominées par des espèces anaérobies à Gram négatif appartenant au genre *Bacteroides*.

Dans le côlon, il faut distinguer 4 types de flore :

- **Flore dominante** ($N > 10^9$ UFC/g) exclusivement anaérobie : *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Propionibacterium*.

- **Flore sous dominante** ($10^6 > N > 10^8$ UFC/g) : différentes espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (surtout *E.coli*) et les genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Desulfovibrio*, *Methanobrevibacter*,

- **Flore résiduelle** ($N < 10^6$ UFC/g) : bactéries en transit ou réprimées par la flore résidente,

- **Flore fécale** : facilement accessible pour l'analyse, elle renferme de nombreuses espèces mortes et n'est pas représentative des différentes niches écologiques de l'écosystème microbien digestif, L'analyse de la flore fécale ne donne qu'une vue très limitée de l'écosystème mais permet de retrouver des souches pathogènes ou potentiellement pathogènes pour l'hôte.

I.4.4 - Persistance et survie des probiotiques dans l'environnement digestif :

- Il est bien admis que les probiotiques transitent dans le tube digestif sans le coloniser.

Néanmoins une colonie provisoire est toutefois possible. Certaines bactéries lactiques peuvent persister jusqu'à plusieurs semaines. Même si les bactéries lactiques ne font que transiter dans le tube digestif, elles sont capables d'exercer leurs effets et d'avoir ainsi un impact sur l'hôte (Corrieu, Georges *et al.*, 2005)

- L'étude de la survie des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal est importante pour une meilleure connaissance du devenir des bactéries lactiques ingérées avec l'aliment et une meilleure compréhension de l'action des probiotiques chez l'homme et l'animal. Il est probable que pour exercer un effet probiotique significatif, les bactéries doivent arriver vivantes et en nombre suffisant dans l'intestin (Drouault et Corthier, 2001). Dans le tube digestif, les conditions d'environnement sont très différentes du produit contenant des probiotiques. Dans l'estomac, l'acidité peut être très élevée mais une part importante des bactéries lactiques est évacuée avec les premières vidanges gastriques et elles atteignent rapidement l'iléon en une à deux heures après le repas. Dans l'intestin grêle, les sels biliaires, les enzymes pancréatiques et des défensines produites par les cellules de l'intestin grêle peuvent réduire la viabilité des bactéries probiotiques.

Dans le colon, les bactéries se trouvent confrontées à une flore intestinale qui leur est 1000 à 10000 fois supérieure en nombre et qui peut avoir des répercussions sur leur viabilité et leur physiologie. Cependant, il a été montré que non seulement les probiotiques étaient capables de survivre, mais également qu'ils étaient capables de moduler leur métabolisme pour s'adapter à l'environnement digestif de l'homme (Oozeer, Doupil-Feuillerat *et al.*, 2002).

- Le moyen le plus fiable d'étudier le devenir des bactéries ingérées dans le tractus digestif est d'effectuer des mesures *in vivo*. Pour cela, deux techniques peuvent être utilisées : le recueil des selles et l'intubation intestinale. Ces deux techniques ont déjà permis d'étudier la survie d'un petit nombre de bactéries lactiques, essentiellement des lactobacilles, dans le tractus digestif (Marteau, Pochart *et al.*, 1992).

- Plusieurs études sur souris gnotoxéniques (inoculés par un ou plusieurs microorganismes définis) montrent que les bactéries résidentes ont un effet sur l'hôte dès lors que leur taux dépasse 10^7 bactéries/g de fèces. Cette condition est vraisemblablement valable pour les probiotiques (Gill, 1998), et le taux de survie dans le tube digestif (10 à 30 % selon les souches) est ainsi un critère important pour avoir un effet (Moreau, 2001)

I.5.les prébiotiques :

I.5.1 Définition :

Mots qui vent dire avant la vie : sont des ingrédients alimentaires qui servent de nourriture aux probiotiques stimulant leur croissance ou leur activité (Breton,2007 ; Richard,2008 ; Roberfroid, 2009).

Gibson définit le prébiotique comme un ingrédient alimentaire non-digestif qui affecte positivement l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et ou l'activité d'un nombre limite de bactéries dans le colon qui ont le potentiel d'améliorer la santé de l'hôte (Belamri et Benkerroum, 2005; Rannuz,2009).

Ils se trouvent naturellement dans les légumes, les fruits, les céréales, et dans le lait maternel.

L'administration de prébiotique stimulant la prolifération des bactéries lactiques surtout des bifidobactéries qui fermentent les fibres prébiotiques et les réduisent en acide gras à chaîne courte (Braegger, 2002). -par exemple. Les prébiotiques les plus communs sont :

- Fructo-oligosaccharide (FOS) ou Fructosanes.
- L'inuline
- Les galacto-oligosaccharides (GOS)

- Le lactulose
- Lactitol
- Les isomalto-oligosaccharides (IMO)

I.5.2-Action des prébiotiques :

- Amélioration du transit intestinal.
- Stimulation de l'immunité locale.
- Amélioration de l'absorption minérale.
- Diminution des bactéries pathogènes.
- Diminution de l'absorption du cholestérol.
- Diminution des composés carcinogènes.

D'après plusieurs études, les prébiotiques auraient un effet bénéfique dans la diminution de la constipation et un rôle dans la réduction de risque de cancer colorectal ou des maladies infectieuses, ces résultats sont à confirmer par de nouvelles études d'intervention chez l'homme (Reigand, 2003).

I.6 - Les rats de laboratoire:

Les rats utilisés en laboratoire appartiennent à l'espèce *Rattus Norvegicus*, tout comme nos rats domestiques, mais ils appartiennent à des souches particulières. Chaque souche a été travaillée en laboratoire pour faire apparaître des caractéristiques propres.

I.6.1. la flore du rat :

La microflore du rat est caractérisées par une grand dominance des bactéroïdes dans le caecum et le gros intestin (Schaedler et al ., 1962; Smith 1965 ; Spears et al.,1967). La microflore du rat est constitué de *Lactobacillus* et streptocoque anaérobies (Duobos, Schaedler et al .,1963; Schaedler et al ., 1965) qui apparaissent en premier après la naissance et persistent en plus grand nombre dans tout l'intestin et l'estomac (Dubos et al,1968 ;Tannock1997 ;Li et al .2004), on trouve également des streptocoques, des microcoques, *Clostridium welchii*, et la présence de levures et souvent constatée (Schaedler et al .,1962 ;Smith 1965 ;Savage et al, 1967). E.coli est trouvé constamment, mais parfois en quantité proche de celui des lactobacilles et d'autres fois en quantités bien plus faible (Smith, 1965). Enfin certains espèces, par exemple les *Flavobacterium*, apparaissent très transitoirement et uniquement dans l'intestin grêle, puis disparaissent rapidement ensuit (Ducluzeau, 1969).

I.6.2 -L'appareil digestif du rat :

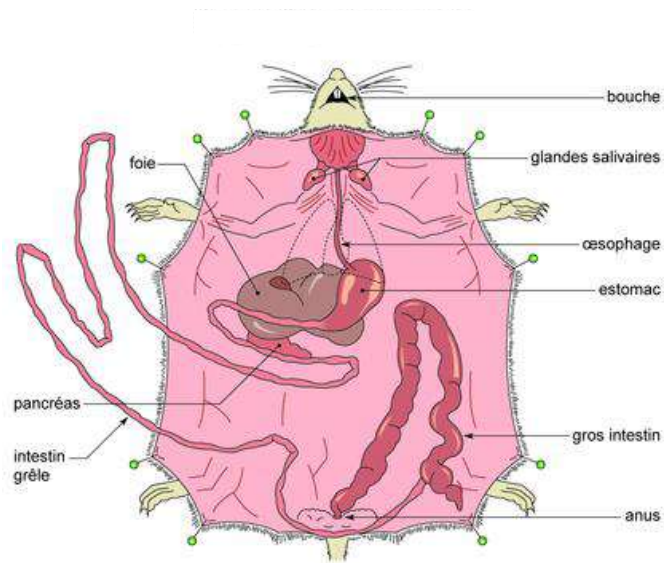


Figure 2 : l'appareil digestif du rat.

L'appareil digestif du rat comprend, de l'avant vers l'arrière:

- une bouche comportant des dents qui permettent de couper et de broyer les aliments ingérés (mastication) ;
- un œsophage, ou conduit, situé sous la trachée, qui relie la bouche à l'estomac ;
- un estomac ou poche à paroi musculaire et sécrétrice ;
- un intestin grêle relativement long, à petit diamètre et à paroi musculaire et sécrétrice ;
- un gros intestin, plus court et de plus gros diamètre que l'intestin grêle, menant à l'anus (par lequel sont éliminées les matières fécales ou selles).

L'ensemble constitue le tube digestif. Sur ce tube sont fixées des glandes annexes qui produisent des sécrétions ou sucs digestifs. Ainsi, le foie sécrète la bile qui se déverse par un canal dans l'intestin grêle. Le pancréas, situé sous le foie, sécrète le suc pancréatique qui se déverse aussi dans l'intestin grêle. Les glandes salivaires produisent la salive qui se déverse dans la bouche.

1. Wistar :



Figure 3 : rat de la souche Wistar.

La souche Wistar est la plus connue et la plus répandue de toutes les souches de rats de laboratoire. C'est une souche consanguine de rat albinos développée à l'institut Wistar en 1906 pour une utilisation dans la recherche biologique et médicale. Elle est notamment la souche de rats développée pour servir d'organisme modèle à un moment où les laboratoires utilisaient principalement la souris. Plus de la moitié de toutes les souches de rats de laboratoire sont les descendants de la colonie d'origine établie par le physiologiste Henry Donaldson et l'embryologiste Helen Dean King. Le rat Wistar se caractérise par sa tête large, ses oreilles longues et une longueur de queue toujours inférieure à la longueur du corps. D'autres souches ont été développées à partir des Wistar.

b) Pourquoi avoir choisie cette souche ?

C'est une souche avec une bonne longévité qui est utilisé également dans le cadre d'étude comme rats témoins. On peut trouver dans le milieu de la recherche la vente de «WISTAR âgés » qui sont des rats mâles destinés uniquement au vieillissement, et qui sont élevés jusqu'à l'âge de 24 mois. La preuve que l'on tant à avoir des animaux avec une bonne longévité qui vieillissent bien !

Chapitre02 : Matériels et Méthodes

2-1. Matériel

2-1-1. Les souches bactériennes

- Les souches de bactéries lactiques

Les souches utilisées au cours de cette étude sont essentiellement des lactobacilles et des bifidobactériens de différentes origines. Les souches et leurs sources d'isolement sont indiquées dans le **Tableau02**.

Tableau02 : Genres, espèces et sources d'isolement des bactéries lactiques utilisées.

Souches	Genre et espèce	Source d'isolement
NSC ₁₀ -NSC ₆ -NSC _{11A} - NSC _{5A}	<i>Lactobacillus SP</i>	Lait de chamelle de Naama (Amara, 2014)
MECH _{III} MECH _{C6}	<i>Lactobacillus sp</i> <i>Bifidobacterium SP</i>	Lait de chamelle de Mechria (Amara, 2014)
BECH _{II3}	<i>Lactobacillus sp</i>	Lait de chamelle de Bechar (Amara, 2014)
CHEVRE ₁₀ -CHEVRE _{5A}	<i>Lactobacillus sp</i>	Lait de chèvre de Saida (Amara.,2014)

- Sources des bactéries pathogènes (Indicatrice):

Les entérobactéries et entérocoques utilisées pour déterminer l'effet inhibiteur de nos souches lactiques, proviennent des diverses origines, EL1 et ES1 proviennent du soucier du laboratoire LBMB de l'université d'Oran, les souches pathogènes sont référenciées et proviennent du soucier l'Université de tlemcen .

Tableau03 : Souches des bactéries pathogènes utilisées et leurs sources d'isolement.

Souches	Genre et espèce	Sources d'isolement
EL 1	<i>Hafnia alveei</i>	Lait de vache cru de Saida, (AMARA, 2012)
Es 1	<i>Salmonella pullorum</i>	Selles de bébé Saida, (AMARA, 2012)
Bech II 3	<i>Enterococcus sp</i>	Lait de chamelle de Bechar, (AMARA, 2014)
T2	<i>Citrobacter sp</i>	Souches référenciées de
T3	<i>Pseudomonas sp</i>	l'université de tlemcen
T4	<i>Staphylococcus aureus</i>	
T6	<i>Listeria monocytogénèse</i>	
T7	<i>Clostridium fragilis</i>	

2-1-2-Les animaux

Au cours de cette étude nous avons disposé de 15 rats de race Wistar provenant de l'animalerie de Saida (Ain El Hdjar) et d'Oran (Es-Sénia). Les animaux étaient âgés de 25 à 30 jours.

2-1-3. Les milieux de culture

- Milieu MRS (de Man *et al.*, 1960) pour la culture et l'isolement des bactéries lactiques: ce milieu a été aussi modifié en fonction des besoins des différents tests nécessaire à cette étude.
- Milieu LB (lysogenic broth) pour la croissance des entérobactéries.
- Milieu désoxycholate-lactose pour l'isolement et la sélection des entérobactéries.
- Milieu au bleu de bromothymol lactose agar est un milieu sélectif pour la croissance des bâtonnets à Gram négatifs.
- Milieu chapman : milieu sélectif des bactéries halophiles dont les staphylocoques.
- Milieu SS (salmonella-shigella) : pour l'isolement des salmonelles est des shigelles.
- Milieu GN : est un milieu d'isolement non-sélectif pour le dénombrement de la flore mésophile totale.

2-1-4-les Antibiotiques

Les antibiogrammes ont été réalisés en utilisant des disques commerciaux d'antibiotiques. Le **Tableau 04** montre les antibiotiques utilisés pour cette étude ainsi que leurs familles et leurs modes d'actions:

Tableau 04: Antibiotiques utilisés, leur famille et leur mode d'action.

	Famille	Quantité (µg ou U/ disque)	Mode d'action
Oxacilline (OX)	Bêta-lactamine	(1mcg)	Inhibition des activités de trans-peptidase impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne
Ticarilline (TC)		(75 mcg)	
Cefepime(FEP)		(30µg)	
Amoxicilline (AML)		(30µg)	
Ampicilline (AMP)		(10 µg)	
Kanamycine (K)	Aminosides	(30 mcg)	Inhibition de la synthèse des protéines : agit en se liant à la sous-unité 30S des ribosomes bactériens. Cette interaction interfère avec la traduction des ARN messagers, qui induit l'arrêt de la traduction ou la synthèse de protéines tronquées
Streptomycine (S)		(10 µg)	
Gentamicine (CN)		(10 µg)	
L'acide fusidique(FC)	Fusidamine	(10 µg)	Inhibition de la synthèse protéique chez les bactéries, il bloque la traduction en se liant au facteur d'élongation EF-G.ceci bloque la translocation ou progression du ribosome sur l'ARN messenger

Matériel et méthode

Céfotaxine (CTX)	Céphalosporines	(30 µg)	Inhibition de l'élaboration de la paroi bactérienne, en interférant avec la synthèse du peptidoglycane
Fosfomycine (FOS)	Acide phosphonique	(200 mcg)	agit par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. En effet, la fosfomycine se comporte comme un analogue du phosphoénolpyruvate et inhibe l'enzyme pyruvyl-transférase , ce qui a pour conséquence de bloquer la formation d'acide N-acétylmuraminique
Clindamycin (CM)	Lincosamide	(2µg)	Elle possède une action principalement bactériostatique à l'encontre des bactéries aérobies Gram + et d'un large spectre de bactéries anaérobies.
Imipenem(IPM)	Carbapénèmes	(10 Ug)	Entraîne un défaut de la paroi cellulaire et s'en suit une lyse bactérienne
Tétracycline(TE)	Tétracyclines	(30 µg)	Empêche la fixation de l'aminocyl-ARNt entrant dans le site A du ribosome.

Nitroxoline(NTX)	Quinoleine	(30 U)	Inhibe de manière sélective la réplication de l'ADN bactérien
Amoxicilline /Ac clavulaniques (AMC)	pénicilline + inhibiteur de bêtalactamase	(20/10 µg)	Interruption du processus de transpeptidation qui lie les peptidoglycanes de la paroi bactérienne. Les bêta lactamines se lient et inactivent des cibles enzymatiques situées sur la paroi interne de la membrane bactérienne

2.1.5-Les prébiotiques :

Les prébiotiques utilisés sont des fructooligosaccharides (F.O.S) de la firme BioCare, purs extraits de racines de chicorée, le produit est conditionné sous forme de poudre dans un pot de 250g.

2-2. Méthodes

2-2-1. Purification des bactéries lactiques

La purification est réalisée en prélevant une colonie isolée d'une culture sur boîte de Pétri afin d'ensemencer la suivante. Cette opération est répétée plusieurs fois pour l'ensemble des souches testées pour s'assurer de leur pureté ainsi que de leur viabilité.

-La coloration de Gram des cellules permet ensuite d'observer au microscope la forme, le mode d'enchaînement et de vérifier leur appartenance au groupe des bactéries à Gram positif.

-Le test de la catalase est réalisé en ajoutant une goutte de H₂O₂ sur une colonie isolée.

- **Conservation des souches :**

En fonction des besoins, les souches sont conservées selon deux différentes méthodes:

1-conservation de courte durée :

Les souches pures étaient ensemencées dans des tubes de gélose inclinée puis incubées à 30°C pendant 24 à 48h. Le stockage des tubes est réalisé à 4°C, cette opération est renouvelée à une fréquence d'une fois par mois pour garantir la viabilité et la pureté des souches.

2-conservation de longue durée :

Les souches purifiées sont congelées à une température de -20°C en présence d'un cryoprotecteur tel que le glycérol ou le lait écrémé, elles peuvent également être conservées lyophilisées à une température de -80°C.

2-2-3. Sélection des souches à caractère probiotique

Nous avons testé la croissance des souches dans des milieux acides, en présence de sels biliaires, puis nous avons examiné leur résistance aux antibiotiques et leur capacité à inhiber les entérobactéries potentiellement pathogènes présentes dans le tube digestif.

2-2-3-1. Recherche de la résistance en milieu acide

La résistance à l'acidité est recherchée en ensemençant une série de bouillon MRS à pH ajustés allant de pH1 à pH6. Le test consiste à déterminer le taux de croissance de chaque souche dans les différents milieux par spectrophotométrie à 600nm.

2-2-3-2. Test de résistance aux sels biliaires

La résistance aux sels biliaires se fait sur gélose MRS additionnées de bile de mouton. Cette gamme de concentration est croissante, allant de 0,25% à 10% (0,25% ; 0,5% ; 1%, 2%, 5% et 10%). La bile utilisée a été stérilisée à l'aide d'un filtre millipore et ajoutée stérilement à la gélose MRS. Les souches ont étéensemencées à la surface des différents milieux à partir d'une pré-culture de 18-24h.

Ce test est qualitatif (présence ou absence de croissance). Le diamètre des colonies est toutefois mesuré sur les différents milieux pour une estimation approximative de la croissance.

2-2-3-3. Test de résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été réalisée sur un ensemble d'antibiotiques (voir **Tableau04**) de différentes familles (Bêta-lactamine , Céphalosporines, fisdamine, acide phosphonique, Carbapénèmes, Tétracyclines, Lincosamide, Quinoleine, Aminosides) par la technique de l'antibiogramme en milieu solide en bicouche. Une couche de gélose solide est recouverte de 7ml de gélose molle maintenue en fusion à 45°C puisensemencée avec 0,5ml de culture fraîche. On laisse sécher cette double couche puis on dépose stérilement les disques d'antibiotiques, en prenant soin de bien les espacer à la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées pendant 24h à 30°C.

Les diamètres des zones d'inhibitions autour des disques d'antibiotiques sont mesurés. Les souches sont dites résistantes si ce diamètre est moins à 15mm, si par contre il dépasse ce seuil elles sont considérées comme sensibles (Karam,1994).

2-2-3-4. Recherche de l'antagonisme des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes :

Le but de ce test est de déterminer l'effet inhibiteur des bactéries lactiques sur les pathogènes. Pour la réalisation de ce test, des pré-cultures de l'ensemble des souches sont effectuées 24h au préalable. Les bactéries lactiques sontensemencées sur bouillon MRS et les entérobactéries sontensemencées sur bouillon LB.

- **Test en milieu solide**

Les souches de lactobacille sont ensemencées en touches sur une gélose MRS solide. Après 24h d'incubation, on recouvre les cultures avec un mélange homogénéisé composé de 10ml de LB semi-solide ensemencé par 0,1ml de culture fraîche de souche pathogènes. Après solidification de cette deuxième couche, les boîtes sont incubées pendant 24h à 37°C.

L'inhibition des bactéries pathogènes par les lactobacilles se manifeste par l'apparition de zones d'inhibition autour des touches de bactéries lactiques. La taille de ces halos est alors mesurée.

2.2.3.5-Croissance des souches lactiques en présence de fructooligosaccharides (F.O.S)

- **En milieu solide**

Les prébiotiques sont reconnus pour leur capacité à favoriser la croissance des probiotiques, afin de tester cette aptitude, nous avons préparé une gélose MRS contenant 6% de fructooligosaccharides soit 6g de F.O.S dans 100ml de gélose MRS (Amara, 2012). Des cultures fraîches des souches sont réalisées pour l'ensemencement en touches du milieu précédemment préparé. Les cultures témoins sont réalisées sur un milieu MRS dépourvu de F.O.S.

Après incubation à 30°C pendant 24h les tailles des colonies sur les différents milieux sont comparées. Une augmentation de la taille des colonies en présence de F.O.S indiquera une stimulation de la croissance par la présence du prébiotique.

2-2-5. Expérimentation *in vivo*

2-2-5-1. Conditions d'élevage des rats

- Habitat et nourriture

Les 15 rats ont été disposés à nombre égal dans 3 cages (**Figure04**). Les cages étaient disposées dans un garage. Chaque cage a des dimensions de 25cm profondeur, 37cm de largeur et 17cm de hauteur ; les mangeoires utilisées sont rectangulaires, les abreuvoirs sont une sorte de biberon fabriqués à l'aide de bouteilles en plastique d'une contenance de 500ml.

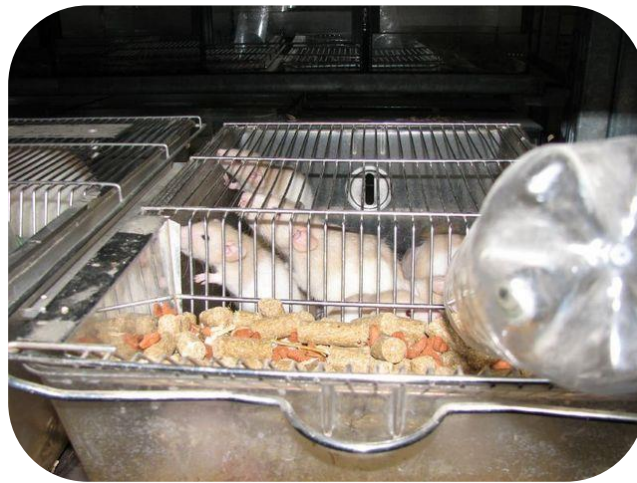


Figure04: rats âgés de 30 jours dans leur habitat.

- Nourriture et conditions d'élevage :

Les animaux étaient nourris 3 fois par jour, à 9h, 13h et 18h. Leur alimentation est commercialisée sous forme de copeaux et composées d'un mélange de céréales, de suppléments protéiques et de divers autres composés, dont des vitamines, comme montré dans la **Figure05**.



Figure05 : nourriture destinée aux rats

Matériel et méthode

L'autre apport nutritionnel est constitué de pain sec, présenté sous forme de poudre (chapelure de pain).

-Lot 1 (Témoin) : est alimenté 3 fois par jour sans régime particulier + 100ml d'eau du robinet (bouilli et refroidi) sans lait fermenté.

-Lot 2 (NSC 10) : est alimenté normalement et reçoit comme abreuvement 10ml de lait fermenté par la souche NSC10 + 90ml d'eau du robinet traitée.

-Lot 03(chèvre 10) : est alimenté normalement et reçoit comme abreuvement 10ml de lait fermenté par la souche chèvre10 + 90ml d'eau du robinet traitée.

Les mangeoires et les abreuvoirs étaient nettoyés soigneusement à l'eau savonneuse avant chaque repas pour garantir une bonne hygiène. Les rations alimentaires étaient ajustées selon l'âge et la demande des rats.

Les cages étaient nettoyées un jour sur deux pendant toute la durée de l'expérimentation.

2-2-5-2. Techniques d'administration des différentes souches lactiques : Les bactéries éventuellement probiotiques sont présentées 3fois par jour à heure et quantités fixes (10ml/jour /lot) aux animaux sous forme de lait fermenté dilué dans l'eau d'abreuvement.

- **Préparation du lait fermenté :**

Un dénombrement est réalisé à la fin de la fermentation par la méthode des dilutions décimales et ensemencement sur MRS, le nombre de ces bactéries lactiques était d'environ 10^9 dans le coagulum.

Des tubes contenant chacun 6ml de lait demi écrémé stérile sont ensemencés avec un lactobacille (NSC10 ou *CHEVRE10*) et incubés à 30°C jusqu'à coagulation. Ce lait coagulé sert d'inoculum pour ensemencer 200ml de lait partiellement écrémé. Les cultures sont incubées et le coagulât obtenu est ensuite conservé à 4°C jusqu'à ce qu'il soit présenté aux animaux.

2-2-6. Paramètre zootechniques

2-2-6-1. Consommation

- **Nourriture consommée**

Avant et après chaque repas, la nourriture est pesée de sorte à avoir exactement la quantité consommée par chaque lot. La différence entre les pesées indique la quantité de nourriture consommée selon la formule :

$$\text{Nourriture consommée (g)} = \text{nourriture présentée (g)} - \text{nourriture résiduelle (g)}$$

- **Pesée des animaux**

Les animaux sont pesés une fois par semaine, à partir du premier jour de l'expérimentation, c'est-à-dire à l'âge de 30 jours, jusqu'à la fin des 5 semaines, en respectant le jour et l'heure de la pesée.

2-2-6-2. Paramètres de croissances

- **Gain de poids moyen par semaine**

Le gain de poids hebdomadaire moyen est déterminé en soustrayant le poids des animaux de la semaine « S_{n-1} » à celui de la semaine « S_n », divisé par le nombre d'individus du lot en question selon la formule :

$$\text{Gain de poids moyen (g)} = \frac{\text{Poids des individus à } S_n - \text{Poids des individus à } S_{n-1}}{\text{Nombre d'individus du lot}}$$

- **L'indice de consommation**

L'indice de consommation (IC) est déterminé par le rapport entre la quantité d'aliment consommée et le gain de poids :

$$\text{IC} = \text{Quantité d'aliment consommée} / \text{Gain de poids}$$

- **Le poids vif moyen**

C'est le rapport entre le poids total des individus d'un lot et leur nombre :

Poids vif moyen = Poids total / Nombre d'individus par lot

2-2-6-3. Paramètres microbiologiques

La qualité microbiologique des selles de chaque lot d'animaux était examinée à un intervalle de 07 jours à partir du premier jour d'expérimentation jusqu'à la fin de l'étude, afin de déterminer les genres bactériens qui colonisent l'intestin des rats et suivre l'évolution de cette charge.

Pour cela 10g de matières fécales étaient prélevée à partir de plusieurs endroits de chaque cage et broyées dans 90ml d'eau physiologique stérile. Une série de dilutions décimales est effectuée (de 10^{-1} à 10^{-6}) à partir cette préparation puis un volume de 0,1 ml est prélevé de chaque dilution pour ensemercer différents milieux de culture afin de rechercher et dénombrer les genres bactériens selon la méthode de Zacconi *et al.* (1999), les boîtes retenues sont celles contenant un nombre de colonies compris en 30 et 300 UFC :

- **Dénombrement des bactéries lactiques dans la matière fécale**

Elles sont recherchées par culture en gélose MRS. Les boîtes, sont incubées à 30°C pendant 24h.

- **Dénombrement de la flore totale (FTAM)**

Les cultures sont réalisées sur de la gélose nutritive. Les boîtes, sont incubées à 37°C pendant 24h.

- **Dénombrement des coliformes fécaux**

Nous avons recherché les coliformes sur milieu désoxycholate. La gélose lactosée au désoxycholate à 0,1% est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement des coliformes dans le lait, les produits laitiers et les autres produits alimentaires. La gélose lactosée au bleu de bromothymol est également utilisée pour la recherche de ce genre bactérien. Les boîtes,ensemencées en double sont incubées à 37°C pendant 24h.

- **Dénombrement des staphylocoques pathogènes**

Pour la détection de ce genre microbien, nous avons eu recours à l'utilisation du milieu sélectif Chapman qui permet une distinction par la couleur des différentes espèces de staphylocoques. Les boîtes de Pétri,ensemencées en double, sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

- **Dénombrement des salmonelles et shigelles :**

Pour cela nous avons ensemencé des boîtes Pétri contenant le milieu SS, comme pour les milieux précédents, en incubant également à 37°C pendant 24h.

2.2.7 - Identification des souches probiotiques :

Nous avons utilisé les galeries **api 50chl** afin d'identifier les souches sélectionnées comme probiotique potentiel, pour cela nous avons préparé le milieu 50 chl, puis nous avons ensemencé un tube de 10ml contenant le milieu chl avec une souche probiotique jusqu'à obtention d'un trouble de 2 à l'échelle de Mac Farland. Ce bouillon servira au remplissage des microtubes de la galerie api 50chl.

La lecture des tests est effectuée après 24h et 48h d'incubation à 30°.

Les résultats obtenus sont relevés puis introduit dans le logiciel apiweb, dans le but d'avoir le genre et l'espèce de la bactérie testée.

Chapitre 03 : résultat et discussion

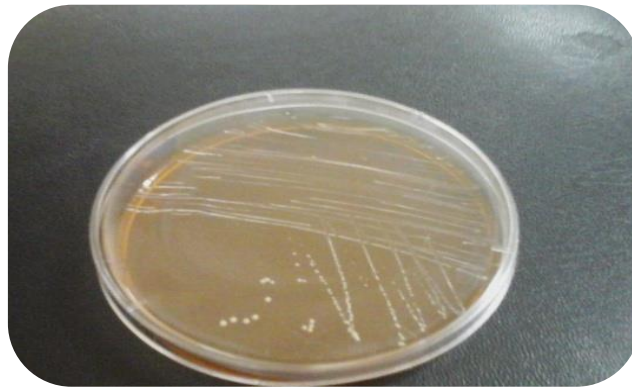
Chapitre 03 : Résultat et discussion :

3. Etude in vitro :

3-1-Vérification de la pureté des souches lactique :

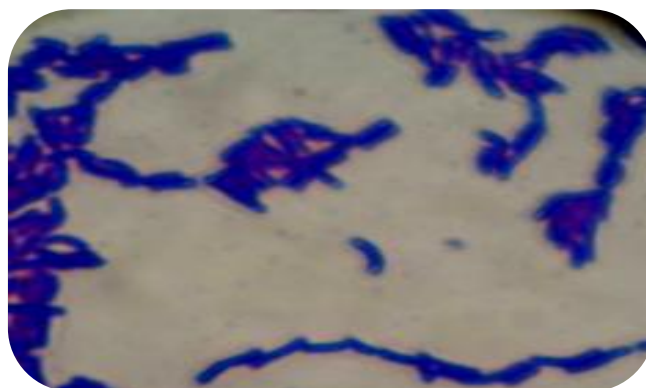
Afin de vérifier la pureté de nos souches nous avons eu recours à deux types d'observations :

- 1- **L'observation macroscopique** : sur milieu MRS, montre après croissance des souches une similarité de leur aspect macroscopique. les colonies obtenues sont blanches, elles se présentent sous une forme ronde, bombée avec un contour régulier et de taille sensiblement identique.



Figure(6) :l'aspect macroscopique des lactobacilles

- 2- **L'observation microscopique** : après une coloration de Gram, montre des bâtonnets Gram positifs disposés en diplobacille ou en chaînettes plus ou moins longues.



Figure(7) : aspect microscopique des lactobacilles (grossissement X100).

L'ensemble de nos souches donnent un résultat négatif en présence d'eau oxygénée, témoignant de l'absence de catalase.

3-3-Croissance des bactéries lactiques en milieu acide :

Les bactéries ont été cultivées en milieu MRS liquide acidifié aux PH suivant : PH1-PH2- PH3- PH4-PH5-PH6. La densité optique est mesurée après 24-48h à une longueur d'onde de 600nm.

Les résultats obtenus sont résumés sur le tableau ci-dessous.

Tableau (05) : croissance des bactéries lactiques en milieu acide

	NSC10	BECH13	MECH11	1 NSC6	MECHC	6 CHEVR	E5A CHEVR	E10 MECHC	7 NSC11A	NSC5A	MECH C8'
6	2,218	2,108	2,219	1,969	2,155	2,229	2,132	2,217	0,056	1,968	2,075
5	2,062	2,344	1,836	1,969	2,110	2,15	2,199	1,965	2,163	2,303	2,335
4	1,236	2,065	0,851	1,070	1,486	1,86	2,032	1,837	0,111	1,238	2,000
3	0,065	0,085	0,042	0,199	0,074	0,030	0,199	0,192	0,061	0,042	1,004
2	0,045	0,002	0,039	0,084	0,006	0,016	0,140	0,176	0,031	0,002	0,093
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Ces résultats indiquent que la totalité des lactobacilles poussent abondamment à pH6, pH5, pH4. Ce qui correspond aux pH idéaux de croissance des lactobacilles (Vos et al., 2009), les lactobacilles produisent également de l'acide lactique par fermentation des sucres présents dans le milieu d'où leur résistance aux pH bas.

Les lactobacilles sont considérés comme des acidophiles, cependant leur degré de tolérance à l'acidité est variable d'une espèce à l'autre.

A pH3 la plupart des souches poussent faiblement mis à part la souche Mech_{c8} *Bifidobacterium* SP qui croit à une densité de 1,004, à pH2 seule les souches Chèvre₁₀ *Lactobacillus* sp et Mech_{c7} *Bifidobacterium* sp montrent une DO supérieur à 0,100, ce qui concorde avec les résultats de Louembe et al (2005) qui a démontré que des souches de *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis* pouvaient résister à pH2.

Cette résistance au stress acide peut être attribuée à un ensemble de trois protéines : GroEs, GroEL, Dnak, sont fortement produites en condition d'adaptation au stress, ces trois protéines appartiennent à la famille des protéines induites en réponse à des conditions de stress variées, notamment le stress acide, et cela a été décrit chez d'autres bactéries à Gram positif comme

Résultat et discussion

Lactococcus lactis (Hartke et al , 1994 ; Kilstrup et al ,1997), *Bacillus subtilis* (Petersohn et al .,2001) et *Listeria monocytogenes* (Hanawa,1995).

La résistance de ces souches à l'acidité favorise leur survie dans le suc gastrique afin d'atteindre les intestins pour y proliférer.

3-4-croissance des bactéries lactiques en présence de sels biliaire :

La croissance de toutes les souches lactiques sont testées dans du bouillon MRS à des concentrations croissantes en sels biliaires (0,25%, 0,5%,1 %,2%,5%, 10%).

0,5%



5%



Incubation à 30°C pendant 24 h

Figure(08) : aspect des colonies des bactéries lactiques sur un milieu MRS à 0,5% et à 5% de sels biliaires.

L'ensemble des bactéries poussent de façon remarquable jusqu'à la concentration de 1% en sels biliaire, néanmoins à partir de 2% les diamètres des colonies de certaines souches telles que MECH_{c7} et NCS_{11A} diminuent en dessous de 1cm, on remarque que la taille des colonies et la concentration des sels biliaires ont une proportionnalité inverse c.à.d. la taille diminue avec l'augmentation des concentrations (tableau 6).

On note également que malgré l'augmentation des concentrations, la totalité des souches lactiques testées poussent jusqu'à une concentration de 10% en sels biliaires.

TABLEAU(06) : croissance des lactobacilles en présence des sels biliaries

Souche	NSC10	BECH113	MECH11	NSC6	MECHC6	CHEVR5A	CHEVRE10	MECHC7	NSC11A	NSC5A	MECH C8'
0,25%	1,7	2	1,5	1,9	1,7	2	1,8	1,2	1	2,3	1,8
0,50%	1,8	2,1	1,5	1,5	1,6	2	1,7	1,3	1	1,9	2
1%	1,5	1,4	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,1	1,4	1,4	1,5
2%	1,2	1,2	1,6	1	1,5	1,2	1	0,8	0,7	1,4	1
5%	1,2	1	1	1	1,4	1,2	1,1	0,8	0,6	1,1	1
10%	0,7	0,8	1	0,7	1,1	1	0,9	0,6	0,5	1,1	0,8

Selon les travaux de (ROY. ,2006) plusieurs bactéries probiotiques d'origine intestinale comme les bifidobactéries ont développé des mécanismes pour résiste à l'action détergente des sels biliaries. Cette activité enzymatique est la déconjugaison des sels biliaries grâce à la « Bile Salt Hydrolase » (BSH, EC 3.5.1.24), qui est aussi appelée cholyglycine hydrolase. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des sels biliaries conjugués avec la glycine ou la taurine en résidus d'acides aminés et en sels biliaries libres. La plupart des bactéries probiotiques proposées comme produits de santé naturels peuvent posséder cette activité. Selon, le règlement, il est essentiel de s'assurer que la déconjugaison dans l'intestin grêle n'est pas accrue et qu'aucun changement ne survient dans le gros intestin. La revue des données scientifiques supporte l'hypothèse que la déconjugaison des sels biliaries par des bactéries possédant une activité BSH permet la détoxification de ceux-ci et augmente leur chance de survie dans l'intestin. L'activité BSH d'un probiotique sera donc désirable puisqu'elle maximise ses chances de survie dans le tractus gastro-intestinal. De plus, il a été proposé que la déconjugaison des sels biliaries possède des effets bénéfiques sur l'hôte comme la diminution des niveaux de cholestérol.

3-5-Antibiogramme des bactéries lactiques:

Ce test permet de mette en évidence la sensibilité de nos 11 souches vis-à vis de 18 antibiotiques sur milieu solide, la lecture consiste à mesure le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque d'antibiotique, si le diamètre est inférieure ou égale à 15mm les bactéries cultivées en milieu MRS sont considérées comme résistantes à l'antibiotique, et s'il est supérieur à 15mm elles sont considérées comme sensible (Karam, 1994).

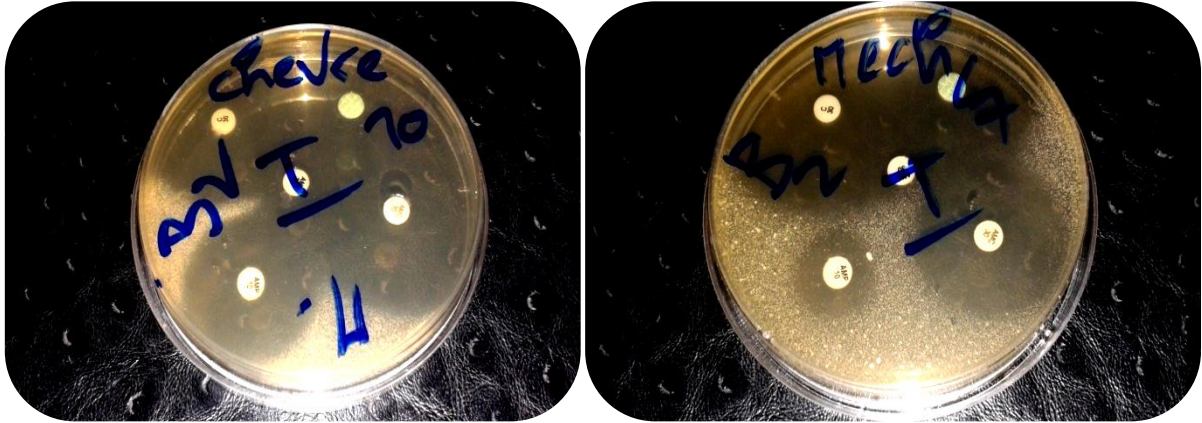


Figure (09) : aspect des antibiogrammes en milieu MRS solide

Les résultats obtenus pour l'ensemble des souches sont présents dans le tableau (07), ils montrent que la sensibilité aux antibiotiques est variable en fonction des souches.

Nos résultats montrent une multi-résistance aux différents antibiotiques employés figure09, ce constat concorde avec plusieurs études sur la résistance des bactéries lactiques aux antibiotiques. Nous citons les travaux de Bjorklind et al., 1990; Spanggaard et al ,1993; Dixon 1994 ;Mcphearson et al,2009 qui ont montré une augmentation de la fréquence de la résistance de plusieurs espèces de bactéries lactiques.

TABLEAU (07) : antibiogramme des bactéries lactique.

ATB																		
Souches	OX 1mcg	K 30mcg	FC 10ug	FOS 50ug	FOS 200ug	FEP 30ug	CN 10ug	TE 30mcg	IPM30mcg	AMC30mcg	C 30ug	AMP10ug	AML30ug	CM 2ug	TC 75ug	S 10ug	CTX 30ug	NET 30ug
NSC10	+/-	R	R	R	R	S	S	S	+/-	S	S	S	R	S	S	+/-	S	S
BECHII3	R	R	R	R	R	S	+/-	S	S	S	S	S	+/-	S	S	R	S	S
MECHII1	+/-	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
NSC6	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
MEHC6	+/-	R	R	R	R	S	+/-	S	S	S	S	S	+/-	S	S	R	S	S
CHEVRE5A	+/-	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
CHEVRE10	+/-	R	R	R	R	S	+/-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
MEHC7	+/-	R	R	R	R	S	+/-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
NSC11A	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
NSC5A	S	R	+/-	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
MEHC8'	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S

(R) : Résistante ; (S) :sensible ; (+/-) : intermédiaire.

OX :Oxacilline , **K** : Kanamycine , **FC** : L'acide fusidique , **FOS** : Fosfomycine , **FEP** :Cefepime , **CN** : Gentamicine , **TE** : Tétracycline , **IPM** : Imipenem , **AMC** :clavulaniques , **C** : chloramphénicol , **AMP** : Ampicilline , **AML** :Amoxicilline, **CM** : Clindamycine , **TC** :Ticarciline , **S** : Streptomycine , **CTX** : Céfotaxine , **NET** : Netilmicine.

Les résultats obtenus montrent que la majorité des souches testées ont une multi résistance face à différents antibiotiques, tels que le Kanamycine , L'acide fusidique , la Fosfomycine et la Streptomycine, en revanche elles sont sensibles aux 10 antibiotiques suivants : Cefepime , Tétracycline, Imipenem, clavulaniques, Ampicilline , Chloramphénicol, Clindamycine , Ticarciline, Céfotaxine, Netilmicine.

La résistance est variable vis-à-vis de l'Oxacilline, la Gentamicine et l'amoxicilline.

La multi résistance de la plupart des souches est également rapportée par plusieurs auteurs (Bhattacharjee et al, 1988 ;Rhodes et al ,2000) et selon ces études l'utilisation croissante et abusive

Résultat et discussion

des antibiotiques a donné naissance aux bactéries résistantes par le biais de plasmides de résistance transmitt entre ces dernières .

L'acquisition d'une résistance à un antibiotique donné peut s'accompagner d'une résistance à un ou plusieurs autres antibiotiques sans que la bactérie ait été à leur contact. Ce phénomène est lie à la présence fréquente de plusieurs gènes de résistance sur un même plasmide (ADN extra chromosomique transmissible entre bactéries).

Ces résistances aux antibiotiques peuvent être portées soit sur un plasmide ou sur l'ADN génomique, la résistance reste stable et si elle se trouve sur le chromosome, cependant elle peut se perdre si les gènes de résistances se situent sur un plasmide, ce dernier peu être dilué ou curé de la bactérie qui le contient, la bactérie deviendra alors sensible à ces mêmes antibiotiques.

3-6.-Antagonisme des souches des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes :

Toutes les souches de bactéries lactiques ont été testées pour déterminer leur activité antibactérienne par la méthode de Fleming et al, (1975). Elle consiste à ensemencer en touches les différentes souches de bactéries lactiques sur le milieu MRS solide, après séchage et incubation, les cultures sont recouvertes de 10 ml de milieu LB semi-solide inoculé avec 0,1 ml d'culture fraîche de la souche pathogène.

Les résultats montrent un effet inhibiteur des entérobactéries par les bactéries lactiques par l'apparition de zones d'inhibition autour des touches de bactéries lactiques (figures 10 et 11).



Figure(10) : Inhibition de la souche EL1 par les bactéries lactiques



Figure (11) : Inhibition de la souche Bech II₃ par les bactéries lactiques

Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau (08), les souches CF (T7). PMI(T3), SA(T4), sont fortement sensibles à toutes les bactéries lactiques testées, la souche de lactobacille NCS_{11A} n’a inhibé aucune souche pathogène, la souche de lactobacille NSC₁₀ a montré les plus grandes inhibitions sur les pathogènes, les autres souches de bactéries lactiques provoquent des inhibitions intermédiaires.

TABLEAU (08) : inhibition des entérobactéries par les bactéries lactiques

SOUCHES	MECHC7	NSC11A	MECHC8'	BECHII3	NSC10	CHEVRE10	NSC5A	CHEVRE5A	NSC6	MECHII1	MECHC6
T ₂	15	0	12	26	24	22	15	15	20	18	11
T ₃	25	0	21	24	15	14	16	24	29	25	15
T ₄	21	0	20	25	18	26	20	29	20	25	18
T ₆	20	0	30	0	24	0	15	16	18	0	13
T ₇	26	0	25	35	35	17	26	24	23	0	17
32	13	0	22	26	26	17	22	20	22	18	21
EC	12	0	18	12	26	19	35	30	22	0	24
EL1	21	0	16	27	31	23	16	22	25	20	17

Diamètre d’inhibition mesure en (mm)

Il est communément admis que le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques est très souvent lié à leurs propriétés acidifiantes, phénomène impliqué plus particulièrement dans l’inhibition des flores pathogènes et des germes d’altération (Smith et Palumbo, 1983 ; Schillinger et Lucke, 1990, Byaruhanga et al ., 1999). Ces propriété inhibitrices sont attribuées à la production d’acide organique tel que l’acide lactique, l’effet inhibiteur observé peut être du à n’importe quel facteur

antibactérien produit par les souches étudiées tel que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène ou aux bactériocines.

3.7- croissance des bactéries lactiques en présence de FOS :



Figure(12) : colonies obtenues sur le milieu MRS en présence et en absence des FOS.

Les résultats obtenus sont montrés sur le tableau (09)

Tableau (09) : diamètres des colonies sur le milieu MRS en présence et en absence des FOS.

Souches	NSC10	BECH13	MECH11	1	NSC6	MECHC	6	CHEVRE	5A	CHEVRE	10	MECHC7	NSC11A	NSC5A	MECH	C8'
T	0,6	0,9	0,8	0,8	0,7	0,7	1	0,6	0,8	2	0,5					
MRS																
MRS+	1,1	1	1	1,1	1,2	0,9	1,1	1	1,1	2,4	0,7					
FOS																

La taille des colonies augmentent légèrement en présence de FOS comme le montre le tableau09. Les prébiotiques stimulent la croissance des bifidobactéries et des lactobacilles. Par la consommation des FOS les bactéries probiotiques produisent d'avantage d'acide ce qui induit l'inhibition des pathogènes au niveau intestinal.

Certain nombre des bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser et d'excréter au cours de leur croissance des exo polysaccharides (EPS) qui permette d'améliorer la texture et la viscosité du produit laitier fini tel que le yaourt, la production des EPS peut également être stimulée par les prébiotiques (Dupont, 1998). Les EPS sont impliquées dans la protection de la cellule bactérienne contre les conditions physique, chimiques et biologiques défavorables de leur environnement.

Résultat et discussion

Suite aux différents résultats obtenus nous avons sélectionné les souches chèvre 10 et NSC10 pour être administrées aux rats wistar, cette sélection est attribuée à leur résistance aux conditions hostiles du tube digestif simulées in vitro et à leur capacité d'inhiber les pathogènes.

3-9. Identification des lactobacilles par les galeries Api 50 CHL medium :

Les résultats de la galerie API 50CHL, ont permis l'identification des espèces sélectionnées, les résultats obtenus sont montrés dans les figures ci-dessous.



Figure (13): résultat du test d'identification de la souche CHEVRE₁₀ par la galerie API50 CHL.



Figure(14) : résultat du test d'identification de la souche NSC₁₀ par la galerie API50 CHL.

Cette technique se base sur la capacité des souches à fermenter les sucres, les résultats positifs se traduisent par le changement de couleur de l'indicateur de pH qui est dans ce cas le pourpre de

Résultat et discussion

bromocresol, si la couleur du milieu ne change pas cela traduit une absence de fermentation de ces sucres.

La présence des enzymes contribuant à la fermentation des sucres, traduit l'existence des gènes codant pour ces enzymes, cette méthode nous renseigne de façon indirecte sur la composition du génome de la bactérie testée contribuant à la détermination du genre et de l'espèce de chaque bactérie.

Les résultats obtenus par le logiciel d'identification de la galerie API 50 CHL sont révélés dans les tableaux suivants :

Tableau 10: résultats d'identification de la souche CHEVRE₁₀.

REFERENCE	DATE
chèvre 10	02/06/15
COMMENTAIRE	
Origine lait de chamelle , Saida	
BONNE IDENTIFICATION	
Galerie	API 50 CHL V5.1
Profil	-----+-----+++-----+-----+++++++-----+-----
Note(s)	
Taxons significatif(s)	% ID T Test(s) à l'encontre
Lactobacillus plantarum 1	94.5 0.7 GAL 92% MLZ 92%
Taxon suivant	% ID T Test(s) à l'encontre
Lactococcus lactis ssp lactis 1	3.5 0.6 GAL 90% SOR 5% MEL 13% RAF 9%

Tableau 11: résultats d'identification de la souche NSC₁₀ par le logiciel Apiweb.

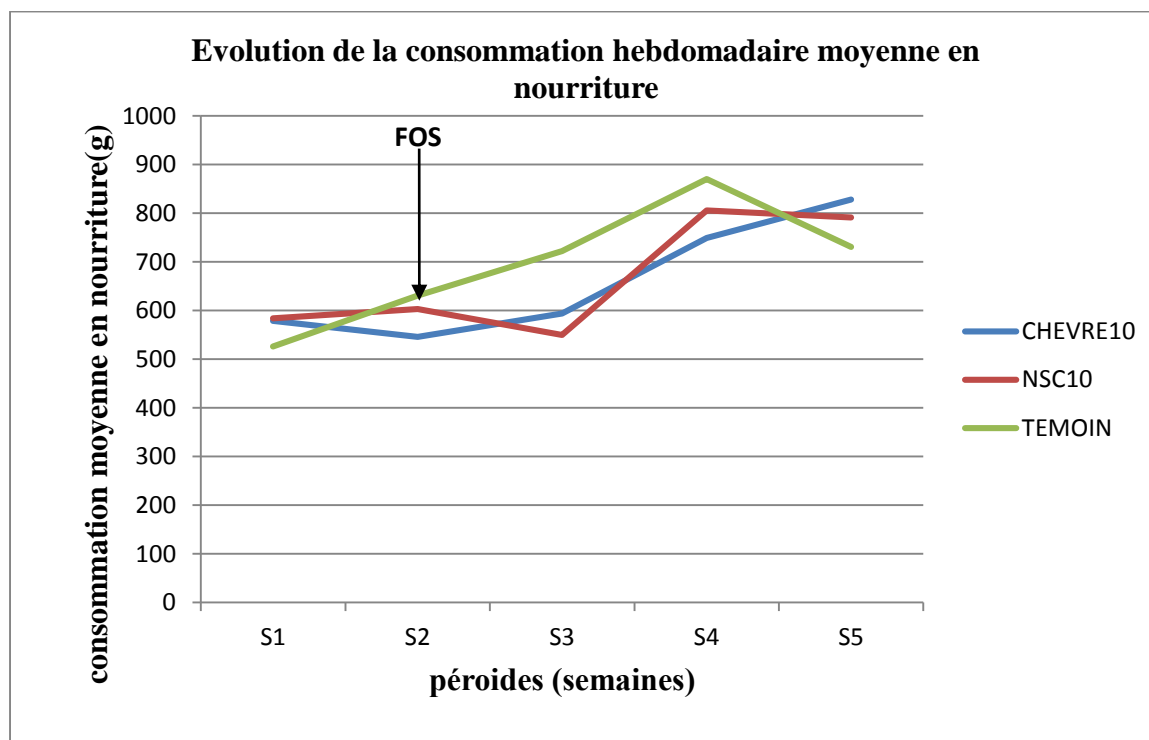
REFERENCE	DATE
NSC10	02/06/15
COMMENTAIRE	
lait de chamelle, Naama	
BONNE IDENTIFICATION	
Galerie	API 50 CHL V5.1
Profil	-----+-----++++-----+-----+++++++-----+-----
Note(s)	
Taxons significatif(s)	% ID T Test(s) à l'encontre
Lactobacillus plantarum 1	91.1 0.8 MLZ 92%
Taxon suivant	% ID T Test(s) à l'encontre
Lactobacillus brevis 1	4.6 0.75 SOR 14% GHT 85%

3.7. Partie *in vivo* :

3-7-1.Paramètre zootechnique :

Ce paramètre étudie : la quantité de nourriture consommée quotidiennement, l'indice de consommation, le gain de poids moyen ainsi que le poids vif moyen. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures : 15-16-17-18.

- **La consommation en nourriture :**



La figure 15 : représente l'évolution de la consommation en nourriture pour les différents lots des rats.

La quantité de nourriture consommée est proportionnelle à la croissance des rats pour l'ensemble des lots, néanmoins le lot témoin consomme d'avantage par rapport aux autres lots au cours de toute la période expérimentale, on observe également qu'à partir de la semaine 2 ce qui correspond au début de l'administration des prébiotiques (FOS) la consommation des 2 lots recevant le traitement a chuté pendant plus d'une semaine, ce qui correspond à leur période d'adaptation à leur nouveau complément alimentaire.

Cette période passée, leur consommation augmente progressivement jusqu'à la fin de l'expérience.

- **L'indice de consommation :**

L'indice de consommation (IC) est le ratio qui mesure la conversion de la quantité d'aliment consommée par rapport au gain de poids moyen, il donne des indications sur la rentabilité d'un élevage animalier par rapport à sa consommation il est inversement proportionnel à la rentabilité. Ce paramètre est très important dans les élevages agricoles.

Les résultats obtenus sont montrés dans la figure 16

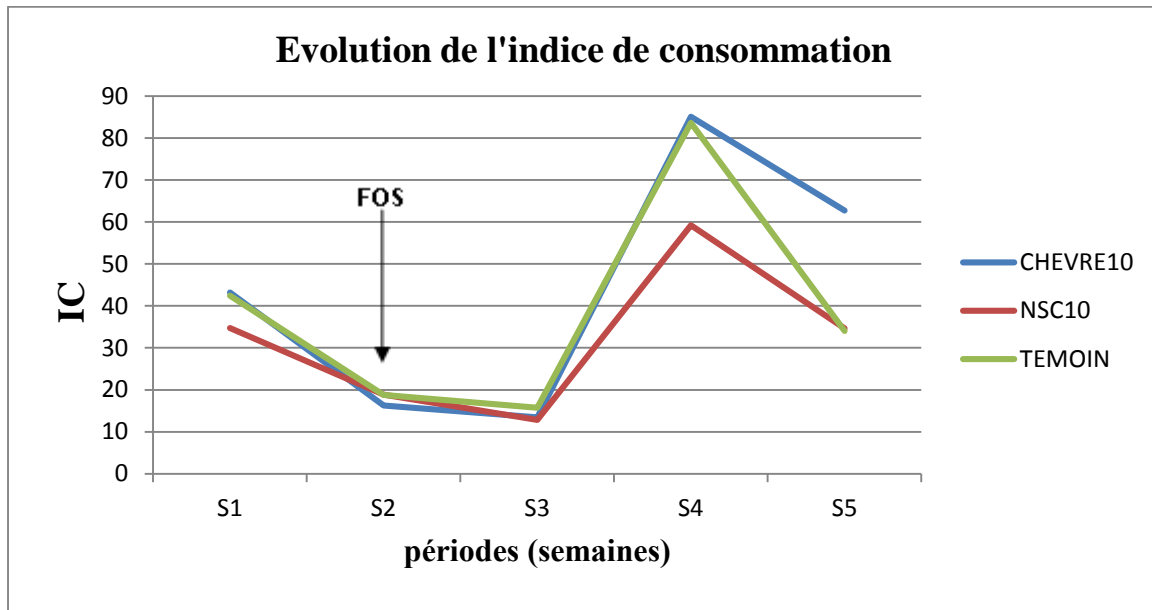


Figure16 : Evolution de l'indice de consommation

Au cours des 5 semaines expérimentales les 3 courbes sont en concomitance, l'évolution des IC est relativement similaire toutefois à partir de la 3^{ème} semaine on observe un indice de consommation plus faible pour les rats recevant la souche NCS10 comme supplément alimentaire, ce qui indique que pour une même quantité d'aliment consommée, les rats du lot NSC10 prennent d'avantage de poids que les 2 autres groupes.

A la 3^{ème} semaine on remarque une diminution de l'indice de consommation avec une prise de poids chez les trois lots, ce qu'indique une adaptation à leur nouveau régime et l'assimilation des prébiotiques, ces derniers sont consommés spécifiquement par les bactéries probiotiques améliorant ainsi leur action, cela est traduit par un IC légèrement inférieur chez les 2 lots additionnés de bactéries lactiques.

A la 4^{ème} semaine on note une augmentation dans l'indice de consommation avec une pertes de poids, à cette période la température a fortement chuté par rapport aux semaines

précédentes ce qui pousse les animaux à orienter l'énergie provenant de la consommation de leur nourriture pour le maintien d'une température corporelle stable au lieu d'être utilisée pour leur croissance, dans ces conditions on observe l'apparition d'un pic important de l'indice de consommation pour les 3 lots.

Au bout de 5^{ème} semaine on note une diminution de l'indice de consommation chez les 3 lots indiquant l'amélioration de leurs conditions expérimentales notamment l'augmentation de la température ambiante, l'énergie consommée est plutôt utilisée pour la croissance des animaux et non au maintien de leur température corporelle, cependant les animaux recevant la souche NSC10 présente l'IC le plus faible sur presque la totalité de la période de l'étude *in vivo*.

En 2012, une méta-analyse réalisée par le biologiste Didier Raoult montre que l'utilisation des probiotiques ont un effet sur l'amélioration de la croissance des animaux d'élevage, les mêmes résultats ont été remarqués par Amara en 2012 et Idoui en 2008 concernant l'efficacité de la consommation des probiotiques et prébiotiques sur la réduction de l'IC des poules de chair.

D'autres études ont également démontré que certaines souches de lactobacilles ont des effets anti-obésité.

En fin, il apparaît clairement que l'utilisation des probiotiques n'affecte pas la mortalité au cours de l'élevage.

- **Le Gain de poids moyen :**

C'est le gain de poids au cours d'une semaine par tous les individus d'un même lot / le nombre d'individus du lot.

Le gain de poids moyen est inversement proportionnel à l'indice de consommation.

Les résultats observés montrés dans la figure 17

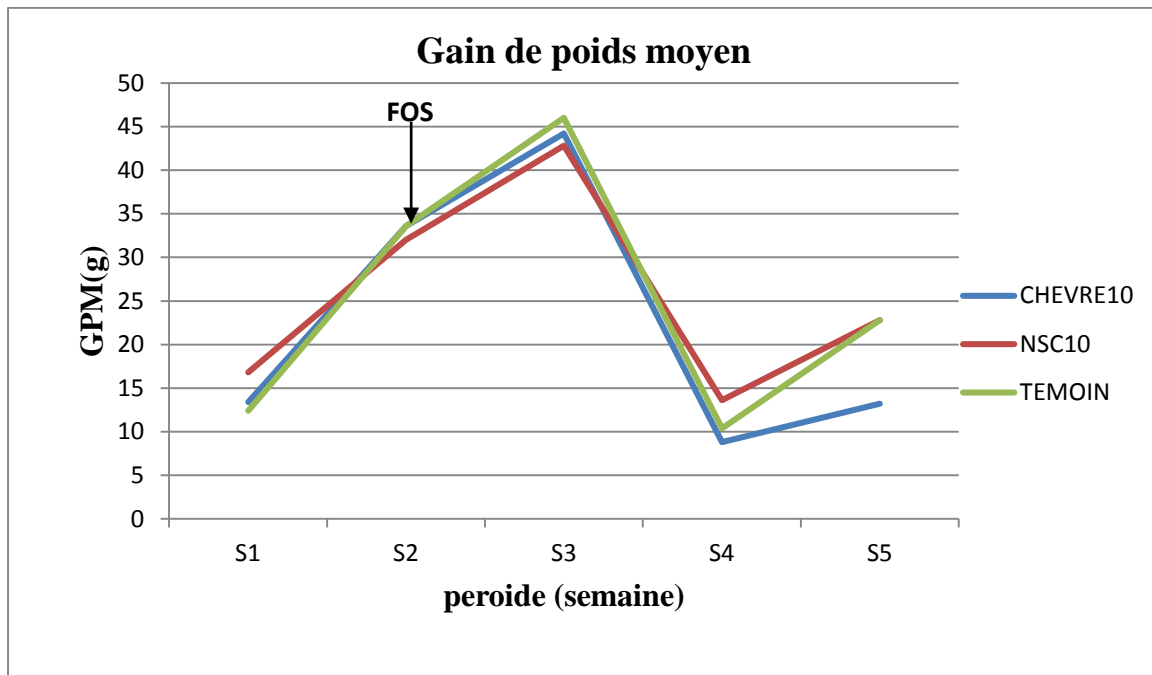


Figure17 : Evolution du gain de poids moyen au cours des semaines.

Au cours des deux premières semaines d'élevage on observe une augmentation du poids de l'ensemble des rats, avec un GPM légèrement supérieur chez le lot NSC10.

A la 3^{ème} semaine tous les animaux des 3 lots ont un GPM plus important, ce qui correspond à la croissance de tous les individus.

A la 4^{ème} semaine on remarque un gain de poids faible pour les 3 lots, avec un GPM inférieur d'environ 30g pour l'ensemble des rats par rapport aux semaines précédentes. Ceci est relié à la chute de température notée au cours de cet intervalle, cette énergie perdue a été utilisée pour le maintien de leur température corporelle.

A la 5^{ème} semaine on note une augmentation du GPM pour les 3 lots indiquant une bonne valorisation des aliments ingérés par les rats.

- Le poids vif moyen :

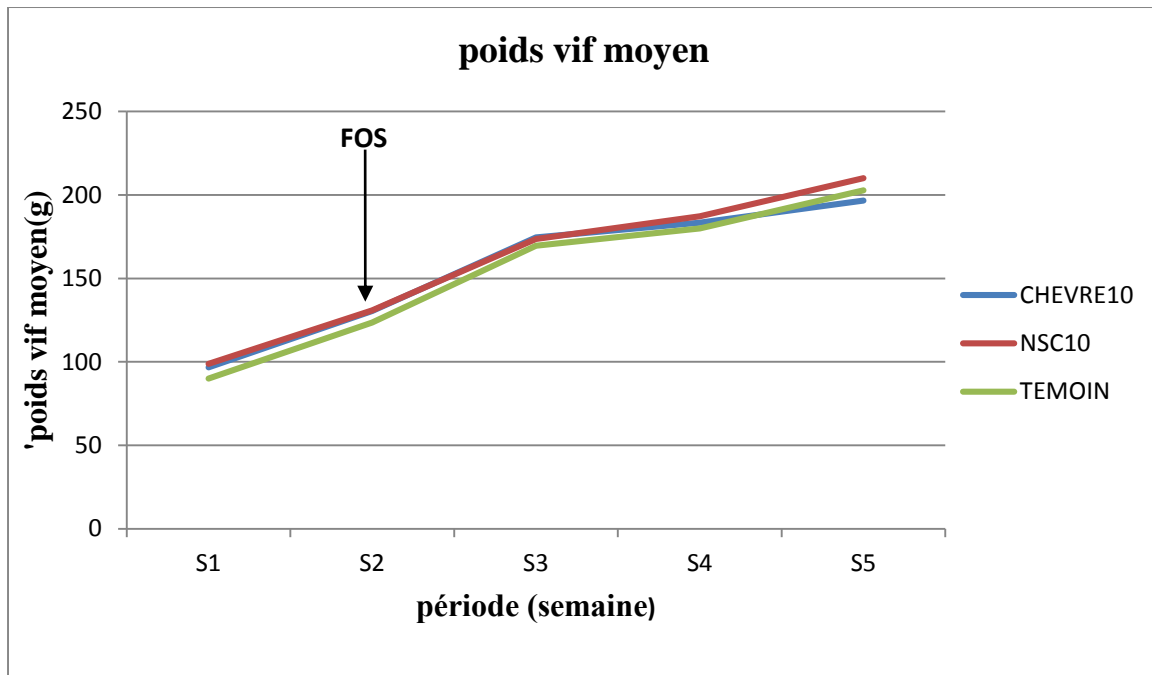


Figure 18 : représente l'évolution du poids vif moyen des rats au cours des semaines d'élevage.

On observe une augmentation du poids vif moyen (PVM) à partir du premier jour d'expérience et jusqu'à la fin. Au début de l'étude les animaux étaient jeunes, récemment sevrés ils ont du s'adapter à leur nouvelle alimentation et le gain de poids noté est corrélé à la croissance de l'ensemble des individus tout au long de la période expérimentale.

Le poids vif moyen des individus des 2 lots : CHEVRE₁₀, NSC₁₀ est quasiment identique, le lot témoin présente un PVF légèrement inférieur aux autres jusqu'à la fin de l'expérience, ce qui pourrait indiquer que la prise de probiotiques favorise l'assimilation des aliments et la rentabilité des élevages notamment les élevages agricoles (Idoui, 2008).

3-8-2. paramètre microbiologiques :

Ce paramètre permet de faire une estimation des différentes flores qui persistent dans les selles des rats, ce qui nous renseigne sur les microorganismes résistant au passage intestinal.

La flore fécale se composé de différents genres microbiens que nous avons recherchés sur 6 milieux (figure 19)

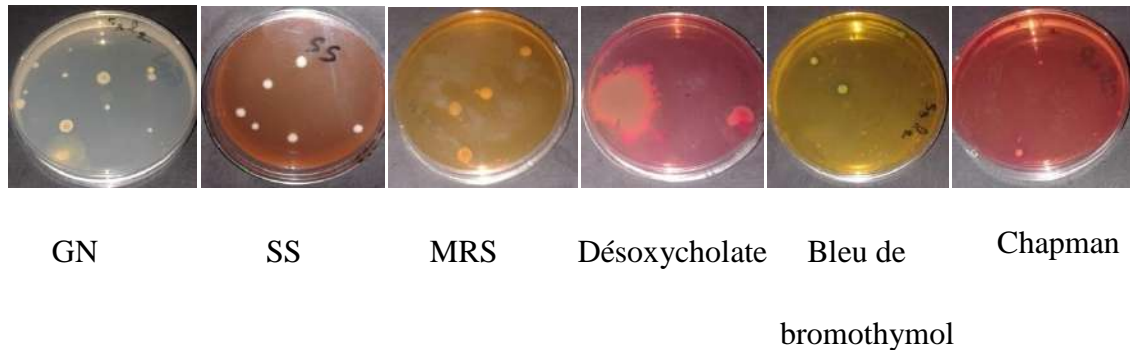


Figure 19: milieux de cultures utilisés pour le dénombrement des flores fécales

1. La flore mésophile totale :

Cette flore a été dénombrée sur gélose nutritive, la figure20, nous permet de constater une augmentation graduelle de la flore totale pour l'ensemble des lots pendant toute la période expérimentale, ce qui est expliqué par la colonisation progressive du tube digestive des rats. Cette augmentation régulière de la flore totale est influencée par l'âge de l'hôte et cela pour l'ensemble des populations bactériennes qui s'y implantent. Les populations bactériennes à l'intérieur du tractus gastrointestinal coexistent en ayant chacune leur niche écologique nécessaire à leur croissance (Fooks et Gibson, 2002). Cependant, pour fonctionner de façon optimale, la balance du microbiote bactérien doit être maintenue de façon équilibrée mais de nombreux facteurs peuvent l'affecter. Le concept des espèces bénéfiques existe depuis longtemps (Liévin et al., 2000). Selon ce concept, certaines bactéries formant le microbiote intestinal seraient associées à des effets positifs sur la santé, alors que d'autres sont considérées comme néfastes. Les bactéries potentiellement favorables pour la santé incluent principalement les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* et leur dominance chez les nouveaux-nés nourris au sein leur procureraient une protection contre les infections intestinales (Picard et al., 2005).

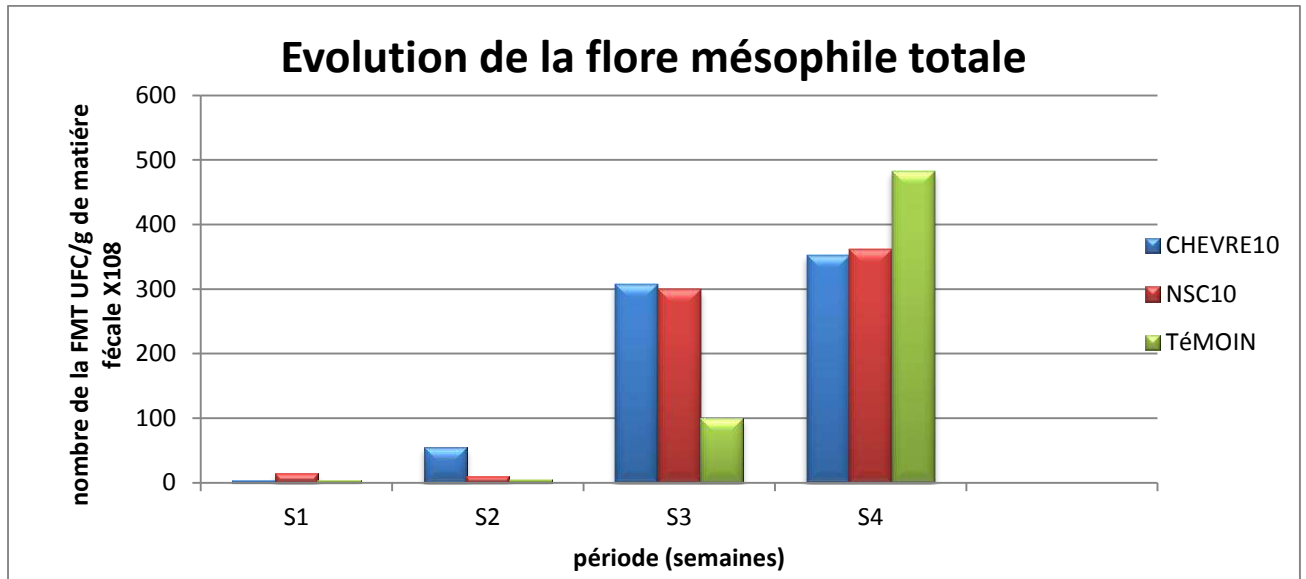


Figure20 : évolution de la flore mésophile totale.

2. **Les entérobactéries** : ont été dénombrées sur la gélose au bleu de bromothymol lactosée et sur la gélose désoxycholate, Ces principaux entéropathogènes sont capables d’envahir le tractus intestinal pour s’y multiplier et causer principalement des symptômes diarrhéiques mais également dans certains cas des nausées, des vomissements et une altération générale de l’état de santé (Steer et al., 2000).

Les coliformes colonisent rapidement l’intestin pour l’ensemble des lots, néanmoins les selles des lots consommant le lait fermenté par les probiotiques et additionné de FOS montrent à la 4^{ème} semaine une charge nettement moins importante en entérobactéries que les témoins (figure21), la flore lactiques s’installe progressivement dans le tube digestifs inhibant la colonisation massive des intestins par les entérobactéries, ce qui indique que les probiotiques ont activité régulatrice du nombre des entérobactéries intestinales, cette inhibition est plus marquée chez les lots recevant la souche NSC 10 *Lactobacillus plantarum*.

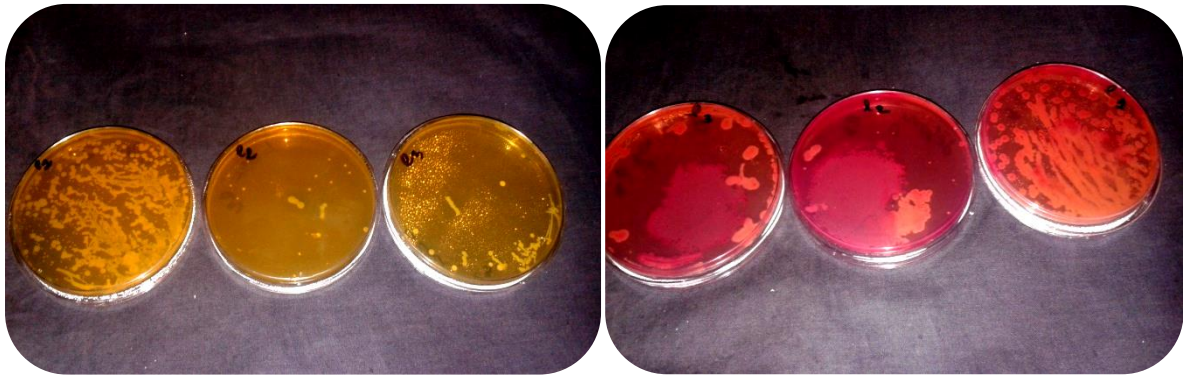


Figure (21) : la charge en entérobactéries à la semaine 4.

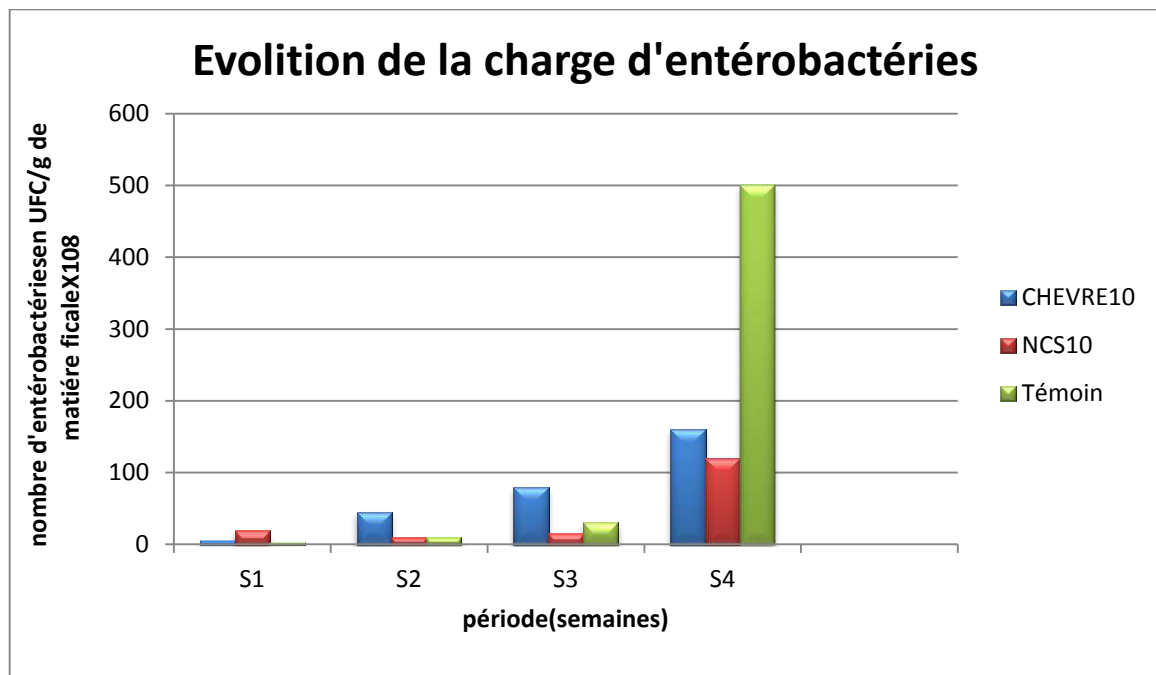
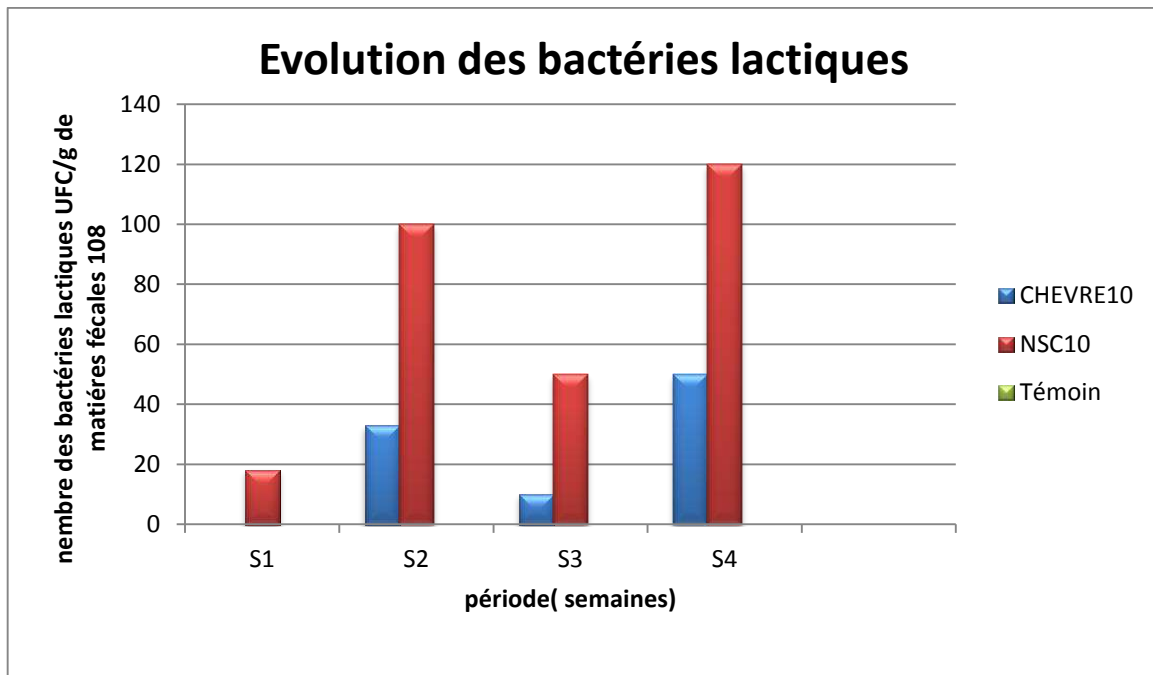


Figure (22) : évolution de la charge d'entérobactéries fécales.

3. **La flore lactique** : dénombrée sur gélose MRS, on remarque une augmentation de la charge à partir des premiers jours d'expérience, les résultats obtenus sont montrés dans la figure23.



Figure(23) : évolution des bactéries lactiques.

On observe à la première semaine qu'il y a une faible charge en bactéries lactiques dans la matière fécale des rats mis à part chez le lot NSC10 où on observe une faible concentration de bactéries lactiques ce qui traduit une faible implantation des souches au niveau du tube digestif. Mais à partir de 2^{ème} semaine il y a une croissance des bactéries lactiques dans le tube digestif pour les 2 lots CHEVRE₁₀ et NSC₁₀ grâce à l'apport quotidien de lait fermenté, le lait enrichi de probiotiques augmente la charge des bactéries lactiques, leur nombre est inversement proportionnelle au nombre d'entérobactéries, la quantité des bactéries lactiques amplifie après l'apport des FOS ce qui indique une meilleure implantation de ces bactéries par l'addition des prébiotiques à partir de la 2^{ème} semaine. Ce qui concorde avec les résultats de S. Addou (2015) qui indiquent qu'il y a une augmentation de la croissance bactérienne dans les fèces et le chyme intestinal chez les rats supplémentés en prébiotique par rapport à ceux qui ne le sont pas. Selon leurs résultats le FOS stimule la prolifération des bactéries lactiques, dans l'intestin qui le fermentent le réduisent à des acides gras à chaîne courte, forment ainsi acétate, butyrate, lactate et propionate.

La colonisation des intestins par la souche NSC 10 est supérieure par rapport au lot recevant la souche chèvre 10, les selles des témoins sont nettement moins chargées de bactéries lactiques que les 2 autres lots, car ils ne reçoivent aucun supplément dans leur alimentation.

Résultat et discussion

A la 3^{ème} semaine on observe une légère diminution du nombre des bactéries lactiques due à l'apparition de troubles gastriques pour les 2 lots (NSC₁₀ et CHEVRE₁₀).

A la fin de la période expérimentale. La flore lactique persiste du fait de sa tolérance à une forte acidité et à son aptitude à inhiber ou de modérer la croissance de bactéries pathogènes, de ce fait elle est retrouvée en grand nombre dans la matière fécale des animaux supplémentés en bactéries probiotiques.

La flore pathogène : a été suivie par dénombrement dans les selles des rats des différents lots. Les salmonelles et shigelles sur le milieu SS et Les staphylocoques sur le milieu Chapman.

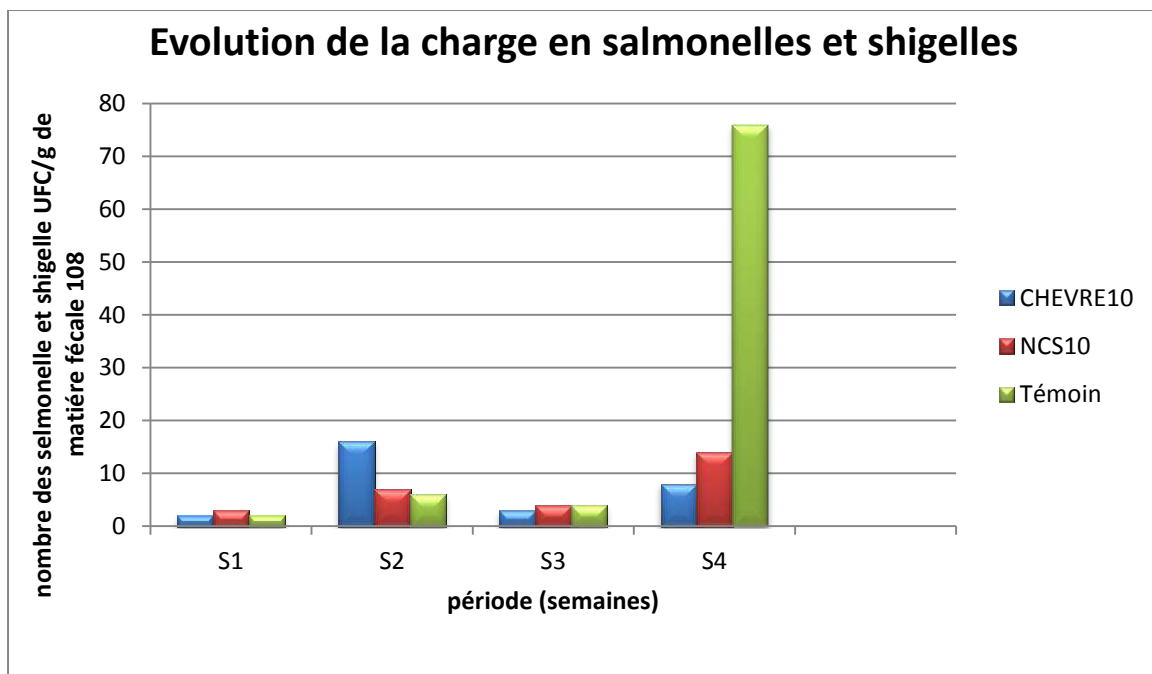


Figure (24) : évolution de la charge en salmonelle et shigelle.

On remarque une augmentation modérée du nombre de salmonelles et shigelles depuis le début et jusqu'à la 3^{ème} semaine toutefois cette charge est plus importante à la 4^{ème} semaine chez le lot témoin par rapport aux 2 autres.

La réduction de la charge en microorganismes néfastes chez les rats consommant des bactéries lactiques confirme l'effet probiotique bénéfique.

Salmonelle et shigelle sont tout à fait capables de survivre à l'acidité de l'estomac et peuvent donc passer dans l'intestin (Kwon and Ricke, 1998).

L'addition des prébiotiques dans le régime des lots CHEVRE10 et NSC10 entraîne l'inhibition de ces germes pathogènes ceci est favorisé par l'abaissement du pH au niveau du tube digestive, et précisément au niveau du colon qui est le lieu de fermentation des FOS par les bactéries lactiques qui colonisent le colon.

Evolution de la charge de staphylocoque : les résultats obtenus sont présentés dans la figure(25)

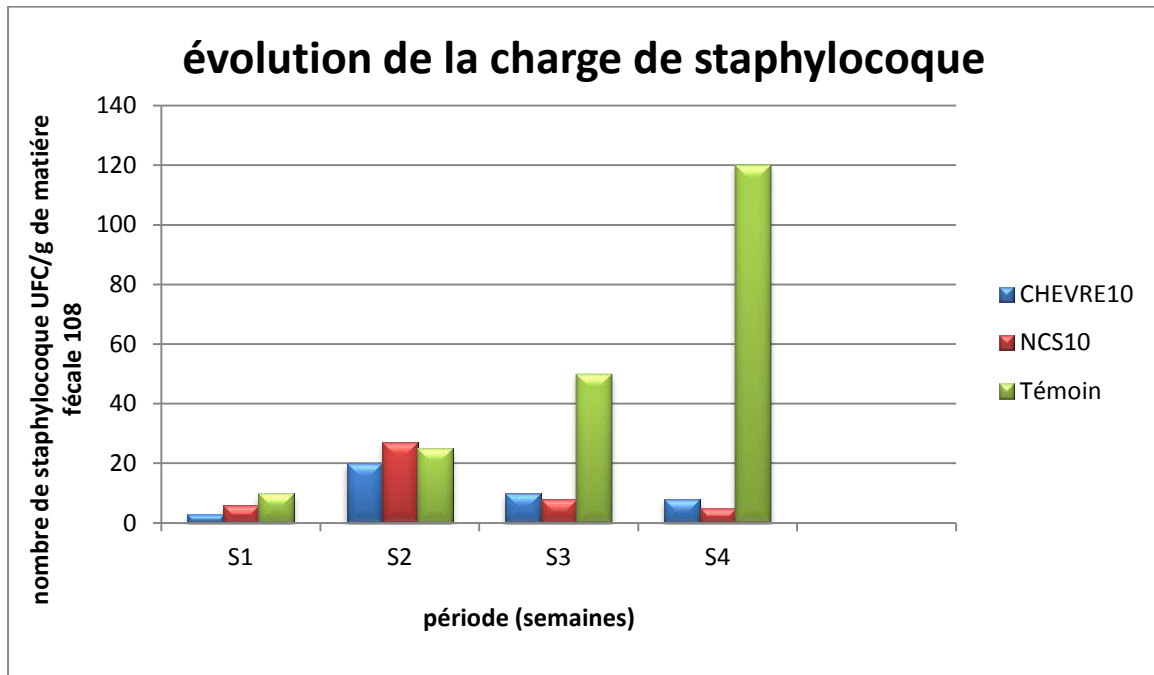


Figure (25) : évolution de la charge de staphylocoque.

On note que la charge de *Staphylococcus aureus* diminue chez les 2 lots (CHEVRE10 et NSC10) et augmenté chez les témoins ce résultat est du à l'apport des probiotiques qui exercent un effet de barrière contre des bactéries pathogènes dans le tube digestif tels que les staphylocoques, ces les effets ont été favorisés par la présence des prébiotiques.

L'équilibre entre les bactéries probiotiques et les pathogènes dans le tube digestif n'est pas du seulement à la production de substances inhibitrices par les probiotiques, le phénomène de compétition d'adhésion sur la muqueuse intestinale est également pris en compte, Les deux premiers mécanismes possibles pour l'action des probiotiques concernent leur capacité à adhérer à la muqueuse intestinale. Étant donné que la majorité des infections intestinales sont initiées par l'adhésion des pathogènes aux cellules entérocytaires de l'hôte certaines bifidobactéries et lactobacilles probiotiques auraient la capacité de bloquer physiquement l'accès aux entérocytes (Gill, 2003; Servin et Coconnier, 2003; Servin, 2004; Picard et al.,

2005). Ce mécanisme d'action serait similaire à celui exercé par le microbiote intestinal résident face aux infections microbiennes (Liévin-Le Moal et Servin, 2006).

L'adhésion permet d'accroître le temps de rétention des probiotiques dans l'intestin et met en contact étroit les bactéries et les cellules épithéliales (Gueimonde et Salminen, 2006). Ainsi, un probiotique ayant un fort pourcentage d'adhésion pourra éventuellement stimuler le système immunitaire et prévenir l'implantation de pathogènes sur les cellules épithéliales de l'intestin par des mécanismes de compétition (Saarela et al., 2000)

Les mécanismes de compétition de l'adhésion se font généralement de deux façons. Ils peuvent survenir de façon spécifique par l'intermédiaire des adhésines ou de façon non spécifique en impliquant des interactions électrostatiques ou hydrophobes, des forces passives et stériques (Servin et Coconnier, 2003).

Résultats après la dissection des rats

Après dissection des rats, le dénombrement des microorganismes présents au niveau des différents segments gastriques montrent les résultats Ci-dessous :

Tableau 12: nombre des différents microorganismes dans le tube digestif des animaux témoins

Témoin	La flore lactique	La flore totale	La flore pathogène	Entérobactéries
Estomac	0	400	100	4
L'intestin	0	23	25	20
Colon	2	10	28	45

On note en premier lieu que chez ce lot le nombre de bactéries lactiques est très faible à tous les niveaux du tube digestif spécifiquement dans l'intestin et l'estomac, contrairement à la flore totale et pathogène qui sont fortement répandues dans l'estomac et de façon moindre dans les deux autres segments, l'inverse est remarqué pour les entérobactéries qui sont

Résultat et discussion

majoritairement présentes dans le colon là où le pH est le moins acide et le taux d'oxygène y est plus faible, ce qui correspond d'avantage à leurs conditions idéales de croissance.

Tableau13 : nombre des différents microorganismes dans le tube digestif des animaux du lot NSC₁₀

NSC ₁₀	La flore lactique	La flore totale	La flore pathogène	Les entérobactéries
Estomac	50	100	2	3
L'intestin	9	4	2	0
Colon	20	3	11	15

On observe que le nombre des bactéries lactique est très grand dans le contenu stomacal du lot NSC10, cette charge est due à la consommation de probiotique+prébiotique quelques heures avant le sacrifice. Le colon est également colonisé par un grand nombre de bactéries lactiques suite à leur implantation à ce niveau après plusieurs semaine de régime probiotique, On remarque également une faible charge en bactéries pathogènes et en entérobactéries dans l'estomac et l'intestin contrairement au colon là où les entérobactéries sont le plus présentes.

Tableau : 14 nombre des différents microorganismes dans le tube digestif des animaux du lot chèvre 10.

CHEVRE ₁₀	La flore lactique	La flore totale	La flore pathogène	Les entérobactéries
Estomac	120	250	10	6
L'intestin	100	40	4	14
Colon	46	100	2	4

Résultat et discussion

On observe que pour ce lot le nombre des bactéries lactiques est plus important dans l'estomac et l'intestin que dans le colon, de même que la flore totale. Le nombre de bactéries pathogènes et des entérobactéries est inférieur par rapport au lot témoin cela est dû au pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques présents en grand nombre à tous les niveaux du tube digestif et au prébiotiques qui favorisent leur impact.

-La flore microbienne de l'estomac est très pauvre et renferme quelques bactéries capables de résister aux conditions difficiles du milieu (pH 1 à 2), sauf que dans ce cas les bactéries ce sont nourris peut de temps avant le sacrifice, les animaux commençaient à peine leur digestion, donc le pH de l'estomac était probablement moins acide.

-La flore microbienne de l'intestin grêle augmente progressivement par l'implantation des streptocoques, lactobacilles et entérobactéries, Le fait que la population microbienne reste faible est important à retenir pour expliquer les effets des bactéries ingérées avec l'alimentation.

-La flore du colon est très abondante. Elle est majoritairement constituée par des bactéries anaérobies strictes, qui représentent la population dominante, responsable de nombreuses activités physiologiques et/ou toxiques pour l'hôte.

L'inhibition des bactéries indésirables ou pathogènes par les probiotiques peut se faire de différentes façons. La production d'acides organiques (acide lactique ou acide acétique) à partir de glucides ingérés lors de la prise alimentaire ces acides abaissent le pH, en freinant le développement des *Salmonella* ce phénomène a également été décrit par Prioult en 2003 et Kralik et al en 2004. La diminution de la charge des bactéries coliformes dans les parties supérieures du tube digestif serait due au pH très bas, obtenu grâce à l'apport de lait acidifié par les bactéries lactiques. En milieu humide, les lactobactéries, produisent du peroxyde d'hydrogène inhibiteur de nombreuses souches bactériennes pathogènes (Gibson et Roberfroi, 1995; Piva, 1999; Schrezenmeir et De Vreseal, 2001; Rastall et Gibson, 2004 ; Cummings et Kong, 2004. Les bactéries lactiques produisent également des bactériocines qui sont des polypeptides inhibant les microorganismes notamment les pathogènes (Klaenhammer et al., 2005), ces bactériocines sont également utilisées dans la conservation des produits alimentaires. La production de substances inhibitrices peut bloquer le développement de certaines espèces pathogènes, certaines bactéries comme *Staphylococcus aureus* et *Salmonella*, De plus, l'acidification favoriserait la régulation du transit intestinal.

3-8-3. paramètre de carcasse :

Nous avons voulu observer l’effet des régimes avec additifs sur les paramètres de carcasse des rats, les sacrifices étaient faits à la fin de la 5^{ème} semaine de l’étude. Après sacrifice des rats, le poids de quelques organes internes a été pesé.

Le nombre d’individu de départ dans chaque lot était de 5 rats, 2 animaux de chaque lot ont été sacrifiés au hasard.

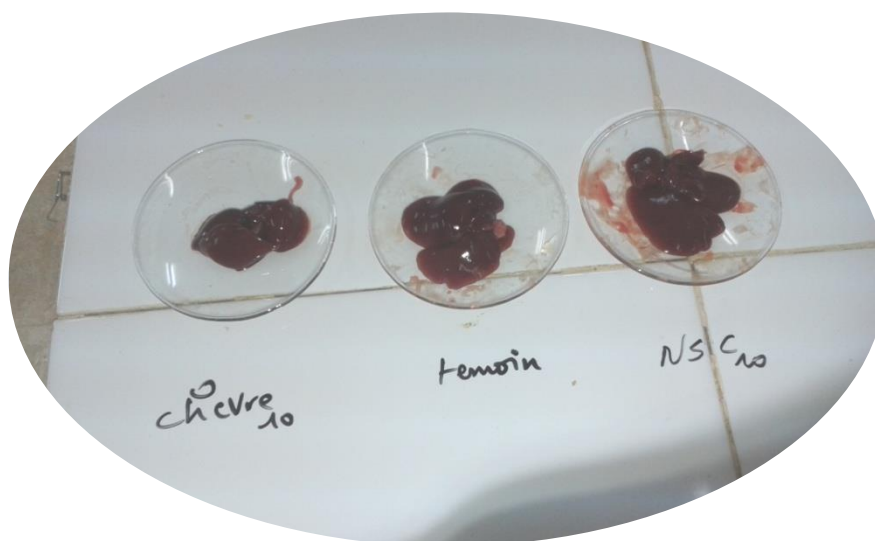
Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau 15

Tableau (15): poids des différents organes.

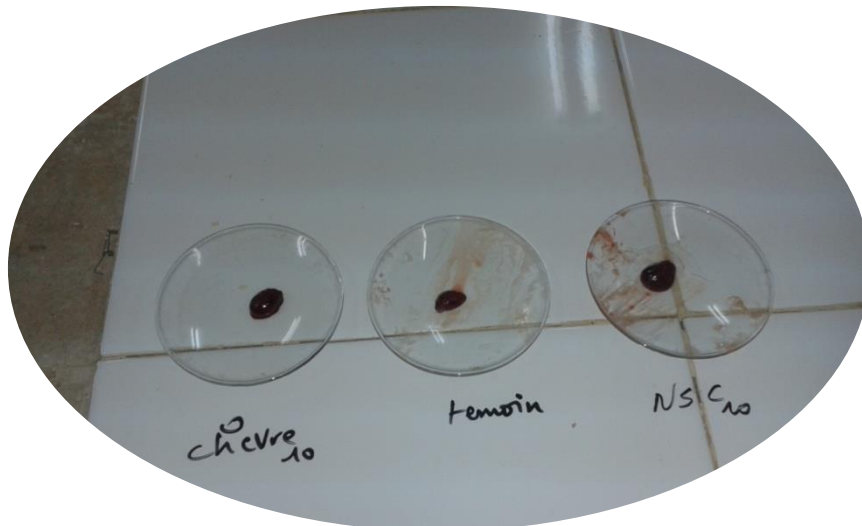
organe	lots	CHEVRE ₁₀	NSC ₁₀	Témoin
Cœur		0,778 g	0,90g	0,722g
Foie		8,26g	8,40g	8,84g
Tube digestif		21,38g	24,29g	20,87g

Aucune anomalie n’a été observée sur les organes des différents lots.

On observe néanmoins que le poids de certains organes du lot NSC10 est légèrement plus élevé par rapport aux autres lots, cela peut être lié au poids de départ de ces 2 animaux qui est plus important que celui des autres individus.



Figure(26) : représentant le foie des animaux après dissection



Figure(27) : représentant le cœur des animaux après dissection

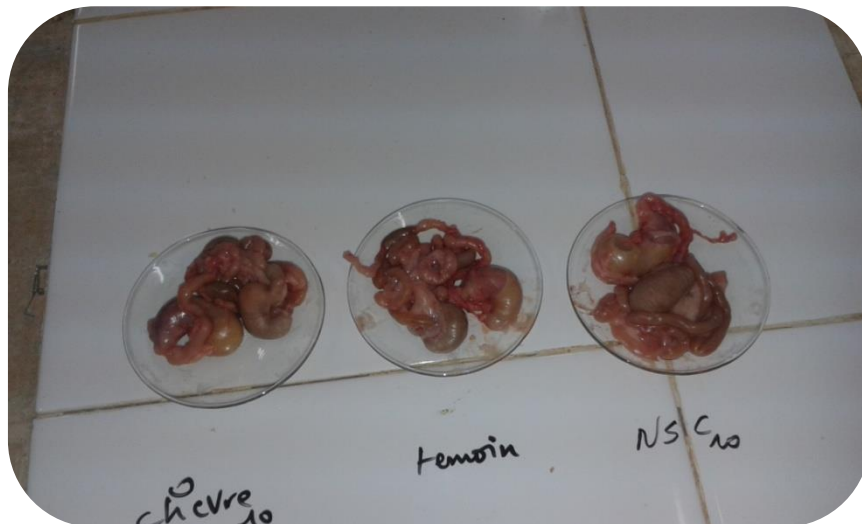


Figure (28): représentant le tube digestif des animaux après dissection

Le poids du foie est supérieur chez les témoins indiquant que le poids des organes est indépendant de la consommation des probiotiques.

On remarque que le poids du tube digestif est plus élevé chez les individus des lots NSC10 et CHEVRE10 par rapport au lot témoin, ces différences sont dues à l'implantation d'un grand nombre de bactéries lactiques dans le tube digestif des animaux supplémenté de pro et prébiotiques, de ce fait cet organe est tapissé par ces dernières augmentant ainsi son poids.

Chapitre04 : Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis longtemps de façon consciente ou non pour leur activité technologique. Elles ne se réduisent pas à leur importance économique, mais jouent un rôle important dans l'entretien et l'amélioration de la santé animale et humaine.

L'utilisation abusive d'antibiotiques chez les animaux et l'homme a conduit à l'apparition de bactéries pathogènes multi-résistantes, c'est pourquoi les recherches ont conduit à trouver de bonnes alternatives aux antibiotiques qui sont les probiotiques.

L'objectif de cette étude nous a permis de choisir 11 souches des bactéries lactiques : NSC₁₀-CHEVRE₁₀- CHEVRE_{5A}- BECH_{II3}- NSC_{5A}- NSC₆- NSC_{11A}- MECHC₇- MECH_{III}- MECHC₆- MECHC₈*, nous avons sélectionné les souches à potentiel probiotique par des tests tels que la survie aux conditions hostiles rencontrées le long du tractus digestif, le pouvoir antagoniste contre quelques bactéries pathogènes et la résistance aux antibiotiques, parmi les souches étudiées, seules 02 souches NSC 10 et chèvre 10 ont répondu favorablement à l'ensemble des critères de sélection.

Ces deux souches ont démontré leurs capacités à être des probiotiques : du fait de leur résistance au stress acide, leur sensibilité à la plus part des antibiotiques : Netilmice, Tétracycline, Clavulanique, Clindamycine, leur résistance à une concentration de 10% en sels biliaires et à leur large spectre d'action contre les bactéries pathogènes notamment *Staphylococcus aureus* et *Salmonella*.

L'addition de FOS, comme substance prébiotique dans le milieu de culture de ces bactéries permet d'améliorer la croissance de toutes les souches lactiques.

L'effet probiotique des souches CHEVRE₁₀ et NSC₁₀ a été confirmé pour la réalisation des tests *in vivo* sur les rats, ces deux souches ont montré des effets bénéfiques sur la santé du rat, leur implantation dans l'intestin, l'estomac et le colon, entraîne une diminution de la flore pathogène et contribue à équilibrer le microbiote intestinal, cet équilibre peut améliorer les défenses immunitaires des individus consommant ces microorganismes et réduisent les risques d'infections.

Les résultats d'identification montrent que la souche CHEVRE₁₀ et la souche NSC₁₀ ont été identifiées à plus de 90% comme appartenant à l'espèce *Lactobacillus plantarum*.

Conclusion et perspectives

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen pour véhiculer des principes actifs qu'ils contiennent (enzyme, composant de paroi, substance antibactériennes) jusqu'à leurs cibles d'action dans le tractus digestif.

Les perspectives qui peuvent être envisagées à l'issue de cette étude sont :

- La prolongation de la période d'expérimentation au-delà de 4 semaines pour voir l'effet des probiotiques à long terme.
- L'augmentation de l'effectif des animaux pour renforcer statistiquement les résultats obtenus.
- Etudier de façon approfondi l'implantation des probiotiques au niveau cellulaire tout au long du tractus gastro-intestinal.
- Confirmer les résultats obtenus par une application de ces microorganismes sur des sujets humains.
- Enfin envisager une approche industrielle pour une commercialisation des produits du terroir algérien fermentés par nos souches probiotiques autochtones.

Annexes

Annexes 1 : composition des Milieux d'isolement des entérobactéries**MRS (Gélose de Man, Rogosa, Sharpe) :**

Pour un litre de milieu

-peptone	10,0 g
-extrait de viande	8,0
-extrait de levure	4,0 g
-Glucose.....	20,0 g
-Acétate de sodium trihydraté.....	5,0 g
-Citrate d'ammonium.....	2,0 g
-Tween 80	1,0 ml
-hydrogénophosphate de potassium	2,0 g
-sulfate de magnésium heptahydraté.....	0,2 g
-sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05 g
-Agar	10,0 g
-pH = 6,2	

Milieu LB :

Pour un litre de milieu :

-Tryptone.....	10g
-d'extrait de levures.....	5g
-NaCl.....	10g

Verser le tout dans ~800 ml d'eau distillée ou déminéralisée

Ajouter de manière précise avec une éprouvette graduée de l'eau distillé pour atteindre un total de 1 litre.

Autoclave à 121°C / 15 min.

Après refroidissement, agiter le flacon pour s'assurer du mélange et le milieu LB est prêt à l'emploi.

Milieu GN :

-extrait de viande	1,0g/L
-extrait de levure	2,5g/L
-peptone	5,0g/L
-chlorure de sodium	5,0g/L
-Agar	15,0g/L
-pH = 7,0	

MILIEU SS :

Pour un litre de milieu :

-bio-polytone.....	5g
-extrait de viande de bœuf.....	5g
-lactose	10g
-citrate de sodium	08, 5g
-thiosulfate de sodium	8, 5g
-citrate ferrique.....	1g
-sels biliaires	8,5g
-vert brillant	0,33mg
-rouge neutre	0,0 25mg
-Agar	13,5g

-PH=7

Milieu désoxycholate :

-peptone	10,0 g
-citrate de sodium.....	1,0 g
-lactose	10,0 g
-Désoxycholate de sodium	0,5g
-chlorure de sodium	5,0 g
-rouge neutre.....	0,03 g
-Agar- Agar	15,0 g

-pH = 7,3

Milieu bleu de bromothymol lactose -agar:

-peptone	15g
-extrait de viande.....	3g
-extrait de levure.....	3g
-désoxycholate de sodium.....	1g
-thiosulfate de sodium.....	1g
-lactose.....	15g
-cristal violet	0,005 g
-bleu de bromothymol.....	0,8 g
-gélose.....	11,0 g

milieu chapman :

pour un litre de milieu :

-Peptone	10,0 g
-Extrait de viande de bœuf	1,0 g
-Chlorure de sodium.....	75,0 g
-Mannitol	10,0 g
-Rouge de phénol.....	0,025 g
-Agar- Agar	15,0 g
-Eau distillée	
- $pH = 7,4$	

Annexes 02 : identification des Lactobacilles**PRINCIPE :**

Le milieu "API 50 CHL Medium" permet l'étude de la fermentation des 49 sucres de la galerie API 50 CH. Le microorganisme à tester est mis en suspension dans le milieu "API 50 CHL Medium" puis inoculé dans chaque tube de la galerie. Pendant l'incubation, le catabolisme des glucides produit des acides organiques qui provoquent le virage de l'indicateur de pH. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique permettant l'identification du microorganisme à l'aide du logiciel d'identification.

REACTIFS :

- Galerie API 50 CH.
- Ampoule API 50 CHL Medium.

COMPOSITION DU MILIEU :

API 50 CHL Medium 10ml	Polypeptone	10g
	Extrait de levure	5g
	Tween80	1ml
	Phosphate dipotassique	2g
	Acétate de sodium	5g
	Citrate diammonique	2g
	Sulfate de magnésium	0,20g
	Sulfate de manganèse	0,05g
	Bromocrésol pourpre	0,17g
	Eau déminéralisée	1000ml
	PH : 6,7- 7,1	

MODE OPERATOIRE

- Sélection des colonies.
- Vérifier la pureté de la souche.
- Cultiver la souche sur milieu MRS gélosé 24 H à 30°C ou 37°C en anaérobiose.
- Vérifier son appartenance aux bactéries lactiques : bacilles Gram +, catalase -, non sporulés, anaérobies (stricts ou facultatifs), cultivant sur milieu MRS.

LECTURE ET INTERPRETATION

Lecture de la galerie :

On recherche dans chaque tube l'acidification produite qui se traduit par un virage au jaune du pourpre de bromocrésol contenu dans le milieu. Pour le test esculine (tube N°25), on observe un changement de couleur du pourpre au noir. Une feuille de résultats des tests est fournie.

Genre	Espèce	Dénomination(s)	Numéro de publication de Demandes de Brevet
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533= La1 = CNCM I-1225	EP0577903
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	WO2004032639
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431 = ATCC 55544	
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	US4839281
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97/09514	WO9910476
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917= DSMZ 20174=WCFS1	
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	WO9391823
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 : ATCC55730	WO2004034808
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = CNCM I-2219	EP1189517
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM I-2618	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis subsp. lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis subsp. lactis</i>	HN019 = NM97/01925	WO9910476

Tableau (01) : lecture de la galrie Api 50 Chl medium

Interprétation :

- Le profil biochimique ainsi obtenu permet d'identifier la souche à l'aide du tableau d'identification et/ou du logiciel d'identification apiwebTM.

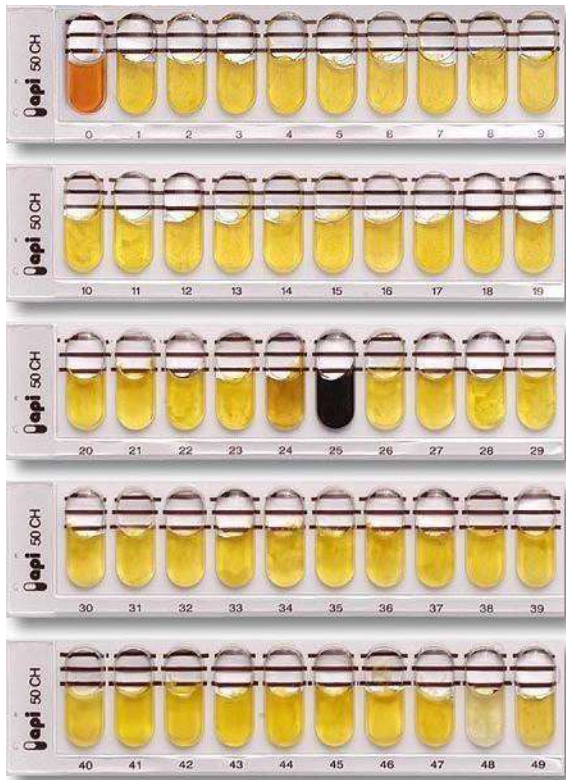


Figure (01) : exemple de profil d'identification obtenu à l'aide de galrie Api 50 chl Medium.

Annexes 03 : aptitudes des probiotiques sur le rats wistar**Tableau02 : consommation alimentaire hebdomadaire**

consommation alimentaire hebdomadaire /lot (g)	CHEVRE₁₀	NSC₁₀	T
S₁	579	584	526
S₂	546	603	631
S₃	594	550	722
S₄	749	806	870
S₅	828	791	731

Tableau 03 : le gain de poids

Gain de poids	CHEVRE₁₀	NSC₁₀	T
S₁	13,40	16,80	12,40
S₂	33,60	32	33,60
S₃	44,20	42,80	46
S₄	08,80	13,60	10,40
S₅	13,20	22,80	22,80

Tableau 04 : indice de consommation

IC	CHEVRE₁₀	NSC₁₀	T
S₁	43,209	34,761	42,419
S₂	16,25	18,843	18,779
S₃	13,438	12,850	15,695
S₄	85,113	59,264	83,653
S₅	62,72	34,69	32,061

Tableau 05: poids vif moyen

Vif moyen	CHEVRE₁₀	NSC₁₀	T
S₁	96,8	98,8	90
S₂	130,4	130,8	123,6
S₃	174,6	173,6	169,6
S₄	183,4	187,2	180
S₅	196,60	210	202,80

Références bibliographique

- Amara (2012):** effets probiotiques des bactéries lactiques sur le poulet de chair.
- **Axelsson .L.T.chung T.C, Dobrogosz W. J.et Lindgren S.E.1989.** Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobaccillus reuteri*. *Microbiol .Ecol. Health Dis.* 2:131-136.
- Axelsson L.T.2004 lactic Acid Bacteria :** classification and physiology . In *lactic Acid Bacteria- Microbiology and functional Aspects* . Edited by S. salminen, A.v. Wright et A. Ouwehand. Marcel Dekker, Inc.1-66.
- Ballongue, J. (1993).** Bifidobacteria and probiotic action. *Lactic Acid Bacteria.* : 357428.
- Baumgart D. C., & Dignass A. U., 2002.** Intestinal barrier function. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 5, 685-94.
- Belamri.M & Benkerroum N.** probiotique , prébiotique , symbiotique et maladie inflammatoire chronique de l'intestin . *Ann Biol Clin Q,Ué* , 2005 ; 4 (2) : 7-14.
- Bjorkroth J. et Holzapfel W. 2003.** Genera *Leuconostoc* , *Oenococcus* and *Weissella*. In *The prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community.* Edited by M. Dworkin. New York, Springer-Verlag. Epub March.28
- Bjorklund, H.,Bondestam J. and Bylund G.(1990):**Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from farms .359-367.
- Bissonnette F., Labrie S., Deveau H., Lamoureux M. et Moineau S., 2000.** Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged Cheddar cheese .*J. Dairy Sci.* 83:620-627.
- Braegger C . Rolle** des probiotiques dans la prévention et le traitement de la gastro –entérite aigüe chez l'enfant. *MonaIsschr Kinderheil .Kd* ,2002 ;150 :824-828.
- Breton M .** Les prébiotiques et probiotiques déparquent chronique , 2007.
- **Bukowska H., Pieczul-Mroz J., Jastrzebska M., Chelstowski K., & Naruszewicz M., 1998.** Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis*, 137, 437–438.

- Byaruhanga Y.B., Bester B.N. and Watson T.G.(1999)**:Growth and survival of *Bacillus cereus* in mageu, a sour maize beverage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15.p329-333.
- Campeotto F., Waligora A.J., Dupriet, Doucet F., kalachi N., Dupont C., Butel M.J.** mise en place de la flore intestinale du nouveau né. *J Gastro entéro clint BIO*,2007,31(5) :533-542.
- Carina Audisio M. et Maria C.A.2010.** Bactiocin-like substance produced by *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salivarius* CRL1384 with anti- *Listeria* and anti- *salmonella* effect. *Res.J. Microbio.5* (7): 667-675.
- Carr F.J., Chill D. et Maida N. 2002.** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Crit. Rve. Microbiol*, 28: 4, 281-370.
- Cogan T.M., et Hill C. 1993.** Cheese starter cultures. In: Fox, P.F. (Ed), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1, Second Edition, Chapman and Hall, pp. 193-255.
- **Corrieu, Georges, et al.** (2005). "Bactéries lactiques et probiotiques".
- Cummings, J. H. and Kong, S. C., 2004.** Probiotics, prebiotics and antibiotics in inflammatory bowel disease *Inflammatory bowel disease_crossroads of microbes, epithelium and immune systems*. Wiley, Chichester (NovartisFoundation Symposium263): 99-114.
- Desmazeaud M. J. et De Roissard H .1992.** Métabolisme general des bactéries lactiques, *Bactéries Lactiques, aspects fondamentaux et technologiques*. Ed. Loriga Uriage. 1, 169-207.
- comparative meta-analysis of the effect of *lactobacillus* species on weight Gain in human and animals, Matthieu million Angelakis Mical paul, **Fabrice Armougom Leonard Leibovici and Didier Raoult** , *Microbial pathogenesis* publié en ligne 2012.
- Dixon,B.(1994)**:Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens ,*J,World Aquacult.Soc.*25:60-63.
- Drasar B.S.** Some factors associated with geographical variations in the intestinal microflora. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 1974;3:187-96.
- Drasar B.S. and Barrow P.**(1985). *Intestinal microecology. Van Nostrand reinhold,*

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

- **Ducluzeau,R, (1969)**. [influence of the Zoological species on the microflora of the gastro intestinal tract]. *Rev Immunol Ther Antimicrib* **33**(6) :345-83.

- Duobos , R . , R. W . Schaedler , et al . 1963**, * composition alteration , and Effect of the intestinal Flora , **Fed Proc* **22** :1322-9.

- Dupont L., 1998**. **Identification** moléculaire de souches de lactobacillus productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches. Thèse, Université Lava, Canada.

- **Finegold S., Suttler V. and Mathison G.** (1983). Normal indigenous intestinal microflora. *In: Hentdges DJ, ed. Human intestinal microflora in health and disease. Academic Press, New-York.*

- Fooks,L.J and Gibson,G.R (2002)** Probiotics as Modulators of the Gut Flora *British Journal of Nutrition* **88**,1 ;S 39- S49.

- Fuller R.** probiotics in man and animals , *journal of applied Bacteriology*, **66** : 365-378, 1989.

- Fleming H.P.,Etchells J.L. et Costilow R.N.(1975)**:Microbiological inhibition of isolate of *Pediococcus* from cucumber brine. *Appl, Environ. Microbiol.* **30**:1040-1042.

- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.*, **125**(6): 1401-1412.

- Gibson, G. R., Probert, M, H., Loo, V, J., Rastall, A, R., and Roberfroid, B, M., 2004.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews.*, **17**: 259–275.

- Gill, H.** (1998). "Stimulation of the immune system by lactic cultures." *International Dairy Journal* **8**: 535-544.

- Gill,H.S.(2003)** Probiotic to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract, *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **17**,755-773.

-Gomes, A. M. P. and F. X. Malcata (1999). "Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics." *Trends in Food Science & Technology* 10(4-5): 139-157.

-Gournier-Château N., Laprent J.P. , Castillabos M.I.,& Laprent J.L., 1994. Les probiotique en alimentation animale et humaine , Edition technologie et documentation la voisier pp-1-192, paris , France

- Gorbach S.I, Plaut A.G, Nahas L., Weinstein L., Spanknebel G., Levitan R. (1967).Studies of intestinal microflora. II. Microorganisms of the small intestine and their relations to oral and fecal flora. *Gastroenterology* ;53:856-67.

Gosselink M. P, Schouten W. R., van Lieshout L. M., Hop W. C., Laman J. D., & Ruselevan Embden J. G., 2004. Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Disease of Colon and Rectum*, 47, 876-884.

- Guandalini S., 2002. Use of *Lactobacillus-GG* in paediatric Crohn's disease. *Digestive and Liver Disease*, 3, 63-65.

- Gueimonde M, and Salminen S.2006.New methods for selecting and evaluating probiotic .*Dig Liver Dis* . 38: S242- S247.

-Gunal ,M.,G.Yayli,D.Kayo,N.Karahan and O.Sulak.2006,*The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid.*

-Hammes W. P. et Hertel C. 2003. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Edited by M. Dworkin. New York. Springer- Verlag. E pub December 15th.

-Hanawa T.,Yamamoto T., Kamiya S.,(1995):*Listeria monocytogenes* can grow in in macrophages without the aid of proteins induced by environmental stress .*Infect Immun* ;63(12):4595-9.

-Hartak A.,Bouché S,Gansel X,Boutibonnes P,Auffray Y (1994) : Starvation-induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* IL1403 . *Appl, Environ.Microbiol.*60:3474-3478.

- **Holzappel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. and Huis In't Veld J.H.** (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* ;41:85-101.
- Idoui T. and Karam N-E.** (2008) Lactic acid bacteria from Jijel's. traditional butter : Isolation, identification and major technological traits, *Grasasy y Aceites* , 59 (4).
- Jay M. J.** 1996. *Modern Food Microbiology*, 5 th Edition, Chapman and Hall, New York.
- Jozola A. F., de Lencastre Novaes L.C., Cholewa O., Moraes D et Penna T.C.V.**2005. Increase of nisin production by *Lactococcus Lactis* in different media .*Afr. J. Biotechnol.* 4: 3,262-265.
- Kandler O.** 1983. Carbohydrate metabolism in Lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 209-224.
- karam, N.E.and Zadi-Karam,H.**(1994) : Isolement et caractérisation de bactéries lactiques de lait crus d'Algérie.
- Kilstrup M.,Jacobsen S., Hammer K., Vogensen F.K.,**(1997):Introduction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*,*Appl.Environ.Microbiol*,63:1826-1837.
- Klaenhammer T.R., Barrangou R., Logan Buck B. & Azcarate-Peril M.A.,** 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.*,**29**, 393-40.
- Kopp-Hoolihan L.**(2001). Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc* ;101:229-38; quiz 239-41.
- Kotelnikova E.A. et Gelfand M.S.** 2002. Bacteriocin .Production by Gram- positive Bacteria and the Mechanisms of Transcriptional Regulation. *Russian J. Genetics.* 38: 6, 628-641. Translated from *Genetika*, 38: 6, 758-772.
- Kralik, G., Milaković, Z., Ivanković, S.,** 2004. Effect of probiotic supplementation on the performance and the composition of the intestinal microflora in broilers. *Acta. Agraria Kaposvariensis* ., 8(2): 23-31.

- Kwon.Y.M. and Ricke. S.C.** Induction of acid resistance of Salmonella Typhimurium by exposure to short-chain fatty acids . *Appl. Environ . Microbiol.*, 1998, 64, 3458-3463.1998.
- Liévin-Le Moel V,Servin AL(2006).** The Front line of enteric host defence against unwelcome intrusion of harmful microorganisms : Mucins, antimicrobial peptides and microbiota *Clin Microbiol Rev . 19: Sous presse.*
- Liévin et al., 2000,** V. Lievin, I, Peiffer, S. Hudault, F.Rochat, D. Brassart, J.R. Neeser, A.L. Servvin bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity *Gut , 47(2000),pp. 646-652.*
- Lilly D .M. , & Stillwell R.H ., 1965.**probiotic : growth-promoting factors produced by micro-organisms , *science , 147, 747-748.*
- Lister J. 1873.** A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. *Quart. J. Microbiol. Sci.* 13: 380-408.
- Lopez-Diaz T.M., Alonso C., Roman C., Garcia- Lopez M .L. et Moreno B. 2000.** Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiol.* 17:23-32.
- Man J.C., de Rogosa M. and Sharpe, ME.A** médium for the cultivation of lactobacilli, *Appl.Bact.* (1960) 23,130-135.
- Marshall, V.M., Tamine, A.Y. (1997).** Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *International Journal of Dairy Technology.* 50 (1) : 35-41.
- Marteau, P., P. Pochart, et al. (1992).** "[Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium sp. in the small intestine following ingestion in fermented milk. A rational basis for the use of probiotics in man]." *Gastroenterol Clin Biol* **16(1): 25-8.**
- Marteau P., Pochart P., Dore J., Bera-Maillet C., Bernalier A., Corthier G. (2001a).**Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol ;67:4939-42.*
- Melmed, G., L. S. Thomas, et al. (2003).** "Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for hostmicrobial interactions in the gut." *J Immunol* **170(3): 1406-15.**

- **Mercenier A., Pavan S., & Pot B., 2002.** Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 99-110.
- Metchnikoff, E (1907)** The prolongation of life , putman sons , New York, NY.
- **Moreau, M. C.** (2001). "Les probiotiques : des microorganismes bénéfiques pour notre système immunitaire ?" *Chelé-Doc Numéro 63*.(Janvier/Février).
- Mottet, C. and P. Michetti** (2005). "Probiotics: wanted dead or alive." *Dig Liver Dis* **37**(1): 3-6.
- Naidu, A. S., W. R. Bidlack, et al.** (1999). "Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB)." *Crit Rev Food Sci Nutr* **39**(1): 13-126.
- Navarro L., Zarazaga M., Saenz J., Ruiz-Larrea F . et Torres C.2000.** Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.* 88 : 44-51.
- **Oozeer, R., N. Goupil-Feuillerat, et al.** (2002). "Lactobacillus casei is able to survive and initiate protein synthesis during its transit in the digestive tract of human flora-associated mice." *Appl Environ Microbiol.* **68**(7): 3570-4.
- Orla-Jensen S. 1919.** The Lactic acid bacteria. A.F. Høst and son, Koenighichen Hof-Boghamdel, Copenhagen.
- Parker R.B ., 1974 .** probiotics, the other half of the antibiotic story . animal nutrition and health , 29 , 4-8.
- Paul Vos, George Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer, William B. Whitman,** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes,* Springer, septembre 15 2009 (ISBN 9780387684895)

- Petersohn A., Brigulla M., Haas S., Hoheisel J.D., Volker U., Hecker M., (2001)** Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 183:5617-5631.
- **Picardc, Fioramonti J, François A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. 2005.** Review article : bifidobacteria as probiotic agents-physiological effects and clinical benefits, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 22(6) :495-512.
- Piva, G., Rossi, F., 1999.** Possible alternatives to the use of antibiotics as growth promoters . *New additives. Ciheam.*, p. 83-106.
- Plummer S., Weaver M. A., Harris J. C., Dee P., & Hunter J., 2004.** *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea.
- Inte Rosenfeldt V., Benfeldt E., Valerius N. H., Paerregaard A., & Michaelsen K. F., 2004.** Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *Journal of Pediatrics*, 145, 612-616.
- **Porter E.M., Bevins C.L., Ghosh D., Ganz T. (2002).** The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci* ;59:156-70.
- Priault, G., 2003.** Effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la β -lactoglobuline chez la souris et étude de leurs mécanismes d'action. Thèse. Université Laval Québec.
- Rannuz H .** prébiotiques et probiotiques . Nestlé Resaerch center , 2009.
- Rasic, J. Lj. et Kurmann, J. A.** Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional-phy siological, medical and technological aspects and bibliography. Birkhauser Verlag ed. Basel, Boston, Stuttgart: 1983.
- Rigand D.** l'intestin un prodige d'adaptation et de coopération . *Objet Nutr* , 2003 ;P : 67 .
- Roberfroid M .** flore intestinale c'est la que ça se passe , *Top Santé* , 2009 ; 68-69.
- Rosenfeldt V., Michaelsen K. F., Jakobsen M., Larsen C.N., Moller P. L., Pedersen P., Tvede M., Weyrehter H., Valerius N. H., Paerregaard A., 2002.** Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatrics and Infectious Diseases Journal*, 21, 411-416. *rnational Microbiology*, 7, 59-62.
- Rastall, R. A., Gibson, G. R., 2004.** Functional foods. *Bioscience.*, Vol 2, N 1.

- Roy, D.** (1996). Les probiotiques : **des** bactéries bienfaisantes. *Diététique en action*. 15-20,
- ROY, D.** (1997). Probioticç : new challenge for the next millenium. *Canadian Dairy*. March 2.
- Roy Vincent (2006)**: caractérisation de genes codant pour des proteins de surface de la bacteria actitobacillus pleuropneumoniae à l'aide d'un procédé d'invasion de cellules Hela. Thèse.trois-Rivières, université du Québec à Trois-Rivières,166p.
- Saarela M, Mogennsen G , Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T.2000**.Probiotic bacteria: Safety,functional and technological properties .*J Biotechnol*.84:197-215.
- Salminen, S., E. Isolauri, et al.** (1996). "Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges." *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**(2-4): 347-58.
- **Salminen, S., C. Bouley, et al.** (1998). "Functional food science and gastrointestinal physiology and function." *Br J Nutr* **80 Suppl 1**: S147-71.
- Salminen S., Ouwehand A. et Von Wright A.2004**. Lactic Acid Bacteria : Microbial and Functional Aspects, 3rd ed. Marcel Dekker. New York. 375-395.
- Savage,D, C. and R.J.Dubos (1967)**.*localiZation of indigenaus yeast in the Marine stomach*.*J Bacteriol* 94 (6) : 1811-1816.
- Savage D.C.**(1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* ;31:107- 33.
- . **Scardovl, V. (1986)**, Genus *Bifidobacterium*, p. 1418-1434. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2, Williams & Wilkins, Baltimore.

- Schillinger U. and Lucke K. (1990):** Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products. *Fleischw.* 70:1296-1299.
- Schleifer K.H. et Ludwig W. 1995.** Phylogenetic relationships of Lactic Acid bacteria. *In The genera of lactic acid bacteria*, Edited by B.J.B. Wood & W. H. Holzapfel. London : *Blakie Academic and Professinal.* pp. 7-18.
- Schrezenmeir, J and De Vrese, M., 2001.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(2): 361-364.
- Servin . A, Coconnier . M . H ,** Adhesion of probiotic Strains Best Pract .*Res.Clin.Gastroenterol.*,17(2003),pp.741-754.
- Servin AL.**Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens .*FEMS Microbiol.Rev.*2004;28:405-440.
- Shihata A. et Shah N.P. 2000.** Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 10 : 401-408.
- Smith, H.W. (1965)***observation on the Flora of the alimentary Tract of animals and Factors Affecting its composition* .*J Pathol Bacteriol* 89 : 95-122.
- Smith J .L.and Palumbo S.A.(1983):**Use of starter cultures in meat.*J.Food Prot.*46:997-1006.
- Spanggaard,B.,F.Jorgensen,L.Gram and H.H.Huss,(1993):**Antibiotic rsistance in bacteria from three freshwater fish farms and unpolluted stream in Denmark.*Aquaculture*,115:195-207.
- Spears , R.W .and R.Freter., (1967).***Improved isolation of anaerobic bacteria from the mouse lecum by maintaining continuous strict anaerobiosis.*Proc Soc Exp Biol Med* 124(3) : 903-9.
- Stamer J.R. 1976.** Lactic Acid Bacteria, Defigueiredo M.P. and Splittstoesser D.F., Eds., *Food Microbiology ; Public Health and Spoilage Aspects*, AVI Publishing Co. Inc., Westport, Connecticut. 404-426.
- Stanton, C., G. Gardiner, et al. (2001).** "Market potential for probiotics." *Am J Clin Nutr* 73(2 Suppl): 476S-483S.

-Steer T, Carpenter H, Tuohy K, Gibson GR. 2000. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro and prebiotic – *Nutr Res Rev.* 13:229-254.

-Stiles M.E. et Holzapfel W.H. 1997. Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36 :1-29.

- Turchet P., Laurenzano M., Auboiron S., & Antoine J. M., 2003. Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *Journal of Nutrition and Health Aging*, 7, 75-77.

-Van de Guchte, M., Serrero P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S.D, and Maguin E., 2002 stress responses in lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 187-216.

- Verdu E. F, Bercik P., Bergonzelli G. E., Huang X. X., Blennerhasset P., Rochat F., Fiaux M., Mansourian R., Corthesy-Theulaz I., & Collins S. M., 2004 *Lactobacillus paracasei* normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology*, 127, 826-837.

-Vorland, L. H., H. Ulvatne, et al. (1998). "Lactoferricin of bovine origin is more active than lactoferricins of human, murine and caprine origin." *Scand J Infect Dis* 30(5): 513-7.

- Wang J. L., Kang L., & Jia H. L., 2004. Generation and characterization of monoclonal antibodies against *Botulinum neurotoxin* type A (BoNT/A). *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 20, 83-85.

-Wang M. F., Lin H. C., Wang Y. Y., & Hsu C. H., 2004. Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatric Allergy and Immunology*, 15, 152-158

-Who 1974. Toxicological evaluation of some Food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. *WHO Food Additives.* 5 :461-465.

-An international journal of food science and technology *Sciences des Aliments*
0240-8813 ARTICLE VOL 25/3 - 2005 - pp.249-253 - doi:10.3166/sda.25.249-253

TITRE

**Des bactéries lactiques tolérantes à l'acidité et aux sels biliaires dans le yonga,
une boisson fermentée traditionnelle du Congo (AUTEUR(S)D. LOUEMBE, S.
KELEKE, S. C. KOBAWILA .**