

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Dr. Moulay Tahar – Saida**

**Faculté des sciences**



**Département de Biologie**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : « Biochimie et physiologie cellulaire »

**Thème**

Effet probiotique des bactéries lactiques isolées de lait de chamelle de différentes régions algériennes sur les paramètres lipidiques chez le rat Wistar

Présenté par :  
Mme. Lansari Wassila

Mlle. Semahi Houria

Soutenu le : 14 septembre 2015 devant la commission de jury composée de :

Président : Mr Ammam Abdelkader      Maitre assistant A      Université de Saida.

Examineur : Mme Maya Hassani      Maitre de conférences B      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 modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à M<sup>LLE</sup> **AMARA SABRINA**, maitre assistant A à l'Université de SAIDA, pour nous avoir proposé ce sujet, pour ses conseils scientifiques judicieux et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail malgré ses charges professionnelles.

Nos reconnaissants remerciements à monsieur Ammam Abdelkader pour son aide et collaboration, sa compréhension et l'intérêt porté pour mon sujet.

Nous somme particulièrement reconnaissante à monsieur Ammam Abdelkader de juger mon travail en tant que président ainsi que Mme Maya Hassani, de bien vouloir évaluer et examiner ce mémoire.

Nos très spéciaux remerciements reviennent à nos familles et nos amies pour leurs encouragements et leur compréhension.

Finalement, nous remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

**A vous tous, un grand Merci.**

## *Dédicace*

**Tout d'abord, louage à « Allah » qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long de la réalisation de ce modeste travail.**

Je dédie ce travail A :

- **Ceux** à qui je dois tant et **qui m'ont tout donné sans rien en retour**, mes chers parents, **ma mère** et **mon père**, qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien et leurs encouragements, par leurs dévouements exemplaires et les énormes sacrifices durant toute leur vie et qui nous ont toujours aimé nous voir réussir. Je les remercie pour tout ce qu'ils ont fait pour nous, que dieu les protège, leur donne santé et longue vie et **les garde pour nous**.

-**Celui** qui m'a encouragé et soutenu en continu dans mes moments les plus difficiles, **mon mari**.

- **Le plus chère à mon cœur mon fils Wail**.

- **Ma** très chère **sœur** et sa petite famille, mes très chers **frères** et leurs familles...

- **Toute** personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

- **Tous** les enseignants et enseignantes qui ont contribué à ma formation.

Je leur dédie les premiers fruits de ma réussite et prie dieu le tout puissant de leur donner protection et santé.

-Et surtout mon adorable et très chère **binôme « Houria »**.

**Le plus beau sentiment c'est le  
mystère,  
C'est l'origine de l'art et de la  
science.**

**Albert Einstein**

# DEDICACE

A l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A mon très cher **Papa** et ma très chère **Maman**, pour leurs sacrifices, leur soutien moral, leur tendresse, leurs encouragements tout au long de mes études et durant ce mémoire, ils m'ont offert tout pour que je réussisse, je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils ont fait pour moi, j'espère qu'ils sont fiers de moi. Que Dieu les garde pour moi.

A mes frères et ma Cher sœur « **Fadila** » pour leur disponibilité, vous avez toujours su être présents dans les meilleurs moments comme dans les pires.

Je dédie aussi ce mémoire à mes amis **Karima** et **Ahmed**, pour leurs encouragements si tendres.

A ma binôme de choc « **Wassila** », pour tous les BONS moments que nous avons partagé.

A tous ceux qui de près ou de loin, ont collaboré à la réalisation de ce travail.

Et enfin à tous mes professeurs.

M<sup>elle</sup> **Houria**

## **Résumé**

Les probiotiques sont définis comme étant des suppléments nutritionnels composés de microorganismes précis, vivants, en quantité suffisante et capable de modifier le microbiote intestinal de l'hôte pour exercer leurs effets bénéfiques sur l'hôte.

L'activité de certaines souches lactiques à caractère probiotique est exploitée pour produire des aliments fonctionnels à caractère préventif et thérapeutiques.

La première partie de cette étude a permis d'identifier 10 souches de bactéries lactiques déjà isolées de différentes régions d'Algérie en se basant sur leur profil macroscopique, microscopiques ainsi que par le système API 50chl.

La seconde partie consistait à sélectionner les souches à potentiel probiotiques par des tests tel que la survie aux conditions hostiles rencontrées le long du tractus digestif, le pouvoir antagoniste contre quelque bactérie pathogènes et la résistance aux Antibiotiques. Parmi les 10 souches de lactobacilles et bifidobactéries étudiées, seule une souche a répondu positivement au critère de sélection.

La dernière partie de ce travail était la confirmation de l'effet de cette souche sélectionnée en l'intégrant avec des prébiotiques dans l'alimentation des rats Wistar

Puis l'évaluation des effets de cette souche probiotique et du régime hyper gras sur les paramètres zootechniques et sur quelques paramètres biochimiques tels que le cholestérol, les triglycérides et la glycémie.

Les résultats obtenus suite à la consommation de la souche probiotique additionnée de prébiotiques et un régime hyper gras a montré des effets encourageants et prometteurs sur la santé des animaux par rapport aux témoins.

**Mots clés :** Probiotique, prébiotique, lactobacilles, microbiote intestinale, cholestérol, triglycérides, rats Wistar.

## **Abstract**

Probiotics are defined as nutritional supplements consisting of specific microorganisms, live, sufficient and capable of modifying the intestinal microbiota of the host to exert beneficial effects.

The activity of some lactic acid probiotic strains character is exploited to produce functional foods as a preventive and therapeutic nature.

The first part of this study was the identification of 10 strains of lactic bacteria previously isolated from different regions of Algeria based on macroscopic, microscopic profile and the API 50chl system.

The second part consisted of selecting the strains with probiotic potential by such tests that the survival in hostile conditions encountered along the digestive tract, the antagonist potency against some pathogenic bacteria and resistance to Antibiotics. Among the 10 strains of lactobacilli and bifidobacteria studied, only one strain responded positively to the selection criteria.

The last part of this work was the confirmation of the selected strain effects which was integrating with prebiotics in the diet of Wistar rats.

Then the evaluation of probiotic and hyper-fat diet effects on zootechnic and on some biochemical parameters such as cholesterol, triglyceride and glucose.

The results obtained following the consumption of the pro/prebiotics and hyper fatty diet show encouraging and promising effects for the health of tested animals compared to controls.

**Keywords:** Probiotic, prebiotic, lactobacilli, intestinal microbiota, cholesterol, triglycerides, Wistar rats.

## المخلص

تم تعريف البروبيوتيك على أنها مكملات غذائية تتكون من كائنات حية دقيقة محددة؛ تعيش بكميات كافية و قادرة على تغيير الجراثيم المعوية لممارسة تأثيرات مفيدة على المضيف.

تم استغلال نشاط بعض سلالات حمض اللبن ذات طابع بروبيوتيك لإنتاج أغذية وظيفية ذات ميزة وقائية و علاجية. **الجزء الأول** من هذه الدراسة يسمح بالتعرف على 10 سلالات من البكتيريا اللبنية المعزولة سابقا من حليب من مختلف المناطق الجزائرية. و ذلك بالاستناد على البيانات العيانية و المجهريّة و نظام API 50 .

**الجزء الثاني** تمثل في تمييز و تعيين السلالات ذات الاحتمال الأكبر في كونها بروبيوتيك و ذلك باختضاع السلالات إلى عدة اختبارات مثل الصمود في الأوساط الصعبة المتواجدة على طول الجهاز الهضمي، القدرة التضادية ضد بعض البكتيريا المسببة للأمراض. مقاومة لبعض المضادات الحيوية.

من بين 10 سلالات للعصيات اللبنية و البفيدوبكتيريا، استجابة فقط سلالة واحدة إيجابيا لمعيار الاختيار.

**أما الجزء الأخير** من هذه الدراسة هو تأكيد تأثير هذه السلالة المختارة من خلال دمجها مع البريبايوتكس في النظام الغذائي للفئران ويستار.

ثم تقييم آثار بروبيوتيك و إتباع نظام غذائي مشبع بالدهون في القياسات وزن الجسم و على بعض القياسات البيوكيميائية (الكولسترول ، الدهون الثلاثية، الجلوكوز) في الفئران ذات سلالات "ويستار"

النتائج التي تم الحصول عليها بعد استهلاك سلالة الكائنات الحية المجهريّة ذات طابع البروبيوتيك و إضافة البريبايوتكس و إتباع نظام غذائي دهني أظهرت تأثير مشجع و واعد لصحة الحيوانات مقارنة مع الشواهد.

**كلمات مفتاحية :** بروبيوتيك، البريبايوتكس ، العصيات اللبنية، الجراثيم المعوية، الكولسترول، الدهون الثلاثية ، فئران ويستار

# Table des matières

---

Résumé	i
Abstract	ii
Résumé en Arabe	iii
Tables des matières	iv
Liste des figures	v
Liste des tableaux	8
Glossaire	8
Abréviations	8
Introduction	01
01 : synthèse bibliographique	
1.1. Bactéries lactiques	03
1.1.1. Présentation des bactéries lactiques	03
1.1.2. Habitat et origine des bactéries lactiques	03
1.1.3. Taxonomie des bactéries lactiques	03
1.1.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques	04
1.1.4.1. Le genre Lactobacillus	
• Groupe I «Thermobacterium»	05
• Groupe II «Streptobacterium»	
• Groupe III «Betabacterium»	
1.1.4.2. Le genre Bifidobacterium	05
1.1.5. Intérêts des bactéries lactiques	
• En alimentation	06
• Comme probiotiques	
1.2. Microflore intestinale	07
1.2.1. Microflore intestinale	07
1.2.2. Fonction du microbiote intestinal	
1.2.3. Les facteurs majeurs influençant la microflore gastro-intestinale	09
1.3. Les probiotiques /prébiotiques / symbiotiques	10
1.3.1. Les probiotiques	10
1.3.1.1. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé	12
1.3.1.2. Critères de sélection	15
1.3.1.3. Mode d'action des probiotiques	
• Compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion	17
• Production de substances antimicrobiennes	
• Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments	
1.3.2. Les prébiotiques	20
1.3.2.1. FOS Actilight et FOS Raftilose	22
1.3.3. Les symbiotiques	23
1.3.4. Les principales souches microbiennes à potentiel probiotique	24
1.3.4.1. Les souches probiotiques utilisées en alimentation humaine et animale	24
1.3.4.2. Principales souches commercialisées	24
1.4 Le métabolisme du cholestérol	24
• La synthèse du cholestérol	27



# Table des matières

---

1.5 Biosynthèse des Triglycérides	29
• Catabolisme des triglycérides	
➤ Catabolisme intestinal des TG d'origine alimentaire	30
➤ Catabolisme tissulaire	
1.6 Les sels biliaires	30
1.7 Présentation de rat Wistar	32
1.7.1 Particularités du développement	33
1.7.2 La flore du rat	33
<b><u>02</u> : Matériels et méthodes</b>	
2- Matériels et méthodes	35
2.1- Lieu de l'étude	35
2.2- Matériels	35
2.2-1-Matériel biologique	
• Origine des souches bactériennes	
• Les sels biliaires	35
• Les Prébiotiques	
• Disques d'antibiotiques	
2.2-2- Milieux de culture	
• Le milieu MRS	
• Milieu LB	39
• Le lait	
2.2-3- Méthodes	39
a -Expérimentation <i>in vitro</i>	39
a-1. Vérification de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique	39
a.1.1. Conservation des souches	40
a.1.2. Identification des bactéries lactiques isolées	40
a.1.3 .Etude morphologique	
• L'étude macroscopique	40
• L'étude microscopique:	
2 Tests physiologiques et biochimiques des souches à caractère probiotique	41
a.2.1 Recherche de la catalase	41
a.2.2 Sélection des souches probiotiques	41
a.2.2.1 La résistance aux antibiotiques	42
a.2.2.2 Pouvoir antibactérien des souches	42
a.2.2.3 Test de survie dans les conditions gastro-intestinal :	
➤ La tolérance aux sels biliaires	43
➤ Résistance aux pH acides	
a.2.2.4 . Croissance des souches lactiques en présence de fructooligosaccharides (F.O.S)	44
• En milieu solide	
a.3. Identification de l'espèce par Galrie API 50	
• Préparation de l'inoculum	44
• Préparation des galeries	
• Lecture et interprétation	
b. Expérimentation <i>in vivo</i>	45

# Table des matières

---

b-1. Animaux	45
b-1-1 Nutrition	
• Besoins nutritionnels	46
• Aliments et approvisionnement en eau	
• Nourriture	
b.1.2 Mise en place de l'infrastructure d'élevage	47
b.1.3 Administration indirecte des probiotiques	48
b.1.4 Préparation du lait fermenté	48
b-2 .Paramètre zootechniques	49
b-2-1. Paramètres biologiques	
• Nourriture consommée	49
• Pesée des animaux	
• Taux de survie	
b-2-2 .Paramètres de croissances	
• Gain de poids moyen par semaine	49
• L'indice de consommation	
• Le poids vif moyen	
b-2-3. Paramètres biochimiques	
• Détermination des teneurs en glucose	50
• Détermination des teneurs en cholestérol et triglycérides	
b-2-4. Sacrifice et prélèvement des organes	51
b-2-5 : Analyse statistique des résultats	52
<b>03 : résultat et discussion</b>	
3-1 Expérimentation in vitro	53
3.1.1 Identification des bactéries lactiques isolées	53
3.1.1.1 Etude morphologique	
a- L'étude macroscopique	53
a.1 Sur gélose	
a.2 Sur bouillant	
b- L'étude microscopique	54
3.1.1.2 Sélection des souches probiotiques	
• La résistance aux antibiotiques	
• Pouvoir antibactérien des souches	55
• La tolérance aux sels biliaires	
• Résistance aux pH acides	
• Croissance des souches lactiques en présence de fructooligosaccharides (F.O.S)	
3.1.1.3 Identification de la souche NSCA1 par Galerie API 50	58
3.1 Expérimentation <i>in vivo</i>	70
3.1.1 Paramètre zootechniques	
a- Paramètres biologiques	70
• Nourriture consommée	
• Le poids vif moyen	
b- Paramètres de croissances	73
c- Gain de poids moyen par semaine	73

# Table des matières

---

• L'indice de consommation	
• Taux de survie	
d- Paramètres biochimiques	75
• Détermination des teneurs en glucose	75
• Détermination des teneurs en cholestérol et triglycérides	76
e-Le poids de quelques organes internes.	83
<b><u>04 : Conclusion et perspectives</u></b>	87
<b><u>5- références bibliographiques</u></b>	89
<b><u>6-Annexe</u></b>	106
Annexe 01 : Les milieux de culture	106
Annexe 02 : Coloration de Gram	108
Annexe 03 : API 50 CHL	109
Annexe 04 :	
• Paramètre biochimiques sanguins* des rats WISTAR	114
• Prise de sang chez les rats Wistar	
Annexe 05 :	
• Manipulation et entrave physique	116
• Hébergement	
Annexe 06 : Aptitudes des probiotiques sur le rats wistar	118

## Liste des figures

---

Figure 01 : Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'Homme (Ouwehand et Vesterlund, 2003).	09
Figure 02 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques. Adapté de Merceneir et <i>al.</i> ,(2002).	12
Figure 03 : Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le traitement des infections entériques (adapté de Calder et Kew, 2002 ; Kaur et <i>al.</i> ,2002).	18
Figure 04 : Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhésion spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques. ( Servin et Coconnier,2003).	19
Figure 05 : Mode d'action des acides organiques produits par les probiotiques contre les pathogènes bactériens (Servin et Coconnier, 2003).	20
Figure 06 : structures des FOS Actilight et FOS Raftilose.	22
Figure 07 : Réaction de synthèse des FOS Actilight.	22
Figure 08 : réaction de synthèse de FOS Raftilose .	23
Figure 09 : relations métaboliques du cholestérol.	25
Figure 10 : vue d'ensemble du métabolisme du cholestérol.	26
Figure 11: les différentes étapes de la synthèse du cholestérol.	27
Figure 12 : La biosynthèse du cholestérol.	28
Figure 13: Biosynthèse des Triglycérides.	29
Figure 14: la formation des acides biliaire à partir du cholestérol.	31
Figure 15: la conjugaison des acides biliaire.	32
Figure 16 : Présentation du rat Wistar.	33
Figure 17: système digestive du rat wistar.	34
Figure 18 : Représentation schématique des halos d'inhibitions.	43
Figure 19: Représentation schématique de méthode de double couche.	43
Figure 20 : Cage d'élevage	47
Figure 21: Méthode de préparation du lait fermenté	48
Figure 22: Anesthésie des rats par inhalation du chloroforme.	52
Figure 23: l'aspect macroscopique des colonies de la souche sur milieu MRS après 24 h d'incubation à 37°C.	53

## Liste des figures

---

Figure 24 : cultures pures des bactéries lactiques sur milieu MRS liquide après incubation à 37°C pendant 24h.	54
Figure 25: La morphologie des cellules de la souche après coloration de Gram observé sous le microscope optique (G x 100).	54
Figure 26: (A, B, C et D) Résultat du test d'antibiogramme de la souche Bech B1.	57
Figure 27 : Activité inhibitrice des souches lactiques sur <i>Hafnia alveei</i> (EL1).	58
Figure 28 : Modes d'action sur les pathogènes du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés produits par les lactobacilles (Rousseau, 2004).	61
Figure 29 : Mode d'action sur les pathogènes des bactériocines produites par les lactobacilles (Rousseau, 2004).	61
Figure 30 : aspect des colonies des nos souches sur un milieu MRS à 10 % de sels biliaries.	62
Figure 31 : Effet de pH sur la croissance des bactéries lactiques	65
Figure 32 : colonies obtenues sur le milieu MRS en présence et en absence des FOS	67
Figure 33 : Test de fermentation des hydrates de carbone sur galerie API 50 CHL de la souche NSCA1.	68
Figure 34 : consommation alimentaire hebdomadaire.	70
Figure 35 : Evolution du poids vif.	71
Figure 36: Evolution du gain de poids moyen.	72
Figure 37: Evolution de l'indice de consommation.	73
Figure 38 : Evolution du taux de glycémie.	75
Figure 39 : Evolution du taux de cholestérol.	76
Figure 40 : Evolution du taux de triglycérides	76
Figure 41: Mécanisme de réduction du cholestérol de micro-organisme probiotique.	80
Figure 42: Mécanisme des effets hypolipémiants de probiotiques.	82
Figure 43 : Aspect des foies et des cœurs.	85
Figure 44: une anomalie au niveau de foie du rat témoin.	85

## Liste des tableaux

---

Tableau 01 : Le microbiote intestinal humain.	08
Tableau 02 : Effets positifs des probiotiques sur la santé (effets probables ou suspectés).	13
Tableau 03 : Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques.	16
Tableau 04 : exemple de composée prébiotiques commercialisés.	21
Tableau 05 : rôle des organes dans le métabolisme du cholestérol.	26
Tableau 05 : Genres, espèces et sources d'isolement des bactéries lactiques utilisées.	35
Tableau 07 : Les codes et les origines des entérobactéries utilisées.	36
Tableau 08 : Antibiotiques utilisés, leur famille et leur mode d'action.	37
Tableau 09: Les trois régimes donnés aux rates.	47
Tableau 10 : Comportement des souches vis à vis de divers antibiotiques.	56
Tableau 11 : Activité antibactérienne des bactéries lactiques sur les entérobactéries	59
Tableau 12: croissance des bactéries lactiques en présence des sels biliaires	63
Tableau 13: Croissance des bactéries lactiques en milieu acide.	65
Tableau 14 : diamètres des colonies sur le milieu MRS en présence et en absence des FOS.	67
Tableau 15 : Traitement des résultats d'identification de la souche NSC A1 en utilisant le logiciel apiweb.	69
Tableau 16 : Poids des quelques organes internes.	83

**Antibiotique:** ces médicaments sont destinés à éliminer de l'organisme des bactéries pathogènes. Mais ils peuvent aussi détruire une partie des "bonnes bactéries" constituant la flore intestinale, et ainsi entraîner des troubles digestifs (diarrhée notamment). Lorsqu'on prend ce type de traitement, il est conseillé de consommer des probiotiques (aliments en contenant naturellement, comme les yaourts, et/ou supplémentation) pour prévenir l'apparition de ces troubles.

**-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.

**Betabacterium :** un genre ou sous-genre de lactobacilles hétérofermentaires.

**Bifidobactérie:** ce genre de bactéries se trouve dans l'intestin humain. Les espèces sont nombreuses: *bifidobacterium* (ou *bifidus*) *animalis*, *breve*, *lactis*, *longum*... Certaines bifidobactéries, qui ont des effets positifs démontrés scientifiquement sur le transit intestinal, peuvent être qualifiées de probiotiques.

**Cholestérol :** le cholestérol est un lipide appartenant à la famille des stérols, spécifiquement retrouvé chez les animaux.

**chylomicrons :** sont des lipoprotéines qui se forment en période de digestion. Elles sont responsables du transport des lipides de l'intestin grêle vers les tissus adipeux périphériques où ils sont retraités.

**Cytokine:** du grec kutos, cellule, et kinéo, stimuler, ce mot récent désigne des peptides ou protéines non anticorps sécrétés par les cellules du système immunitaire essentiellement mais aussi par d'autres cellules (épithéliales, endothéliales, mésenchymateuses) qui agissent comme des messagers ou médiateurs intercellulaires et ont une activité modulatrice sur le système immunitaire. Elles agissent généralement localement de manière paracrine ou autocrine plutôt qu'endocrine. Elles interviennent dans l'infection, l'inflammation, l'immunité, la croissance des cellules.

**Dominante (flore dominante) :** se dit des bactéries les plus représentées dans la flore d'un écosystème. Dans le côlon (ou les selles) on retient par définition des concentrations supérieures ou égales à  $10^8$ .g-1 de selles ou supérieures à 1% de la flore totale.

**Dysbiose :** Le terme dysbiose désigne le déséquilibre de l'écosystème bactérien présent dans et sur le corps humain, aussi appelé microbiote..

**Ecosystème intestinal :** 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...).

**Espèces** : Ensemble d'individus animaux ou végétaux, vivants ou fossiles, à la fois semblables par leurs formes adultes et embryonnaires et par leur génotype, vivant au contact les uns des autres, s'accouplant exclusivement les uns aux autres et demeurant indéfiniment féconds entre eux.

**Ferment lactique**: ce sont les micro-organismes employés pour fabriquer les laits fermentés. Ils induisent la transformation d'une partie du lactose du lait (sucre spécifique du lait) en acide lactique. Tous les ferments lactiques ne sont pas des probiotiques.

**Fermentation intestinale**: la flore intestinale, également appelée microbiote, fermente (digère) les résidus d'aliments et autres composés présents dans le côlon (certaines fibres par exemple), grâce à ses propres enzymes. La fermentation intestinale influence le transit intestinal.

**FOS (Fructo-oligosaccharides)** ou oligofructosides: chaînes de fructose terminées (ou pas systématiquement, dans le cas des oligofructosides dérivés de l'inuline) par une unité glucose. En anglais : Fructo-oligosaccharides et oligofructose.

**Genre bactérien**: correspond à une entité bien définissable, clairement séparée des autres genres. La définition complète des genres est donnée dans le Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Il n'y a cependant pas de consensus total sur cette définition du genre et là encore des redéfinitions sont occasionnellement proposées. Par analogie aux critères génétiques ci-dessus, les espèces d'un même genre ont des génomes dont le degré de similarité va de 30 à 70%. Pour la classification, une espèce type fait référence pour chaque genre bactérien. Par convention, le nom d'espèce s'écrit en minuscules toujours associé au nom de genre correspondant portant une majuscule. Ces noms latins s'écrivent en italiques et le nom de genre peut être abrégé par la majuscule initiale. Ainsi, par exemple, dans l'appellation *Bacteroides fragilis*, Bacteroides est le nom de genre et fragilis le nom d'espèce. *B. fragilis* est l'espèce type du genre Bacteroides. Des propriétés pathologiques ou au contraire des effets santé sont attribuables à une souche et l'extension à l'espèce doit être considérée comme hasardeuse.

**Hétérofermentaire** : le métabolisme des bactéries homofermentaires peut se diversifier vers un métabolisme appelé mixte, avec production, en plus du lactate, de formiate, de CO<sub>2</sub>, d'acétate et d'éthanol [Cocaign-Bousquet et al., 1996].

hétérolactique : glucose → lactate + éthanol ou acétate + CO<sub>2</sub>

**Homofermentaire** : La voie homofermentaire emprunte la glycolyse dans sa totalité (du glucose-6-P jusqu'au pyruvate) et conduit en condition optimale de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose [Thompson and Gentry-Weeks, 1994].

homolactique : glucose → lactate.



**Infections :** Une infection désigne l'envahissement puis la multiplication de microorganismes au sein d'un organe du corps vivant.

**Inflammation chronique :** Inflammation prolongée (semaines, mois), mise en jeu défense spécifique > non spécifique, coexistence événements différents réaction inflammatoire active destruction tissulaire cicatrisation.

**Lactobacille:** le lactobacille, ou *lactobacillus*, fait partie des bactéries lactiques. Le *lactobacillus bulgaricus* est le lactobacillus de référence du yaourt. D'autres espèces *-casei*, *plantarum*, *rhamnosus*, etc..., pour certaines présentes dans des laits fermentés, sont aussi des probiotiques. Selon les cas, ils aident à prévenir les allergies ou à corriger certains désordres digestifs.

**Lait :** Le lait est un aliment de couleur blanchâtre produit par les cellules sécrétrices des glandes mammaires des mammifères femelles. Le lait sécrété dans les premiers jours après la parturition s'appelle le colostrum. Quelle que soit l'espèce, la fonction première du lait est de nourrir la progéniture jusqu'à ce qu'elle soit sevrée (Vilain, 2010).

**Maladie de Crohn :** cette maladie se caractérise par une inflammation chronique de la muqueuse intestinale, évoluant par poussées. Cette inflammation pourrait être liée à une réponse anormale du système immunitaire face à certains composants de la flore intestinale. Des études sont en cours sur l'intérêt de certains probiotiques dans le traitement de ces maladies.

**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 côlon, ou gros intestin. La colonisation du tube digestif commence dès la naissance. Le microbiote contribue notamment aux défenses immunitaires et au transit intestinal.

**Muqueuse intestinale:** elle couvre toute la paroi du tube digestif et présente des capacités remarquables de filtre (absorption de certains nutriments) sur une immense surface d'échanges entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme.

**Prébiotique:** substance fermentescible qui possède un effet bénéfique sur la flore intestinale. Il s'agit de certains glucides (fructo-oligo-saccharides...), ou de certaines fibres (inuline,...), qui représentent une source d'énergie pour le microbiote. Les prébiotiques peuvent être des constituants naturels de certains aliments ou additionnés à certains produits.

**Probiotique:** La Food and Agriculture Organization des Nations Unies et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ont établi des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et formulé la définition : « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte » (document CX/NFSDU 02/2, juillet 2002).

**Sel biliaire :** Les sels biliaires (également connu sous le nom de acides biliaires) sont formés par des dérivés du cholestérol et par des stéroïdes acides sécrétés par le foie et se trouvant principalement dans la bile de mammifères.

**Souche:** les bactéries sont classées en grandes familles appelées genres, comme les bifidobactéries et les lactobacilles. Chaque genre comprend plusieurs espèces, par exemple,

*lactobacillus bulgaricus* et *lactobacillus rhamnosus*. Pour chaque espèce, il existe différentes souches caractérisées par un nom de code ou une marque. Deux souches de la même espèce n'ont pas forcément les mêmes effets, bénéfiques ou non. Toute nouvelle souche doit faire l'objet d'études pour être qualifiée de probiotique.

**Streptobacterium :** streptocoques + bactérie. Une supposée variété de bactérie, composé en réalité de plusieurs bactéries liées ensemble sous la forme d'une chaîne

**Symbiotique :** un symbiotique est défini comme un produit qui contient à la fois un (des) probiotique(s) et un (des) prébiotique(s).

**Système immunitaire :** le système immunitaire correspond à l'ensemble des mécanismes de défenses de l'organisme. Il en existe deux types : innée et acquise. On appelle réponse immunitaire le déclenchement du système immunitaire face à une maladie.

**Thermobacterium :** ou les bactéries thermophiles peuvent vivre à des températures élevées (45°C jusque dans des sources thermales).

**Tractus gastro-intestinal :** Le tractus gastro-intestinal, ou GI, est une voie de passage qui débute aux lèvres et se termine à l'anus. Il a pour fonction le transport et la digestion des aliments. Ses caractères spécifiques changent au cours de son trajet parce qu'il est appelé à jouer un rôle différent selon l'endroit où il se trouve dans l'organisme.

**VLDL :** (Very Low Density Lipoprotein, lipoprotéines de très basse densité) sont des lipoprotéines responsables du transfert des lipides endogènes de leur lieu de synthèse, le foie, vers les tissus.

**Yaourt:** le yaourt est un lait fermenté élaboré avec deux micro-organismes spécifiques : *lactobacillus bulgaricus* et *streptococcus thermophilus*, encore vivants dans le produit fini. Ces ferments, qui permettent de digérer le lactose (sucre du lait), comptent parmi les probiotiques. Le yaourt peut être consommé par les personnes intolérantes au lactose. Il est recommandé par l'OMS en cas de diarrhée.

<p><b>ADN</b> : Acide Désoxyribonucléique</p> <p><b>AG</b> : Acide gras</p> <p><b>ATP</b> : Adénosine triphosphate</p> <p><b>BAL</b> : bactérie lactique</p> <p><b>BSH</b> : Bile Salt Hydrolase</p> <p><b>°C</b> : degré Celsius.</p> <p><b>cfu</b> : colony- forming- unit</p> <p><b>cm</b> : centimètre.</p> <p><b>cm<sup>3</sup></b> : centimètre cube</p> <p><b>CO<sub>2</sub></b> : Dioxyde de carbone</p> <p><b>dm<sup>3</sup></b> : décimètre cube.</p> <p><b>DO</b> : densité optique.</p> <p><b>E</b>: <i>Escherichia</i></p> <p><b>EC</b> : commission des enzymes</p> <p><b>FAO</b>: Food and Agriculture Organization</p> <p><b>FOS</b> : fructooligosaccharides</p> <p><b>g</b> : gramme</p> <p><b>G</b>: Grossissement</p> <p><b>G+C</b>: Guanine+Cytosine.</p> <p><b>GOD</b> : glucose oxydase</p> <p><b>GOS</b> : glucooligosaccharides Bioecolia</p> <p><b>GPM</b> : Gains de poids moyens</p> <p><b>h</b> : Heure</p> <p><b>H<sub>2</sub>O</b> : formule chimique de la molécule d'eau</p> <p><b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> : peroxyde d'hydrogène.</p> <p><b>IC</b> : indice de consommation.</p> <p><b>IgA</b>: Immunoglobuline A</p> <p><b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> : potassium hydrogène phosphate</p> <p><b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> : mono potassium phosphate</p> <p><b>l</b> : litre.</p> <p><b>LB</b> : lysogenic broth</p> <p><b>mg</b> : milligramme.</p> <p><b>MgSO<sub>4</sub></b> : magnésium sulfate</p> <p><b>min</b> : Minute</p>	<p><b>ml</b> : millilitre.</p> <p><b>mm</b> : millimètre</p> <p><b>MnSO<sub>4</sub></b> : Manganèse Sulfate monohydrate</p> <p><b>MRS</b> : milieu de Man, Rogosa and Sharpe (1960)</p> <p><b>N</b> : Nombre.</p> <p><b>NaCl</b> : Chlorure de sodium.</p> <p><b>nm</b> : Nanomètre</p> <p><b>O<sub>2</sub></b> : Oxygène</p> <p><b>OMS</b> : l'Organisation Mondiale pour la Santé</p> <p><b>ONU</b> : l'Organisation des Nations Unies pour l'agriculture et l'alimentation</p> <p><b>p</b> : page.</p> <p><b>pH</b> : potentiel d'hydrogène.</p> <p><b>qsp</b> : quantité suffisante pour.</p> <p><b>R</b> : résistant.</p> <p><b>S</b> : sensible.</p> <p><b>S</b> : semaine</p> <p><b>T</b> : temps.</p> <p><b>TG</b> : triglycéride</p> <p><b>tr</b> : tour</p> <p><b>U</b> : Unité</p> <p><b>UI</b> : Unité Internationale</p> <p><b>WHO</b> : World Health Organization</p> <p><b>µg</b> : microgramme</p> <p><b>µm</b> : micromètre</p> <p><b>λ</b> : longueur d'onde</p> <p><b>&lt;</b> : Inférieur</p> <p><b>&gt;</b> : Supérieur</p> <p><b>+/-</b> : intermédiaire</p> <p><b>%</b>: pour cent.</p>
---	--

# 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.

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 jouent la microflore intestinale dans le maintien et l'amélioration de la santé.

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 «**Probiotiques** ». 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 montré 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, la réduction du taux de cholestérol sanguin... etc.

Les microorganismes probiotiques sélectionnés en alimentation humaine sont représentés essentiellement par les bactéries lactiques, particulièrement celles appartenant au genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Aujourd'hui, ces deux genres bactériens sont largement utilisés dans la fabrication de produits laitiers fermentés.

Cependant, l'effet probiotique des bactéries lactiques dépend de leur taux de survie non seulement dans les aliments mais également dans le tractus gastro-intestinal (Shah, 2000; Marteau et al., 2003. ,Gagnon et al., 2004).

La présente étude fait partie d'une série de recherche dont l'objectif à terme est de tester l'effet probiotiques d'un ensemble de bactéries lactiques comprenant des lactobacilles et des bifidobactéries sur plusieurs lots de rats Wistar.

Ce mémoire s'articule en deux parties :

## ***Introduction***

---

Une première partie, *in vitro*, comprenant un ensemble de testes consistant à démontrer la résistance et la viabilité des microorganismes aux différentes conditions hostiles rencontrées le long du tractus gastro-intestinal, notamment les sels biliaires, l'acidité, les antibiotiques consommés, au cours de cette partie nous avons testé le pouvoir antagoniste de chaque souche vis-à-vis de bactéries pathogènes et de tester leur aptitudes à dégrader les lipides.

Une deuxième partie, *in vivo*, nous permet d'évaluer l'impact de la consommation de la souche sélectionnée sur les paramètres lipidiques et glycémiques du rat Wistar et sur ses paramètres de croissance.

Enfin une identification de la souche probiotique a été réalisée en utilisant les galeries biochimiques API 50CHL.

# Etude bibliographique

## **1.1 Bactéries lactiques**

### **1.1.1 Présentation des bactéries lactiques**

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XX<sup>e</sup> siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique.

Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation est dite: homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO<sub>2</sub> ...etc.) (Leveau et Bouix, 1993; Pilet et *al.*, 2005).

Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négatives, oxydase négatives généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et *al.*, 1994; Hogg, 2005).

### **1.1.2 Habitat et origine des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des alimentsensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Leveau et Bouix, 1993; Hassan et Frank, 2001).

### **1.1.3 Taxonomie des bactéries lactiques**

Depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008).

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique /biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en



acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme, 1996; Stiles et Holzopfel, 1997; Ho et *al.*, 2007).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classifier les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins et *al.*, 1993; Ho et *al.*, 2007).

A ce groupe de bactéries lactiques, appartient plusieurs genres comme *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. (Stiles et Holzopfel, 1997; Pot, 2008). Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupe des bactéries lactiques (Broadbent, 2001; Axelsson, 2004).

### **1.1.4 Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques**

#### **1.1.4.1 Le genre *Lactobacillus***

*Lactobacillus* est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990; Leclerc et *al.*, 1994).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (Tamime, 2002; Guiraud et Rosec, 2004) :

- **Groupe I «*Thermobacterium*»:** comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.
- **Groupe II «*Streptobacterium*»:** regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*.

- **Groupe III «*Betabacterium*»:** ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb.fermentum*, *Lb.brevis* et *Lb.sanfransisco*.

### **1.1.4.2 Le genre *Bifidobacterium***

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G+C. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson et al., 2004; Pilet et al., 2005; Ho et al., 2007).

### **1.1-5 Intérêts des bactéries lactiques**

- **En alimentation**

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, dont les vertus se ressemblent, et qui produisent de l'acide lactique comme produit final du processus de fermentation. Elles sont partout dans la nature, et se trouvent aussi dans le système digestif de l'homme. Si elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons et des viandes et elles améliorent aussi la conservation des aliments et agissent sur les textures et les saveurs qui se révèlent différentes de celles de l'aliment à son état originel (Euzeby, 2000a). C'est l'acide lactique qui donne aux laitages fermentés cette saveur légèrement aigrelette caractéristique. D'autres sous-produits des bactéries lactiques donnent saveurs et arômes supplémentaires. Par exemple, l'acétaldéhyde donne au yaourt son arôme si caractéristique ; le diacétyl donne une saveur crémeuse à d'autres laitages fermentés.

- **Comme probiotiques**

Aujourd'hui, les «bons amis » probiotiques sont utilisés aussi dans un grand choix de laitages fermentés qui vont du kéfir (boisson liquide) jusqu'au yaourt (plus consistant).

Le yaourt et d'autres laitages fermentés nous donnent l'occasion de nous servir des bactéries lactiques comme de cultures probiotiques.

Les cultures probiotiques favorisent le bon fonctionnement de notre flore intestinale. Le marché mondial de ces produits se développe de plus en plus, pour répondre aux besoins d'un public de plus en plus à l'écoute de sa forme et de sa santé.

Les bactéries lactiques se comportent donc comme d'excellents ambassadeurs d'un monde microbien souvent calomnié. Elles ne se réduisent pas à leur importance économique, mais jouent un rôle important dans l'entretien et l'amélioration de la santé de l'homme. (Fuller, 1989).

### **1.2. Microflore intestinale**

#### **1.2.1 Microflore intestinale**

Selon la définition d'Isolauri et *al.*,(2002), la flore intestinale normale est une collection complexe et en équilibre de microorganismes qui habitent normalement le tractus gastro-intestinal et remplissant un rôle dans la nutrition, la physiologie et le contrôle du système immunitaire de l'hôte.

Après une colonisation complète, la microflore intestinale est considérée comme un organe acquis après la naissance. Il est constitué d'une grande diversité d'espèces microbiennes assurant différentes fonctions pour l'hôte. La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée à près de  $10^{13}$  - $10^{14}$  cellules microbiennes représentant 400 à 500 espèces et sous espèces. Cette microflore représente environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain (Moore et *al.*,1974; Bjorksten, 2004).

#### **1.2.2 Fonction du microbiote intestinal**

La microflore intestinale exerce de nombreuses fonctions physiologiques dont les répercussions sur l'hôte sont, pour la plupart, bénéfiques. Parmi les grandes fonctions du microbiote est sa capacité à convertir une grande variété de substrats (incluant glucides, protéines et lipides) en substances nutritives. Ces substances génèrent une diversité d'effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, sur la fermentation des substrats disponibles au niveau du côlon (Gérard and Bernalier-Donadille 2007) et sur le développement d'une barrière microbiologique contre la colonisation par les microorganismes pathogènes. La microflore permet également le développement et la maturation du système immunitaire intestinal. Cette microflore interagit avec les cellules épithéliales pour le maintien de la santé de l'hôte (Gérard and Bernalier-Donadille 2007).

La microflore intestinale doit ainsi être considérée dans son contexte environnemental, incluant l'hôte et l'aliment. Les interactions entre ces différents constituants assurent l'homéostasie de l'écosystème microbien digestif. Toute rupture de l'équilibre entre ces constituants est susceptible de

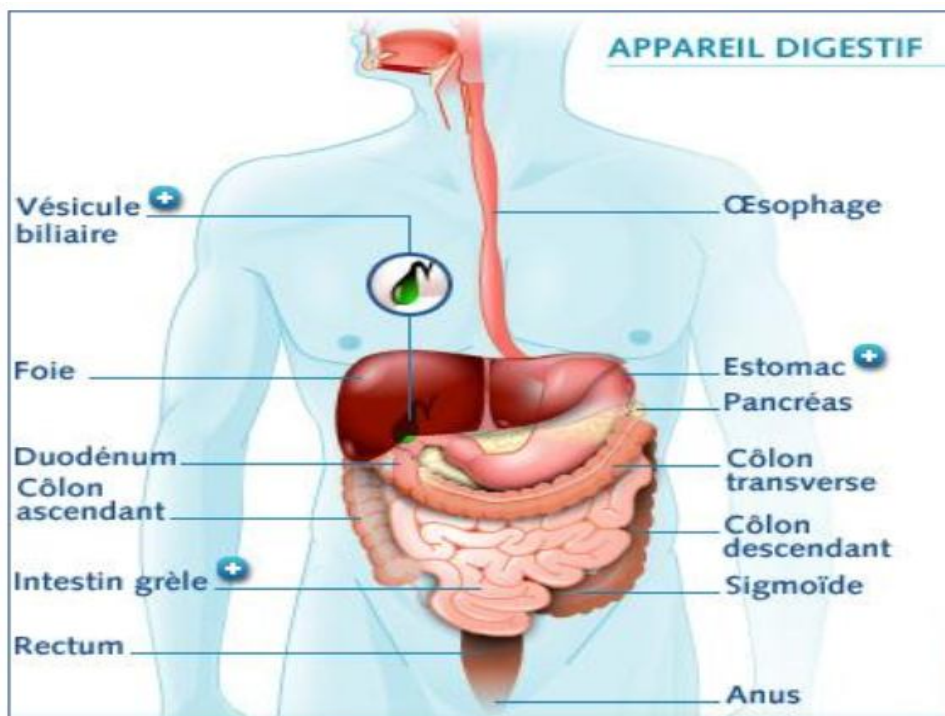
## Synthèse bibliographique

perturber le fonctionnement de l'écosystème et d'être à l'origine de pathologies digestives (fonctionnelles, inflammatoires, infectieuses, etc) (Patterson and Burkholder 2003).

Le microbiote intestinal humain. Le microbiote intestinal forme un écosystème Diversifié et dynamique incluant des bactéries, qui se sont adaptées à vivre sur la surface de la muqueuse intestinale ou dans l'intestin humain.

**Tableau 01** : Le microbiote intestinal humain.

Segment intestinal	Quantité de germes hébergés
<b>Estomac et duodénum</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hébergent de très petites quantités de micro-organismes <math>&lt;10^3</math> de cellules bactériennes par gramme de contenu</li><li>• Surtout des lactobacilles et des streptocoques</li><li>• L'acide, la bile et les sécrétions pancréatiques suppriment la plupart des microbes ingérés</li><li>• L'activité motrice phasique propulsive empêche une colonisation stable dans la lumière</li></ul>
<b>Jéjunum et iléon</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Le nombre de bactéries augmente progressivement d'environ <math>10^4</math> cellules dans le jéjunum à <math>10^7</math> cellules par gramme de contenu dans l'iléon terminal</li></ul>
<b>Gros intestin</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Forte population d'anaérobies : <math>10^{12}</math> cellules par gramme de contenu luminal</li></ul>



**Figure 01** : Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'Homme

(Ouwehand et Vesterlund, 2003).

## **1.2.3 Les facteurs majeurs influençant la microflore gastro-intestinale**

La composition et les fonctions de la microflore du tractus gastro-intestinal sont influencées par divers facteurs liés au changement des conditions physiologiques de l'hôte (âge, état de santé,...), de la composition du régime alimentaire et des circonstances environnementales (contamination par les pathogènes, antibiothérapie, chimiothérapie, climat, stress, hygiène ...) (Mitsuoka, 1989; Hopkins et *al.*, 2002). Ainsi, naissance prématurée et accouchement par césarienne représentent les premiers risques de dysbiose. Le lait maternisé favorise l'implantation d'une plus grande diversité bactérienne mais moins protectrice. L'absence d'allaitement représente donc un deuxième risque de dysbiose.

Ces divers facteurs peuvent perturber l'équilibre de l'écosystème intestinal en favorisant des espèces particulières par rapport à d'autres.

Dans certains cas, ce déséquilibre peut être très favorable à la prolifération de microorganismes opportunistes pathogènes pouvant compromettre la santé et le bien-être de l'hôte. Il serait donc impératif de rechercher des solutions alternatives permettant la restauration de l'équilibre de la microflore intestinale de l'hôte. L'utilisation des probiotiques et/ou des prébiotiques (préparations microbiennes ou à base de certaines substances) s'est avérée une alternative prometteuse.

## **1.3 Les probiotiques /prébiotiques / symbiotiques**

### **1.3.1 Les probiotiques**

La notion de " probiotiques " a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff (1907) qui avait constaté que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits 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 Stillwell (1965) pour décrire des substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes. Depuis, plusieurs définitions ont été données aux probiotiques dépendamment de leurs effets sur la santé. Selon Parker (1974), « probiotiques » désigne les microorganismes et les substances qui 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 vivants administrés en quantités adéquates et qui sont bénéfiques pour la santé de l'hôte ».

De façon plus spécifique, pour qu'un organisme soit considéré comme étant Potentiellement probiotique il doit présenter **les caractéristiques** suivantes:

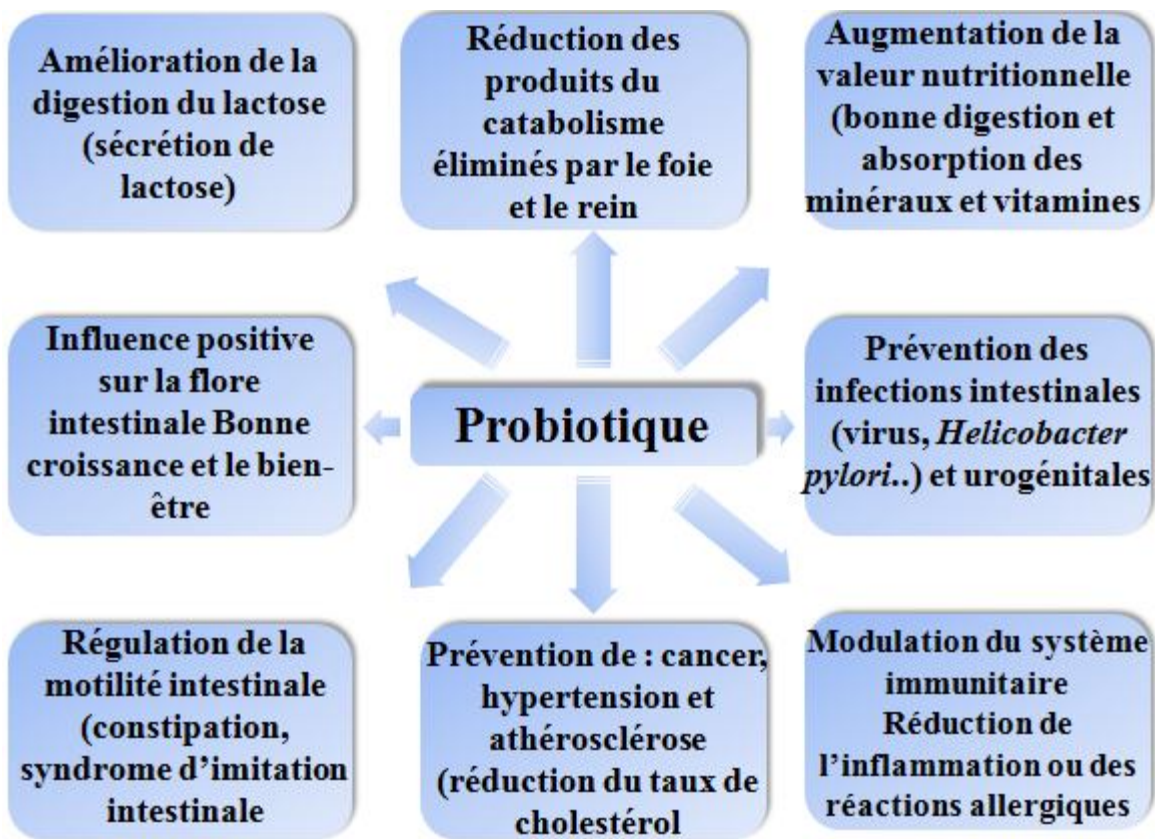
- Etre un habitant naturel de l'intestin,
- Etre capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier
- Adhérer aux cellules intestinales et exclue ou réduit l'adhérence des pathogènes
- Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bactériocines...).
- Non invasif, non carcinogène et non pathogène.
- Etre capable de co-agréger pour former une flore normale équilibrée.
- Survivre aux différents procédés technologiques de production.
- Garder sa viabilité dans l'aliment et durant le transit intestinal (Salminen et *al.*, 1996, Tannock, 1999a,b; Stanton et *al.*, 2001).

Dans toutes les définitions prononcées, la notion de viabilité apparaît comme un Critère de sélection important. Cependant, cette notion demeure très controversée puisque des études récentes, ont clairement démontré que même les souches non viables de pro biotiques sont capables d'exercer certains effets positifs sur la santé entre autres la stimulation de certaines fonctions immunitaires, l'inhibition de l'adhésion et l'invasion de certains pathogènes (Coconier et *al.*, 1993; Ouwehand et *al.*, 1999).

Ceci laisserait donc envisager une éventuelle redéfinition des probiotiques où la notion de viabilité sera à reconsidérer.

### 1.3.1.1 Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques. La Figure 02 illustre la diversité des effets bénéfiques sur la santé.



**Figure 02** : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques. Adapté de Merceneir et *al.*, (2002).

Il est à noter que la validité scientifique de ces effets bénéfiques est très variable.

Cependant, des études doivent encore être réalisées afin de confirmer certains bienfaits. Ces effets sont décrits dans le Tableau 02 et expliqués ci-dessous.

**Tableau 02** : Effets positifs des probiotiques sur la santé (effets probables ou suspectés).

EVIDENCES SCIENTIFIQUES FORTES	
EFFETS DES PROBIOTIQUES	MECANISMES DES PROBIOTIQUES
aide à la digestion du lactose	▪ Action de la $\beta$ -galactosidase bactérienne
Réduction du risque des diarrhées	▪ Activité antipathogène ▪ Stimulation du système immunitaire
Diminution des allergies alimentaires	▪ Amélioration de la fonction barrière de muqueuse ▪ Stimulation du système immunitaire ▪ Dégradation des protéines allergène
EVIDENCES SCIENTIFIQUES PROMETTEUSES	
Activité hypocholestérolémiant	▪ Assimilation du cholestérol ▪ Dégradation des sels biliaires
Prévention du cancer du côlon	▪ Dégradation de carcinogènes ▪ Production de composés antimutagéniques ▪ Modulation des enzymes fécales carcinogéniques ▪ Stimulation du système immunitaire
Diminution des infections à <i>Helicobacter pylori</i>	▪ Activité antipatogène
Effet antihypertenseur	▪ Action des peptidases sur les protéines du lait donnant des peptides bioactifs

[ adapté de : Sanders and Huis in't, 1999 ; Playne and Salminen, 2002 ; Gueimonde and Salminen, 2003].

Des études ont montré de réels effets positifs :

- Les personnes présentant une faible ou inexistante activité de la lactase intestinale ne peuvent digérer le lactose du lait. L'activité  $\beta$ -galactosidase présente chez certaines bactéries lactiques, assure l'hydrolyse du lactose dans les produits fermentés qui sont donc mieux tolérés que le lait. Montes et *al.* en 1995 ont montré que chez 10 enfants ne digérant pas le lactose et ayant ingéré 250 ml de lait contenant  $10^{10}$  cellules de *Lb. Acidophilus* NCFM, les symptômes de maldigestion ont fortement diminué de suite après l'ingestion par rapport à 10 autres enfants ayant consommé du lait.
- Beaucoup de diarrhées sont dues à des infections microbiennes. Par leur pouvoir antimicrobien et/ou par leur effet immunostimulant, les probiotiques peuvent diminuer la sévérité et la durée de certaines diarrhées. D'après une étude de Siitonen et *al.* en 1990, sur 16 volontaires sains



traités à l'antibiotique érythromycine pendant 1 semaine, les 8 ayant consommé quotidiennement, en parallèle du traitement, 125 ml de lait fermenté enrichi en *Lb. Rhamnosus* GG ont eu une diarrhée de 2 jours alors que les autres ayant consommé du yaourt placebo l'ont eu pendant 8 jours.

- Depuis une vingtaine d'années, les allergies ont fortement augmenté dans les pays industrialisés surtout chez les enfants présentant des dermatites atopiques. Les probiotiques peuvent contrôler ces allergies via notamment leur pouvoir immunostimulant. Isolauri et al. en 2000 ont montré que sur 27 enfants eczémateux répartis en 2 groupes, ceux ayant consommé *Bf. Lactis* Bb12 comme complément alimentaire à la dose de  $5 \cdot 10^8$  cellules par jour ont vu les symptômes disparaître après 2 mois alors que les autres du groupe placebo ont vu leur eczéma perdurer.

-Des études tendent à démontrer d'autres effets positifs des probiotiques dont les mécanismes doivent encore être étudiés :

- Taranto et al. en 1998 ont mis en évidence l'effet hypocholestérolémiant de *Lb. Reuteri* CRL1098 consommé à  $10^4$  cellules par jour pendant 7 jours par des souris hypercholestérolémiques dont la teneur totale en cholestérol a diminué de près de 40% à la fin du traitement.

- Une étude de Spanhaak et al. en 1998 a montré l'influence de l'administration de  $10^9$  cellules de *Lb. Casei* Shirota par mL de lait fermenté à hauteur de 100 ml 3 fois par jour pendant 4 semaines, sur les activités d'enzymes réputées carcinogéniques de l'hôte. Les 10 sujets ayant consommé cette souche ont vu leurs activités glucuronidase

et  $\beta$ -glucosidase des prélèvements fécaux diminuer au bout de 2 semaines de traitement par rapport aux 10 sujets placebo.

- Malin et al. en 1996 ont évalué l'activité immunostimulante en dosant la sécrétion d'IgA chez 14 jeunes patients souffrant de la maladie de Crohn. L'ingestion de  $10^{10}$  cellules de *Lb. Rhamnosus* GG 2 fois par jour pendant 10 jours a stimulé la sécrétion d'immunoglobuline IgA (anticorps de l'immunité humorale), améliorant la barrière immunologique de l'intestin qui avait été affaiblie par la maladie.

- Lors d'une étude de Wang et al. en 2004, 59 adultes présentant une gastrite à *H. pylori* ont consommé du lait fermenté contenant  $10^7$  cellules de *Lb. Acidophilus* La5 et *Bf. Lactis* Bb12 par ml 2 fois par jour en traitement post-prandial pendant 6 semaines. A la suite de ce régime, les auteurs ont noté une forte diminution de l'activité d' *H. pylori*.

## 1.3.1.2 Critères de sélection

Afin de satisfaire à la définition des probiotiques, les microorganismes doivent survivre, être actifs et persister temporairement dans le tractus digestif. Ils doivent aussi posséder des effets positifs pour l'hôte. Or, toutes ces propriétés sont propres à chaque souche et ne peuvent être extrapolées à une autre souche de la même espèce [AFSSA, 2003]. Les microorganismes potentiellement probiotiques doivent donc être sélectionnés selon différents critères décrits dans le tableau 03.

**Tableau 03** : Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques.

CRITERES DE SECURITE	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Identification taxonomique précise</li> <li>▪ Origine humaine pour utilisation chez l'humain</li> <li>▪ Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques</li> <li>▪ Historique de non pathogénicité et non-invasion de l'épithélium intestinal</li> <li>▪ Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques</li> </ul>
CRITERES FONCTIONNELS	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tolérance à l'acidité, à la bile et aux enzymes digestives</li> <li>▪ Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus intestinal</li> <li>▪ Production de substances antimicrobiennes (bactériocines, acides organiques, peroxyde d'hydrogène ou autres composés inhibiteurs) et antagonisme envers les pathogènes</li> <li>▪ Immunomodulation</li> <li>▪ Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé</li> </ul>
CRITERES TECHNOLOGIQUES	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini</li> <li>▪ Conservation des propriétés probiotiques après production</li> <li>▪ Non modification des propriétés organoleptiques du produit fini</li> </ul>

[Adapté de Klaenhammer et Kullen (1999) ; Saarela *et al.*, (2000) ; Ouwehand *et al.*, (2002) ; Gueimonde et Salminen (2006).]

Selon le rapport de la FAO/WHO (2002), pour qu'un produit soit reconnu comme étant probiotique, une évaluation du produit basée sur plusieurs critères doit être effectuée suivant les recommandations suivantes :

a) Désignation du Genre/Espèce/Souche : il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée, car les effets probiotiques sont spécifiques à la souche microbienne. Le probiotique doit porter un nom reconnu scientifiquement et son identification doit être effectuée à l'aide de méthodes récentes et valides combinant les tests phénotypiques et génotypiques.

b) Dépistage des probiotiques potentiels par des tests *in vitro* : les tests *in vitro* sont réalisés afin de déterminer les mécanismes par lesquels les microorganismes probiotiques exercent leurs effets

bénéfiques. Il est recommandé d'utiliser des tests spécifiques à la cible et appropriés pouvant corrélérer avec les résultats des essais *in vivo*.

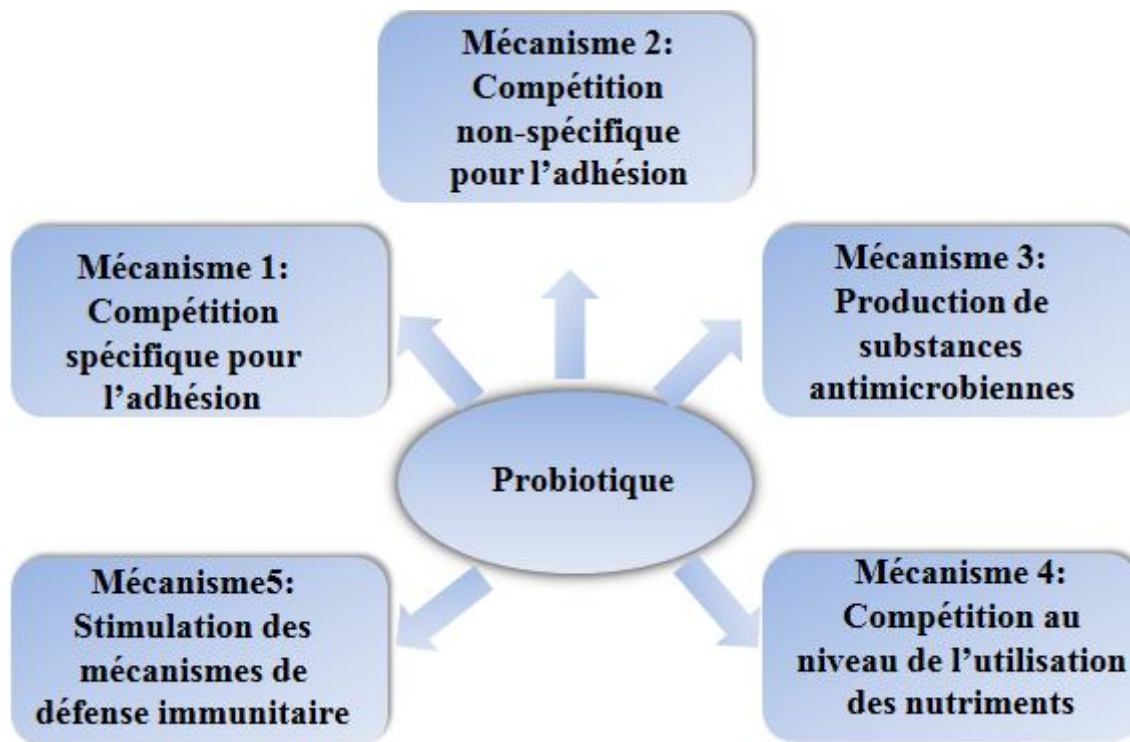
**Les principaux tests in vitro réalisés pour étudier les probiotiques sont :**

- Résistance à l'acidité gastrique
- Résistance aux acides biliaires
- Adhérence au mucus et/ou cellules épithéliales humaines
- Activité antimicrobienne contre les bactéries potentiellement pathogènes
- Capacité de réduire l'adhésion des pathogènes aux surfaces
- Activité de l'hydrolase sur les sels biliaires (dissociation des sels biliaires)
- Résistance aux spermicides (application vaginale des probiotiques)

c) Innocuité de souches probiotiques : les probiotiques utilisés dans les produits alimentaires sont des microorganismes appartenant à la flore normale intestinale.

### **1.3.1.3 Mode d'action des probiotiques**

Depuis longtemps, les consommateurs attribuent au yaourt des bénéfices sur la santé, mais il a fallu attendre les années 1970 pour découvrir progressivement le rôle joué par les bactéries lactiques vivantes du yaourt dans le tube digestif. L'introduction récente sur le marché de grande consommation de laits fermentés à base de bactéries lactiques d'origine entérique (*Bifidobacterium* et *Lactobacillus*) a encore accru l'intérêt d'une catégorie de consommateurs, plus que jamais conscients de l'influence d'une alimentation saine sur la santé (Vermeiren, 2004).



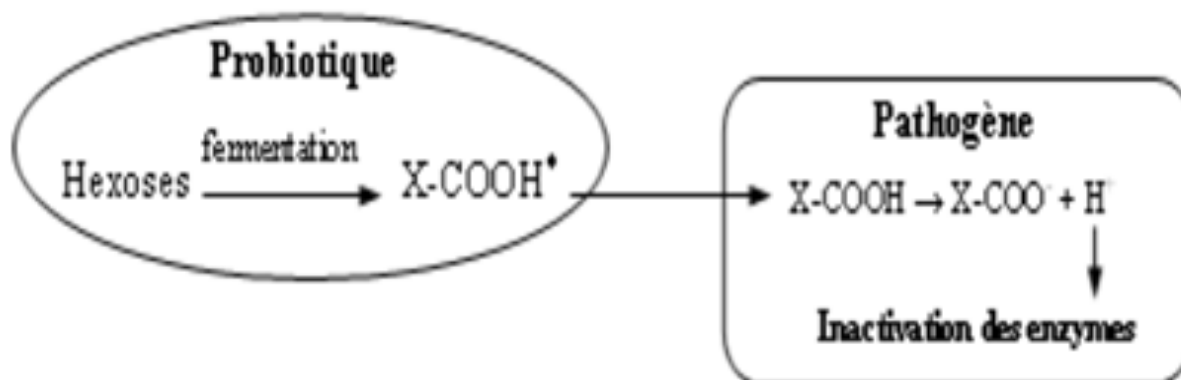
**Figure 03 :** Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le traitement des infections entériques (adapté de Calder et Kew, 2002 ; Kaur et al. ,2002)

De façon générale, l'efficacité des probiotiques est liée à leur durée de présence dans le tube digestif ce qui n'implique pas forcément qu'ils puissent le coloniser ou s'y développer. Les mécanismes d'actions, bien qu'imparfaitement quantifiés sont qualitativement de plus en plus connus (Figure 3). Chez l'animal monogastrique, ils agissent comme des régulateurs de la flore intestinale (Calder et Kew, 2002;Kaur et al., 2002), ils exercent :

- a) Un effet prophylactique (antagonisme contre certains pathogènes par production de substances antimicrobiennes ; compétition avec les pathogènes pour certains nutriments ou pour les récepteurs de la muqueuse intestinale),
- b) Et/ou un effet nutritionnel (augmentation de la digestibilité, production de nutriments favorables),
- c) Et/ou un effet de détoxification (moindre production d'ammoniac, d'amines, ou de cytotoxines).

- **Compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion :**

Étant donné que la majorité des infections intestinales sont initiées par l'adhésion des pathogènes aux cellules entérocytaires de l'hôte, certains 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).



**Figure 04 :** Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhésion spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques. ( Servin et Coconnier,2003)

- **Production de substances antimicrobiennes**

Le troisième mécanisme d'action des probiotiques concerne l'inhibition de la croissance des pathogènes grâce à des composés antimicrobiens. Les bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* d'origine humaine peuvent produire des substances anti-microbiennes, telles que les acides organiques, qui sont actives *in vitro* et *in vivo* contre les micro-organismes entérovirus impliqués dans les cas de diarrhées (Servin, 2004). Les acides lactique et acétique sont produits *via* la fermentation des hexoses par les lactobacilles. Ces acides organiques peuvent diffuser passivement à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée (Fig.05). Ils acidifient le cytoplasme après dissociation et inhibent l'activité enzymatique cellulaire des pathogènes acidosensibles (Deng et al., 1999). Cette diminution du pH peut donc affecter la viabilité des pathogènes bactériens (Bruno et Shah, 2002; Servin, 2004).

\*X-COOH=CH<sub>3</sub>-CHOH-COOH dans le cas de l'acide lactique ou CH<sub>3</sub>COOH dans le cas de l'acide acétique

**Figure 05 :** Mode d'action des acides organiques produits par les probiotiques contre les pathogènes bactériens (Servin et Coconnier, 2003).

- **Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments:**

L'inhibition de la croissance des pathogènes peut également s'effectuer par un processus de restriction des nutriments. Il est évident que la capacité des micro-organismes à entrer en compétition pour limiter les nutriments disponibles est un facteur non négligeable qui détermine la composition du microbiote. Ainsi, une augmentation du nombre de lactobacilles obtenue lors d'un traitement probiotique permettrait de diminuer les substrats disponibles pour l'implantation de micro-organismes pathogènes (Fooks et Gibson, 2002).

### **1.3.2 Les prébiotiques**

Certains composants de la microflore intestinale, particulièrement les bifidobactéries, sont capables de fermenter des substances essentiellement non digestibles (hydrates de carbone) dans le colon grâce à son pouvoir saccharolytique important (Kaplan et *al.*, 2000). Cette propriété permet d'augmenter la croissance ou l'activité des microorganismes spécifiques du tractus gastro-intestinal en influençant positivement la santé de l'hôte. Les effets bénéfiques générés par ces interactions ont permis le développement du nouveau concept « prébiotiques» (Berg, 1998; Kaialaspathy & Chin, 2000).

Le concept de prébiotique a été développé suite aux travaux de Gibson et al. (1995) qui ont mis en évidence une stimulation sélective de la croissance de bifidobactéries dans le colon de sujets ayant ingérés de l'oligofructose et de l'inuline. Ainsi, les prébiotiques ont été définis comme étant des ingrédients alimentaires non digestibles exerçant des effets bénéfiques sur l'hôte en stimulant sélectivement dans le colon la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries capables d'améliorer la santé de l'hôte.

Pour être considéré comme prébiotique, un ingrédient alimentaire doit:

- a- Etre ni hydrolysé ni absorbé dans le tractus gastro-intestinal,
- b- Etre sélectif pour un nombre limité de bactéries endogènes,
- c- Modifier la microflore intestinale en améliorant sa composition,
- d- Induire des effets intestinaux ou systémiques bénéfiques pour la santé de l'hôte (Gibson et *al.*, 1995) .

La majorité des prébiotiques sont des oligosaccharides (enchaînement de 2 à 20 résidus de pentose ou d'hexose) [Delzenne, 2003]. Le Tableau décrit les principaux prébiotiques commercialisés.

Parmi ces prébiotiques, trois types d'oligosaccharides: les fructooligosaccharides Actilight (FOS Actilight) et Raftilose (FOS Raftilose), et les glucooligosaccharides Bioecolia (GOS  $\alpha$ -1,2/ $\alpha$ -1,6/ $\alpha$ -1,4).

**Tableau 04** : exemple de composée prébiotiques commercialisés

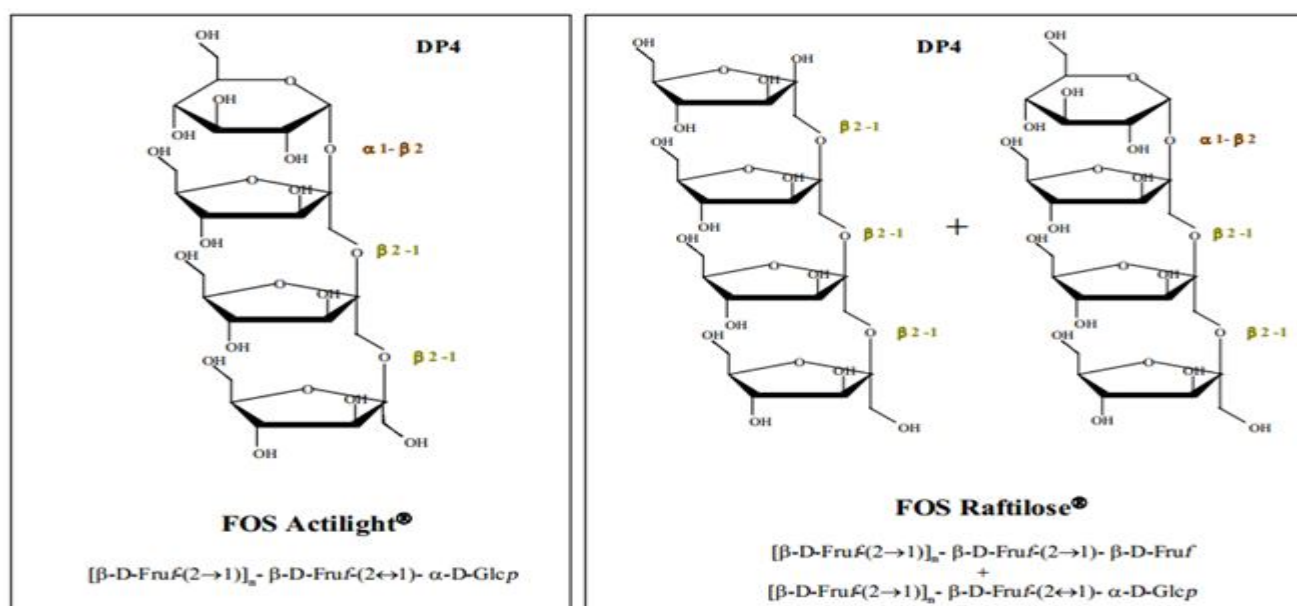
PREBIOTIQUES	NOM	STRUCTURE	FOURNISSEUR
oligofructoses	Raftilose®	Fru-Fru <sub>n</sub> + Glc-Fru <sub>n</sub>	Orafti (Belgique)
fructooligosaccharides	Actilight®	Glc-Fru <sub>n</sub>	Beghin Meiji Industries (France)
galactooligosaccharides	Oligomate®	Glc-Gal <sub>n</sub>	Yakult (Japon)
lactulose	MLS-50®	Gal-Fru	Morinaga (Japon)
oligosaccharides de soja	Soya-Oligo	Gal <sub>n</sub> -Glc-Fru	Calpis (Japon)
isomaltooligosaccharides	IMO 900	Glc <sub>n</sub>	Showa Sangyo (Japon)
glucoooligosaccharides	Bioecolia®	Glc <sub>n</sub>	Solabia (France)
mannooligosaccharides	Bio-MOS®	Man <sub>n</sub>	Alltech Biotechnology (USA)
xylooligosaccharides	Xylo-oligo	Xyl <sub>n</sub>	Suntory (Japon)

(Adapté de : Grizard et Barthomeuf, 1999 ; Franck, 2002)

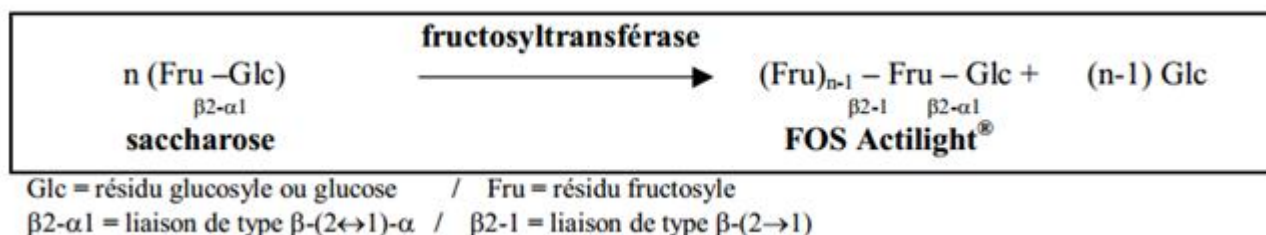
### 1.3.2.1 FOS Actilight et FOS Raftilose

Les FOS Actilight et FOS Raftilose appartiennent à la famille des fructanes. Ce sont des polymères de fructose de longueur variable qui peuvent être dérivés de simples polymères de fructose ou d'éléments de fructose attachés à une molécule de saccharose par liaison  $\beta$ -(2→1). Ils existent à l'état naturel dans un certain nombre de plantes dont l'oignon, la chicorée, l'artichaut, l'ail, le topinambour et l'endive [Grizard and Barthomeuf, 1999 ; Bornet, 2001].

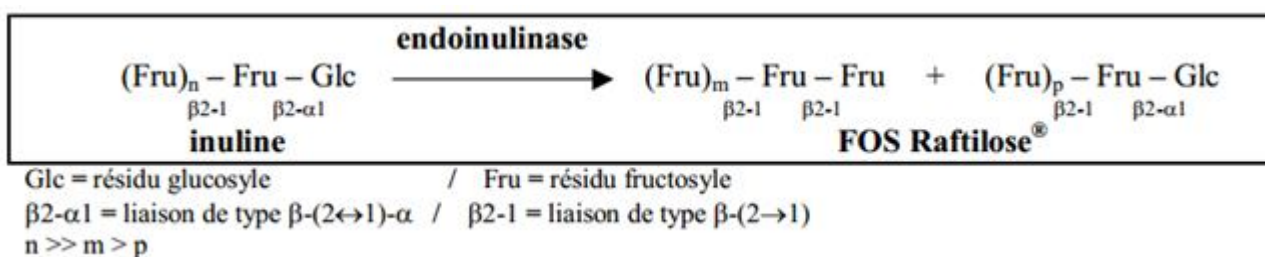
Les structures des deux FOS sont décrites dans la Figure 06 et les voies de synthèse dans les Figures 07-08.



**Figure 06** : structures des FOS Actilight et FOS Raftilose.



**Figure 07** : Réaction de synthèse des FOS Actilight.



**Figure 08** : réaction de synthèse de FOS Raftilose .

### 1.3.3 Les symbiotiques

Un symbiotique est un mélange de probiotiques et de prébiotiques qui affecte positivement l'hôte en améliorant la survie et l'implantation d'espèces microbiennes vivantes apportées sous forme de suppléments alimentaires dans le tractus gastro-intestinal, et, par conséquent, la santé et le bien-être de l'hôte (Isolauri et *al.*, 2002).

Les prébiotiques stimulent sélectivement la croissance des probiotiques. Par exemple, un produit contenant l'oligofructose et une bifidobactérie probiotique est considéré comme un symbiotique. Cependant, lorsque un *Lactobacillus* probiotique est associé à l'oligofructose, la combinaison ne forme pas un symbiotique (Schrezenmeir & Vrese, 2001).

Cette différence serait due au fait que les bifidobactéries produisent une grande quantité de  $\beta$ -fructosidases, enzymes capables de dégrader sélectivement la liaison entre les fructoses présents dans l'oligofructose.

Une étude de Bartosch et *al.*, (2005) réalisée sur un groupe de volontaires âgés (> 62 ans) dont le contenu intestinal en bifidobactéries est fortement réduit par l'âge, a démontré que l'ingestion d'un symbiotique à base de *Bifidobacterium bifidum* BB-02 et *Bifidobacterium lactis* BL-01 (probiotiques) et de l'inuline (prébiotique) a augmenté significativement la taille et la diversité des populations de bifidobactéries dans les matières fécales par rapport au groupe contrôle et groupe placebo.



## **1.3.4 Les principales souches microbiennes à potentiel probiotique**

### **1.3.4.1 Les souches probiotiques utilisées en alimentation humaine et animale**

Les souches ou espèces probiotiques sont des composants normaux de la flore intestinale (Dunne et *al.*, 2001). En alimentation humaine, les genres microbiens les plus utilisés comme probiotiques sont *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (Goldin et Gorbach, 1992; Berg, 1998). Par contre, en alimentation animale de nombreux genres bactériens et fongiques sont utilisés, comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* et *Torulopsis* (Tannock, 1997; Pirkka et *al.*, 1999; Huang et *al.*, 2003).

Il faut noter que les bactéries du genre *Bifidobacterium* sont de plus en plus utilisées dans les produits probiotiques à causes des nombreux effets bénéfiques sur la santé associés à leur consommation. (Kimura et *al.*, 1998). Pour obtenir certains effets positifs sur la santé (réduction des infections intestinales, digestion du lactose, réduction du cholestérol...), une souche probiotique doit atteindre le gros intestin à une concentration d'environ  $1 \times 10^7$  cellules viables/gramme (Stanton et *al.*, 2001). De ce fait, la concentration d'un probiotique dans un aliment doit tenir compte de cette contrainte pour permettre d'atteindre les concentrations ciblées dans le colon. Cette concentration dépend évidemment de la nature de l'aliment utilisé et de la quantité journalière consommée.

### **1.3.4.2 Principales souches commercialisées**

Les principales souches reconnues en tant que probiotiques, grâce à de nombreuses études, et actuellement commercialisées appartiennent le plus souvent aux genres *Lactobacillus sp.* et *Bifidobacterium sp.* (Goldin et Gorbach, 1992).

## **1.4 Le métabolisme du cholestérol**

Le cholestérol est une molécule biologique qui joue un rôle primordial en tant que constituant des membranes cellulaires, et en tant que précurseur des hormones stéroïdes et des acides biliaires.

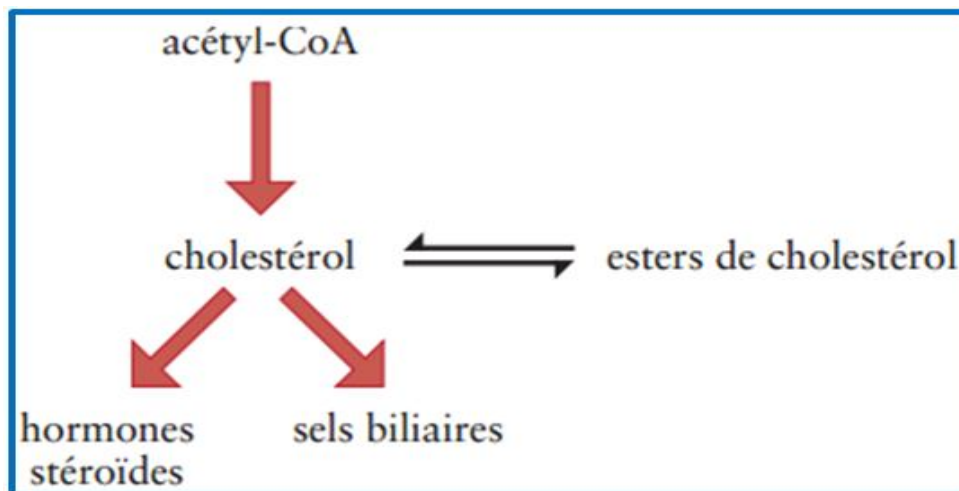
Les voies métaboliques du cholestérol sont :

- La synthèse du cholestérol à partir de l'acétylcoenzyme A ;
- La transformation en sels biliaires ;
- Les réactions d'estérifications et d'hydrolyse des esters pour son transport ou son stockage ;
- La synthèse des hormones stéroïdes.

Le cholestérol, qu'il soit exogène « provenant de l'alimentation » ou endogène « issu de la biosynthèse de *novo* », est transporté dans l'organisme par les lipoprotéines plasmatiques.

## Synthèse bibliographique

Sa synthèse et son utilisation doivent être étroitement régulées, afin d'éviter une accumulation et des dépôts dans l'organisme.

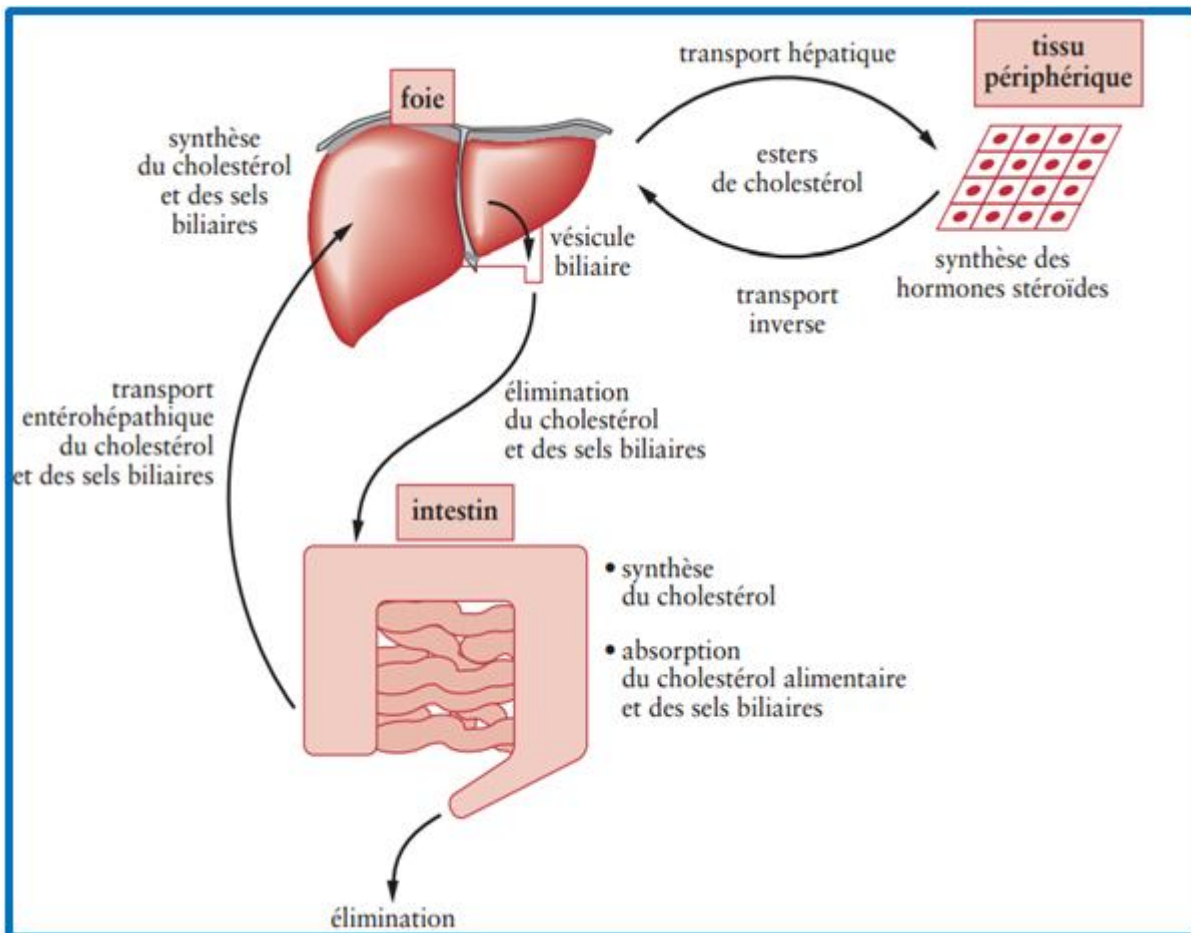


**Figure 09** : relations métaboliques du cholestérol.

Le métabolisme du cholestérol se déroule dans tous les tissus, mais l'intestin et le foie sont plus particulièrement concernés.

**Tableau 05** : rôle des organes dans le métabolisme du cholestérol.

<b>Foie</b>	Récupération du cholestérol provenant de l'intestin et des tissus périphériques Synthèse endogène
<b>Intestin</b>	Absorption du cholestérol alimentaire et biliaire (cycle entérohépatique) Synthèse endogène Transmission vers le foie
<b>Tissus périphériques</b>	Récupération du cholestérol des lipoprotéines Utilisation pour synthétiser les composés biologiques de structure stéroïde Renvoi vers le foie du cholestérol en excès

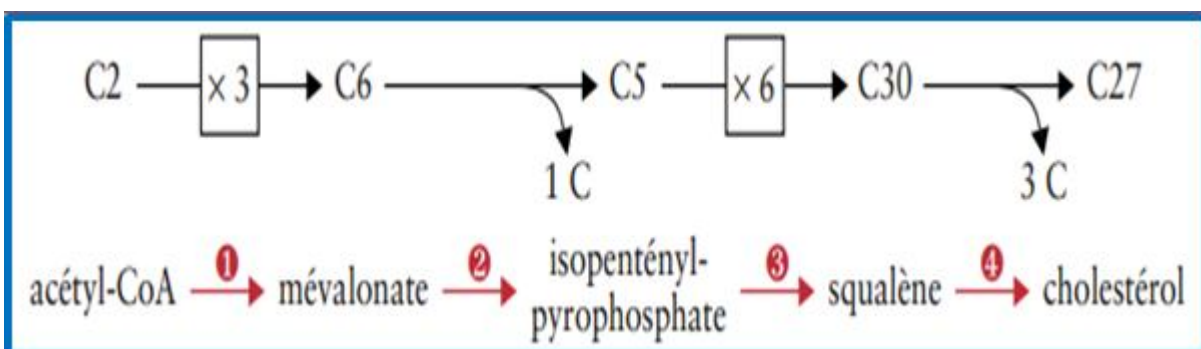


**Figure 10 :** vue d'ensemble du métabolisme du cholestérol.

- **La synthèse du cholestérol**

La synthèse du cholestérol se déroule à partir du maillon bicarboné apporté par l'acétyl-coenzyme A, dans le cytoplasme et dans les microsomes.

La suite des nombreuses réactions peut être divisée en 4 parties :



**Figure 11:** les différentes étapes de la synthèse du cholestérol.

-synthèse du mévalonate en C6 à partir de trois acétyl-coenzyme A (notée 1) ;

-transformation du mévalonate en isoprène actif, l'isopentényl pyrophosphate en C5 (notée 2) ;

## ***Synthèse bibliographique***

---

- polymérisation de six isoprènes actifs pour former le squalène, isoprénoïde en C30 (notée 3) ;
- cyclisation du squalène et transformation en cholestérol par clivage de trois atomes de carbone (notée 4).

Les étapes initiales se déroulent dans le cytoplasme puis, ensuite, dans le réticulum endoplasmique lisse de la cellule par un ensemble de réactions dont l'étape limitante est la réaction catalysée par l'HMGCR(ou 3-Hydroxy-3-Méthyl-Glutaryl-CoA réductase )

La régulation de la biosynthèse du cholestérol est destinée à ne produire que le complément nécessaire au cholestérol d'origine exogène. Elle se fait à un seul niveau de la synthèse, sur l'activité de la **HMG-CoA** réductase, à court terme et long terme.

L'un des modes de blocage de la biosynthèse du cholestérol est donc l'inhibition de l'HMGCR.

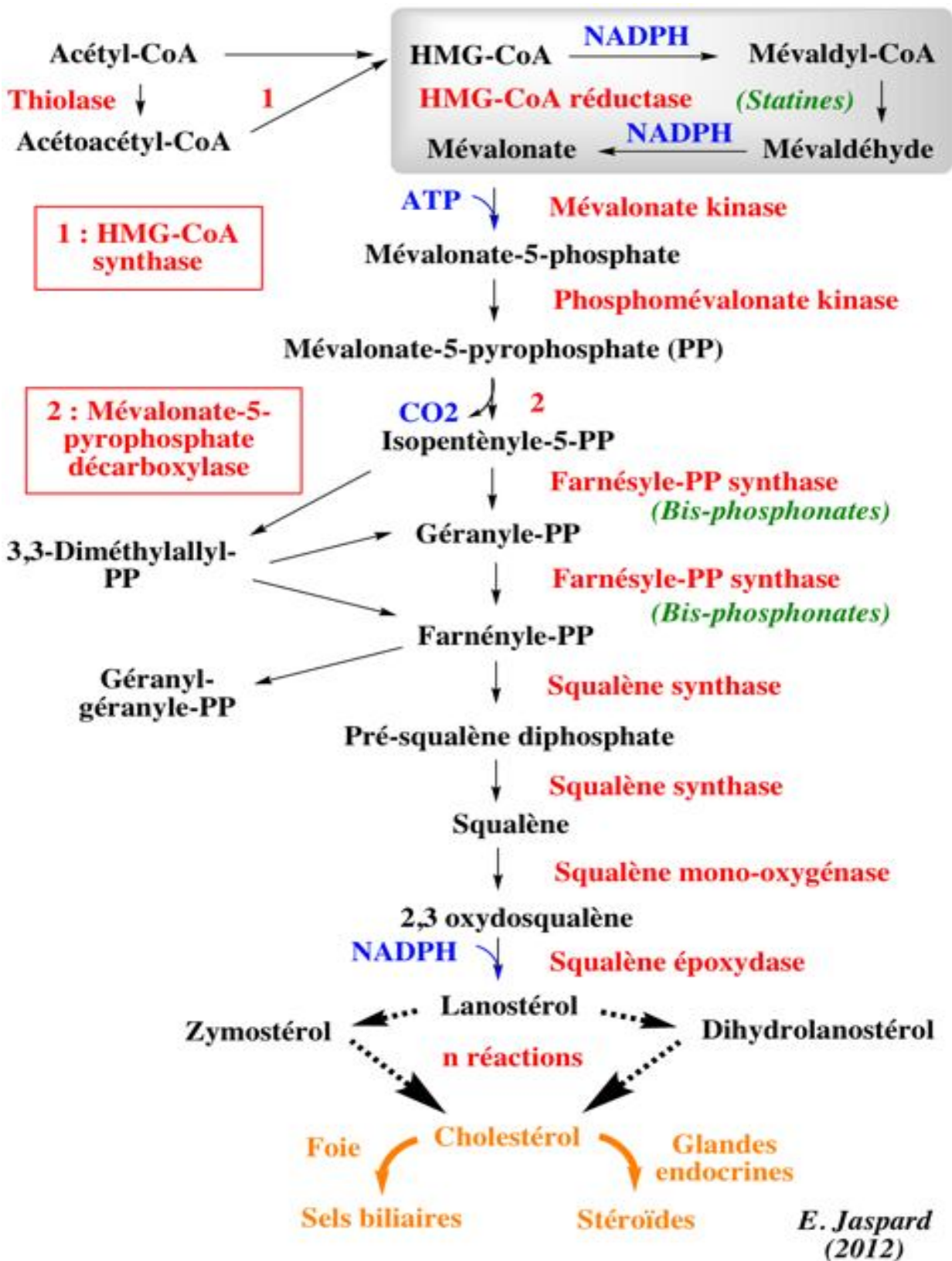


Figure 12 : La biosynthèse du cholestérol.

Le cholestérol est dégradé dans le foie en acides biliaries (dont l'acide chénodésoxycholique) par la 7- $\alpha$ -hydroxylase.

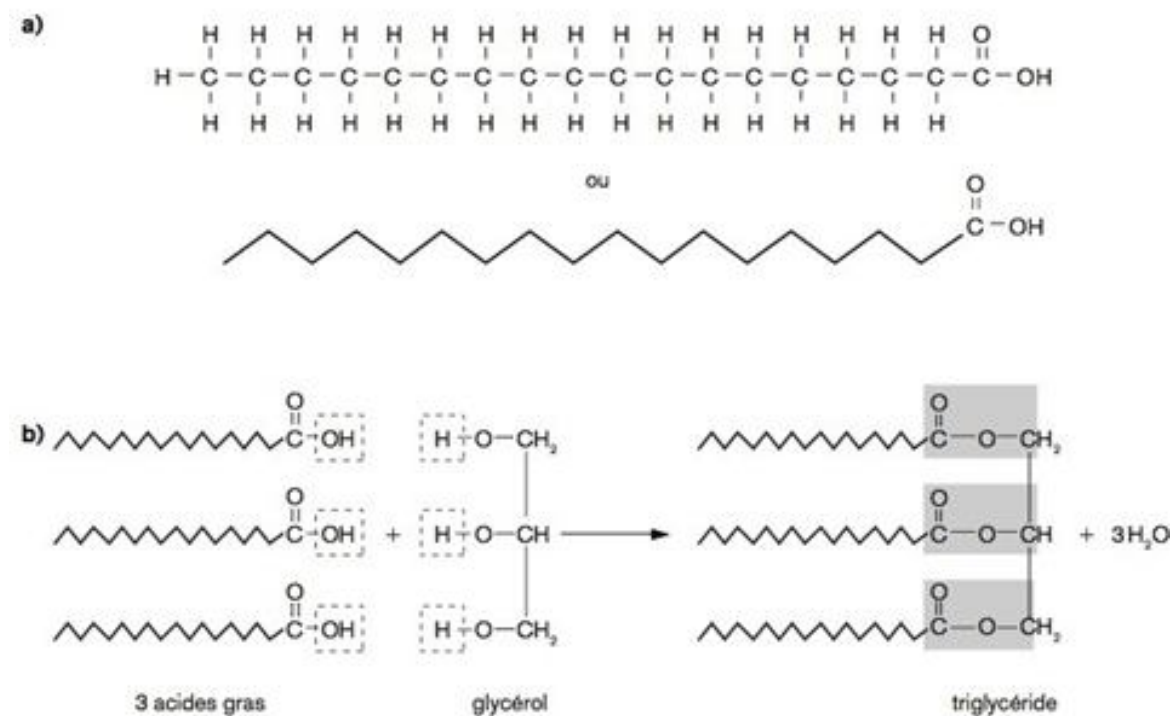
## 1.5 Biosynthèse des Triglycérides

Elle se fait surtout dans les adipocytes ( un peu dans les hépatocytes et les entérocytes ). Cette synthèse requiert une source de glycérol 3 phosphate issu de la glycolyse.

Pour former une molécule de triglycéride, trois molécules d'acides gras doivent s'unir à une molécule de glycérol.

a) Afin de simplifier les formules, on désignera ici la chaîne de carbone de l'acide gras par une formule stylisée.

b) Au cours de la réaction, chaque acide gras perd le groupement OH de sa fonction acide (en pointillés) pendant que chacun des atomes d'oxygène du glycérol brise sa liaison avec son atome d'hydrogène (en pointillés). Les produits de réaction sont un triglycéride et trois molécules d'eau. Le triglycéride est un triester, car il contient trois fonctions esters (en trame grise)



**Figure 13:** Biosynthèse des Triglycérides.

- ***Catabolisme des triglycérides***

2 types de catabolismes :

Pour les TG alimentaires : au niveau intestinal, et pour les TG endogènes : au niveau sanguin, hépatique et adipocytaire.

- ***Catabolisme intestinal des TG d'origine alimentaire***

Il s'effectue au niveau de l'intestin grêle. Il met en jeu la lipase pancréatique. Le substrat de cette enzyme étant insoluble en milieu aqueux il se présente sous forme de micelles grâce aux acides biliaires. Les différents produits de la dégradation sous intestinale des triglycérides vont être absorbés par la muqueuse intestinale : Le glycérol et les AG à courte chaîne se dirigent vers le foie (veine porte). Les mono, di-glycérides et AG à longue chaîne sont utilisés au niveau des entérocytes pour reformer des TG qui rejoindront la circulation sanguine via la lymphe sous forme de chylomicrons.

- ***Catabolisme tissulaire :***

L'hydrolyse des TG peut intervenir au niveau extra et intracellulaire : Via la lipoprotéine lipase LPL qui hydrolyse les TG des chylomicrons et des VLDL au niveau de l'endothélium vasculaire. Via la lipase hormonosensible au niveau intracellulaire. ( les triacylglycérols sont enveloppés d'une couche de protéines donnant des lipoprotéines (Chylomicrons et VLDL).

### **1.6 Les sels biliaires :**

Les acides biliaires sont synthétisés à partir du cholestérol dans le foie et stockés dans la vésicule biliaire.

La stéroïde est conjuguée avec une liaison amide à la position C24 carboxyle à une de deux acides aminés, la glycine et la taurine , avant d'être excrété dans l'intestin grêle.

Les sels biliaires conjugués (= liaison) sont facilement absorbés dans le tractus gastro-intestinal par des mécanismes de transport actif et sont renvoyés dans le foie; ce processus est connu comme la circulation entéro-hépatique.

Les acides biliaires accumulés et subit un certain nombre de cycles par jour entérohépatique, la transformation du cholestérol en acides biliaires est la principale voie par laquelle le cholestérol est métabolisé.

Dans le côlon, les bactéries de la flore transforment les acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires (acide désoxycholique et acidelithocholique) qui vont donner des sels biliaires (taurocholate et glycocholate).

Sous l'action de certaines bactéries (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*,...) une déconjugaison des acides biliaires a lieu dans le côlon.

la déconjugaison des sels biliaires suffit à elle seule pour expliquer une baisse de la teneur en cholestérol du foie et du sang, parce que les acides biliaires déconjugués sont plus facilement excrétés par voie fécale que les sels non déconjugués (perte de la glycine ou de taurine) ; le foie

doit alors puiser dans les stocks de cholestérol de l'organisme pour synthétiser de nouveaux acides biliaires.

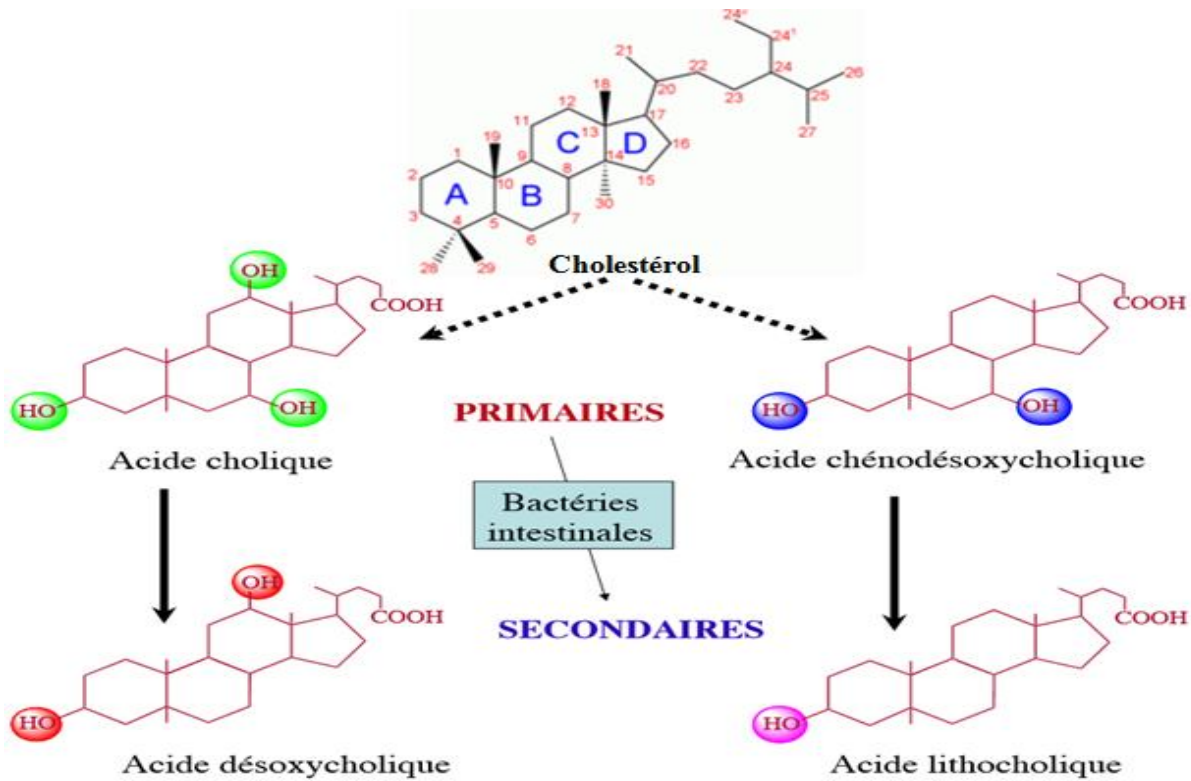


Figure 14: la formation des acides biliaires à partir du cholestérol

## Formation des sels biliaires (exemple)

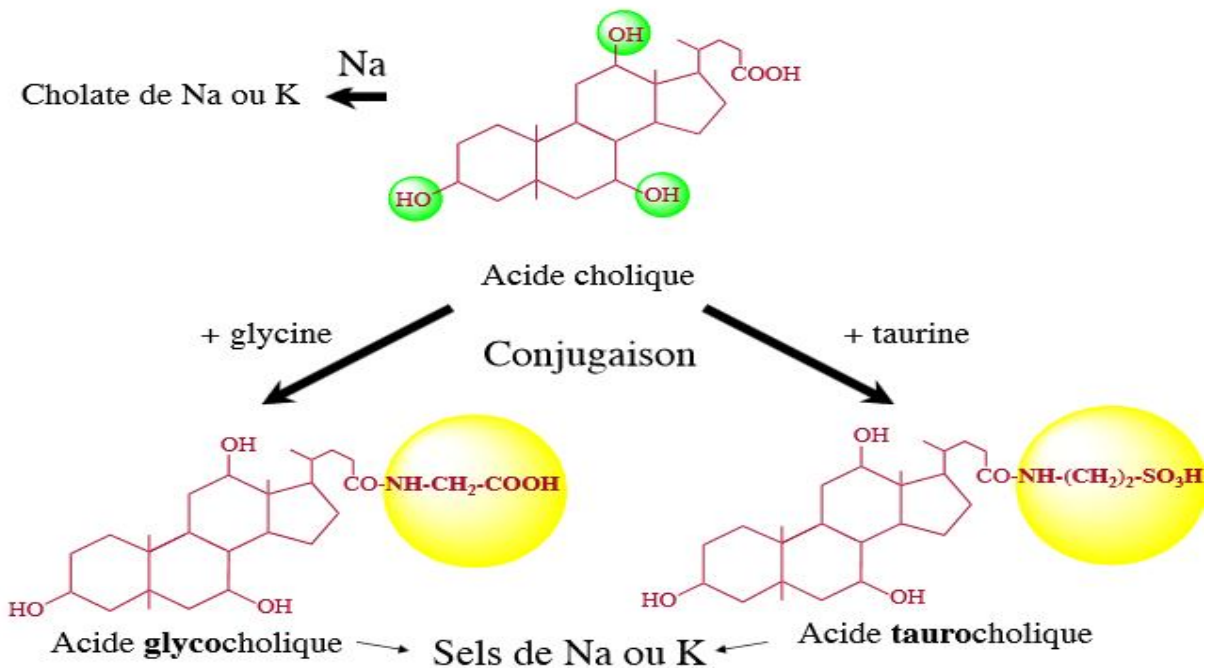


Figure 15: la conjugaison des acides biliaires.



### Rat Wistar

- **Dénomination** : RjHan :WI
- **Type** : Rat non consanguin
- **Provenance** : Zentralinstitut für Versuchstierzucht (Hannover) 1982 (issu du stock de l'Allington Farm- UK- 1964)
- **Couleur et génotype associé** : Rat albinos- TYR<sup>C</sup>/ TYR<sup>C</sup>
- **Performances de reproduction** : Animal facile à élever

### 1.7 Présentation de rat Wistar

Cette souche a été sélectionnée par DONALDSON au Wistar Institute (USA) en 1906 à partir d'un stock de l'université de Chicago (Russel–Lindsay, 1979).

Le Wistar est une souche non consanguine polyvalente utilisée dans les disciplines de la recherche médicale et biologique.

Sa longévité ainsi que sa pathologie tumorale en font un modèle de choix pour les études à long terme, notamment pour les études de vieillissement.



**Figure 16** : Présentation du rat Wistar.

## 1.7.1 Particularités du développement

Le raton à la naissance pèse à peu près 5 grammes, est aveugle mais très actif et il atteint rapidement 35-50 grammes en trois semaines. Le mâle adulte pèsera 400- 500 grammes alors que la femelle adulte pèsera environ 100 grammes en moins

## 1.7.2 La flore du rat :

Le rat est un des animaux de laboratoire les plus utilisés. La microflore du rat est caractérisée par une grande dominance des bactéroïdes dans le cæcum et le gros intestin (Schaedler et *al.*,1962; Smith 1965; Spears et *al.*,1967). La microflore autochtone des rats est constituée essentiellement de *Lactobacillus* et *streptocoques* 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; Tannock 1997; Li et *al.*,2004). On trouve également des *streptocoques*, des *microcoques* et *Clostridium welchii*, et la présence de levures est souvent constatée (NBSchaedler et *al.*, 1962; Smith 1965; Savage et *al.*, 1967). *E. coli* est trouvé constamment, mais parfois en quantité proche de celui des *lactobacilles* et parfois en quantité bien plus faible (Smith, 1965). Enfin certaines espèces, par exemple les *Flavobacterium*, apparaissent très transitoirement et uniquement dans l'intestin grêle, puis disparaissent rapidement ensuite (Ducluzeau, 1969).

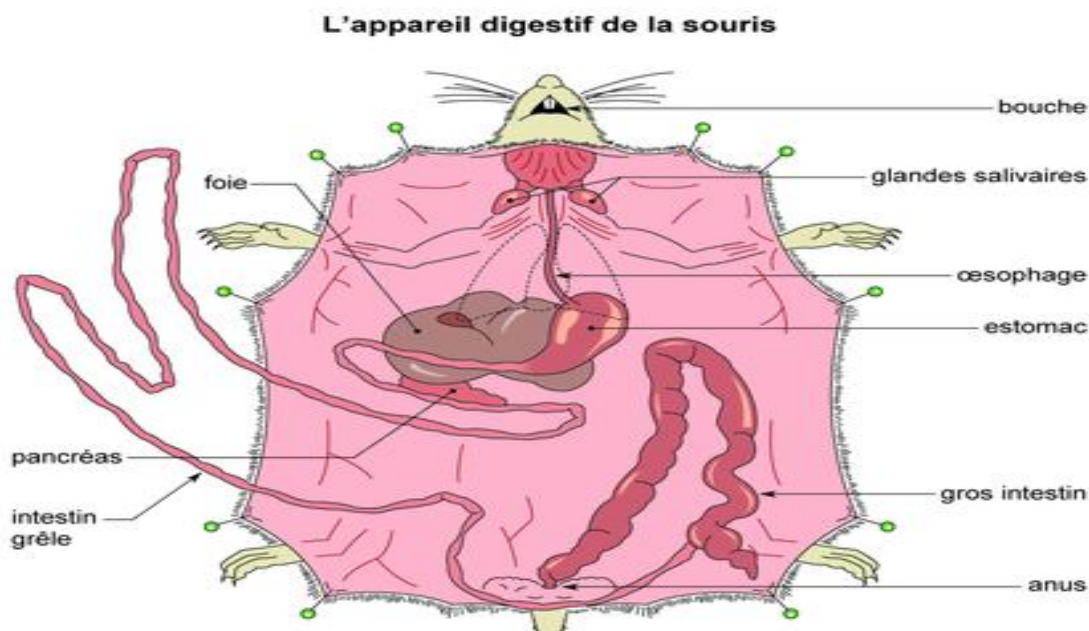


Figure 17: système digestive du rat wistar.

# Matériels Et Méthodes

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1- Lieu de l'étude

L'intégralité de ce travail a été réalisée au laboratoire de recherche de microbiologie de la Faculté des Sciences et technologies de l'Université de Saïda, durant la période Février –juin de l'année 2015.

### 2.2- Matériels

Pour la réalisation des différentes parties expérimentales, nous nous sommes servi du matériel suivant:

#### 2.2-1 Matériel biologique

- Origine des souches bactériennes

10 souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir de différents laits du territoire algérien. Les souches et leurs sources d'isolement sont indiquées dans le Tableau 06.

**Tableau 06** : Genres, espèces et sources d'isolement des bactéries lactiques utilisées.

Souches	Mech C3, Mech C7, Mech C8	NSC2C,NSC3, NSC6*,NSCA1 , NSC10.	Bech B1, Bech 2
Genre et espèce	<i>Bifidobacterium SP</i>	<i>Lactobacillus SP</i>	<i>Lactobacillus SP</i>
Source d'isolement	Lait de chamelle de Mechria (Amara, 2014)	Lait de chamelle de Naama (Amara, 2014)	Lait de chamelle de Bechar (Amara, 2014)

Le Tableau (07) regroupe les entérobactéries utilisées et leurs sources d'isolement.

**Tableau 07**: Les codes et les origines des entérobactéries utilisées.

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

- **Les sels biliaires**

Les sels biliaires utilisés proviennent de bile de mouton de la région de Saida, ils ont servi à étudier le pouvoir de résistance des bactéries lactiques à cet inhibiteur dans un milieu solide.

- **Les Prébiotiques :**

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

- **Disques d'antibiotiques**

Pour étudier le comportement des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques, des disques ont été utilisés pour réaliser un antibiogramme sur milieu solide.

Le tableau (08) montre les antibiotiques utilisés pour cette étude.

**Tableau 08 :** Antibiotiques utilisés, leur famille et leur mode d'action.

	Famille	Quantité ( $\mu\text{g}$ 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
Ticarcilline (TC)		(75 mcg)	
Cefepime(FEP)		(30 $\mu\text{g}$ )	
Amoxicilline (AML)		(30 $\mu\text{g}$ )	
Ampicilline (AMP)		(10 $\mu\text{g}$ )	
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 $\mu\text{g}$ )	
Gentamicine (CN)		(10 $\mu\text{g}$ )	
L'acide fusidique(FC)	Fusidamine	(10 $\mu\text{g}$ )	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 messager

<b>Céfotaxine (CTX)</b>	<b>Céphalosporines</b>	<b>(30 µg)</b>	<b>Inhibition de l'élaboration de la paroi bactérienne, en interférant avec la synthèse du peptidoglycane</b>
<b>Fosfomycine (FOS)</b>	<b>Acide phosphonique</b>	<b>(200 mcg)</b>	<b>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. Elle possède une action principalement bactériostatique à l'encontre des bactéries aérobies Gram + et d'un large spectre de bactéries anaérobies.</b>
<b>Clindamycin (CM)</b>	<b>Lincosamide</b>	<b>(2µg)</b>	<b>Entraîne un défaut de la paroi cellulaire et s'en suit une lyse bactérienne</b>
<b>Imipenem(IPM)</b>	<b>Carbapénèmes</b>	<b>(10 Ug)</b>	<b>Empêche la fixation de l'aminoacyl-ARNt entrant dans le site A du ribosome.</b>
<b>Tétracycline(TE)</b>	<b>Tétracyclines</b>	<b>(30 µg)</b>	<b>Inhibe de manière sélective la réplication de l'ADN bactérien</b>
<b>Nitroxoline(NTX)</b>	<b>Quinoleine</b>	<b>(30 U)</b>	<b>Interruption du processus de transpeptidation qui lie les peptidoglycans de la paroi bactérienne. Les bêta lactamines se lient et inactivent des cibles enzymatiques situées sur la paroi interne de la membrane bactérienne</b>
<b>Amoxicilline /Ac clavulaniques (AMC)</b>	<b>pénicilline + inhibiteur de bêtalactamase</b>	<b>(20/10 µg)</b>	

## **2.2-2 Milieux de culture**

Les milieux utilisés étaient, sous forme de bouillon, de gélose solide ou semi-solide. Ces milieux sont les suivants:

- **Le milieu MRS** (de Man et *al.*, 1960) : pour la culture et l'isolement des bactéries lactiques. Le milieu MRS inclinée, est utilisé en routine pour les cultures et la conservation des souches à court terme.
- **Milieu LB** (lysogenic broth) pour la croissance des entérobactéries.
- **Le lait** : un seul type de lait partiellement écrémé a été utilisé lors de cette étude, il a été produit au sein de l'industrie Giplait de Saida, ce lait est vendu conditionné dans des sacs d'une contenance d'un litre.

La stérilisation des milieux est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20min. Le lait est stérilisé quant à lui à 115°C pendant 10mn ou 110°C pendant 15mn.

La composition des milieux de cultures utilisés sont rassemblés dans l'annexe 01.

## **2.2.3 Méthodes**

### **a. Expérimentation in vitro**

#### **a.1 Vérification de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique**

La pureté des souches est vérifiée par un triple repiquage successif d'une colonieensemencée par la méthode d'épuisement de charge (méthode des quadrants).

Par la suite, un examen macroscopique est effectué en décrivant la couleur, l'aspect et la forme des colonies.

Un examen microscopique après coloration de Gram d'une colonie, a été réalisé afin de déterminer la forme des cellules, leur mode d'association et le type Gram (annexe 02)

➤ Les bactéries lactiques sont Gram positives.

L'appartenance des souches au groupe lactique est aussi vérifiée par le test de l'activité catalasique.

➤ Généralement, les bactéries lactiques sont à catalase négative.

#### **a.1.1 Conservation des souches :**

La conservation des souches peut être de courte ou de longue durée:

- Une conservation de courte durée se fait par ensemencement d'une colonie sur une gélose solide inclinée, après incubation à 30 °C pendant 24 h, les géloses sont conservées à 4°C pour quelques semaines (Font de Valdez, 2001).

• Une conservation de longue durée, quelques années (Font de Valdez, 2001), est faite par un ensemencement d'une colonie soit dans un milieu liquide additionné de glycérol à 40%, soit dans du lait écrémé (10%). Après incubation, on conserve les cultures à -20 °C.

### **a.1.2 Identification des bactéries lactiques isolées**

L'identification des souches a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Toutes les techniques d'identification ont été décrites par Larpent (1997), Idoui et Karam (2008) et Gusils et al. (2010):

### **a.1.3 Etude morphologique :**

#### **➤ L'étude macroscopique:**

L'examen macroscopique des cultures est le premier effectué après isolement de la souche (BENT MOHAMED et SIDI BABAT, 2007). Il porte sur la description de:

**La taille** approximative;

**La forme**, caractérisée par l'allure des contours qui peuvent être lisses, dentelés, déchiquetés. La surface (forme en relief) peut être bombée ou plate. Le centre est parfois surélevé, parfois « ombiliqué » ou « creux »;

**L'aspect de la surface** qui peut être lisse, brillant (type S «smooth» : lisse), rugueux ou mate (type R «rough»): rugueux);

**La coloration** : la plupart des colonies n'ont pas de couleur définie. Elles sont jaunâtres, grisâtres, ou blanchâtres mais certaines élaborent un pigment qui donne à la colonie une teinte franche : jaune, rouge, violette ; parfois le milieu lui même se colore, cas fréquent d'un pigment bleu-vert. La pigmentation est un caractère d'identification important ;

**La consistance** : les colonies peuvent avoir un aspect muqueux comme elles peuvent être filantes, grasses, crémeuses (qui se mettront facilement en suspension) sèches, pulvérulents (qui se dissocieront mal dans l'eau) (MARCHAL et al., 1982) ;

**L'opacité** : les colonies sont dites opaques si elles ne laissent pas passer la lumière, translucides si elles laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, transparentes, si elles laissent passer la lumière et on voit les formes au travers (MARCHAL et al., 1982).

#### **➤ L'étude microscopique:**

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose MRS, et dans le but d'écartier tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram (annexe 02),



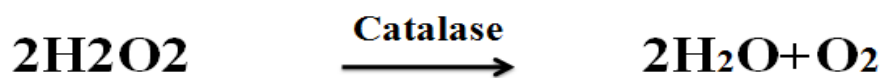
celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement

### a.2 Tests physiologiques et biochimiques des souches à caractère probiotique

#### a.2.1 Recherche de la catalase :

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase.

Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des entérobactéries (catalase+). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O<sub>2</sub>) (Marchal et *al.*, 1991).

#### a.2.2 Sélection des souches probiotiques

La sélection des souches probiotiques repose sur la base des critères suivants:

- La résistance aux antibiotiques.
- L'inhibition des germes pathogènes
- La survie élevée dans les conditions gastro-intestinales (la résistance aux acides et aux sels biliaires).

##### a.2.2.1 La résistance aux antibiotiques

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide en bicouche, a été appliquée, Pour chaque souche testée (Les dix souches de bactéries lactiques ont subis ce test), une colonie de morphologie typique a été sélectionnée et repiquée sur milieu MRS liquide, et incubé pendant 18h (culture fraîche), 7ml de gélose molle ensemencée avec 0,5ml de culture fraîche est recouverte la surface de la gélose MRS, déjà coulée et solidifiée. Après le séchage de cette double couche, on dépose stérilement les disques d'antibiotiques sur les boites.

Les antibiotiques utilisés : voir **Tableau 09**.

Après incubation à 30°C pendant 24h en anaérobiose, des zones d'inhibitions peuvent être observées autour des disques, le diamètre de la zone d'inhibition est alors mesuré.

Les résultats sont exprimés en Sensible (S) ou Résistante (R).

Pour un diamètre inférieur à 15mm la souche est résistante et pour un diamètre supérieur ou égal à 15 mm la souche est sensible (Karam, 1994).

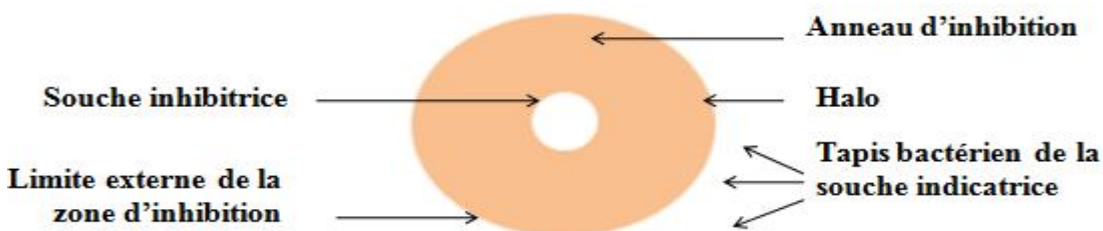
### *a.2.2.2 Pouvoir antibactérien des souches*

La technique choisie pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne est celle de

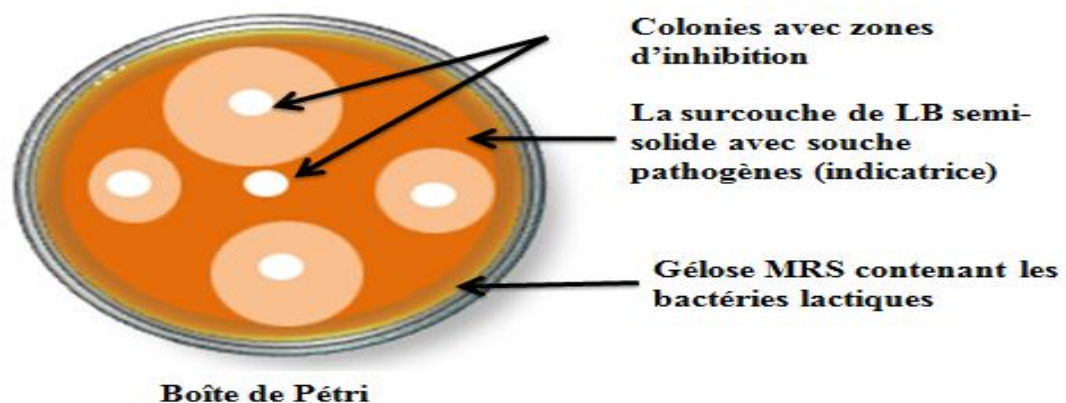
Fleming et *al.* (1975), elle consiste à ensemencer en touches les différentes souches de bactéries lactiques sur milieu MRS solide, après séchage 30 mn à la température ambiante, les 8 boîtes de Petri sont incubées à 30°C pendant 18h.

Les cultures sont ensuite recouvertes de 10 ml de LB semi-solide ensemencé par 0,1ml de culture fraîche de souche pathogènes, à la méthode de la double couche. Après solidification de cette deuxième couche, les boîtes sont remises à l'étuve à 37°C pendant 24h. La présence des zones claires autour des souches ensemencées par touches indique l'inhibition de la souche indicatrice.

Nous remarquons que dans ce test les souches indicatrices et inhibitrices ne sont pas incubées au même moment et donc les souches en touches ne sont soumises à aucune contrainte de culture. La lecture des résultats consiste à mesurer les dimensions des anneaux d'inhibition (halos clairs) autour de chaque souche ensemencée en touche. (Figures : 18).



**Figure 18** : Représentation schématique des halos d'inhibitions.



**Figure 19**: Représentation schématique de méthode de double couche

### *a.2.2.3 Test de survie dans les conditions gastro-intestinal :*

#### ➤ *La tolérance aux sels biliaires*

Ce test est fait sur gélose MRS additionnées de bile de mouton, dans le but de déterminer s'il y a une croissance de nos souches en présence de sels biliaires on mesurant le diamètre des colonies sur les différents milieux.

La gamme de concentration croissante de sels biliaires utilisée va de 0,25% à 10% (0,25% ; 0,5%; 1%, 2%, 4%, 5% et 10%). Par exemple, pour la concentration 0.25 % on prend 99.75 ml de MRS maintenue en fusion à 45°C additionnée de 0.25 ml de sels biliaires de mouton qui a été préalablement stérilisée à l'aide d'un filtre millipores (0.22 µm).

Les souches ont été ensemencées par touches à la surface des différents milieux à partir d'une pré-culture de 18-24h.

#### ➤ *Résistance aux pH acides*

Du bouillon MRS de pH ajustés allant de pH 01 à p H 06 est ensemencé et incubée à 30 ° C pendant 24 h. ce test consiste à déterminer s'il ya une croissance ou non des souches dans les différents milieux par spectrophotométrie à 600nm.

### *a.2.2.4 Croissance des souches lactiques en présence de fructooligosaccharides (F.O.S)*

- *En milieu solide*

Le but de Ce test est de déterminer si la présence de F.O.S indique un effet stimulateur de la croissance.

06g de F.O.S sont dessous dans 100 ml de gélose MRS pour la préparation d'une gélose MRS contenant 6% de fructooligosaccharides (Amara, 2012).

Après solidification, les souches ont été ensemencées par touches. Les cultures témoin sont faites avec un milieu MRS sans FOS. Puis incubées à 30 °C pendant 24 h.

Les tailles des colonies sont mesurées sur les différents milieux pour être comparer.

### *a.3 Identification de l'espèce par Galrie API 50*

L'identification rapide est possible grâce à l'emploi des galeries biochimiques d'identification d'API 50 CHL (Ref 50410, BioMérieux, France). Ce dispositif se présente sous la forme d'une plaque en plastique que l'on utilise selon le mode d'emploi sur le catalogue (voir annexe 03).

- ***Préparation de l'inoculum***

Nous avons utilisé les galeries **api 50chl** afin d'identifier de la souche sélectionnée comme probiotique potentiel, pour cela nous avons préparé le milieu 50 chl, puis nous avonsensemencé un tube de 10 ml contenant le milieu chl avec une souche probiotique jusqu'à obtention d'un trouble de 2 à l'échelle de Mac Farland.

- ***Préparation des galeries***

Environ 10 ml d'eau distillée sont réparties dans les alvéoles du fond de la boîte de la galerie formé de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés (0-9,10-19,30-329,40-49), la galerie est inoculée en répartissant la suspension bactérienne dans les microtubes de la galerie api 50chl à l'aide d'une pipette pasteur.

Les cupules sont remplies avec de l'huile de paraffine, enfin, la galerie est incubée à la température optimum de croissance du microorganisme soit 30°C.

- ***Lecture et interprétation***

La lecture des galeries est réalisée après 24 et 48h d'incubation à 30°.et comparées aux profils standards en utilisant le logiciel apiweb, dans le but d'avoir le genre et l'espèce de la bactérie testée.

- b. Expérimentation in vivo***

Afin de confirmer ou valider les résultats des tests *in vitro*, il serait nécessaire de réaliser des essais *in vivo* sur des animaux de laboratoire dans des conditions expérimentales appropriées.

- b-1 Animaux***

Les expériences sont réalisées sur des rats de différent âges mâles et femelle de type "Wistar" et élevés à l'animalerie du département de Biologie Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Université de Moulay Taher – Saïda- .

Les rats sont réparties en 3 groupes de 07 rats chacun. Chaque rat est identifié. Chaque groupe est soumis à un régime différent pendant 5 semaines.

**1-Un lot témoin**, (ou de référence) constitué de 7 rats mâles consommant le régime standard, un aliment sous forme de granulés d'origine commerciale.

**2-Un lot expérimental** constitué de 7 femelles consommant le même aliment auquel on a ajouté du beurre.

**3- Un deuxième lot expérimental** constitué de 7 femelles consommant le même aliment auquel on a ajouté le beurre et lait fermenté par la souche NSCA1.

Chaque semaine le poids des rats est noté. L'identification individuelle des rats se fait au niveau de la queue par des marques colorées.

### b.1.1 Nutrition

- **Besoins nutritionnels :**

La composition du régime est une variable expérimentale très importante que l'on n'a souvent pas tendance à contrôler adéquatement ni à l'indiquer au dossier (Excepté dans les expériences nutritionnelles) d'une façon suffisamment précise pour permettre sa propre évaluation comme une variable ou pour une répétition précise du protocole original (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1978).

- **Aliments et approvisionnement en eau**

La majorité des rats de l'expérimentation sont nourris avec des aliments secs en copeaux d'origine commerciale.

Les rats adultes mangent de 12-30 grammes d'aliments secs en cube quotidiennement et, si le régime est complet, ils n'ont pas besoin de suppléments alimentaires.

Les rats boivent 140 millilitres d'eau par kilogramme de poids corporel par jour. Ils boivent en moyenne 2 ml d'eau pour chaque gramme de nourriture sèche qu'ils mangent et cette valeur est beaucoup plus faible si la nourriture est sous forme de gélose, laquelle contient approximativement 50 % d'eau.

- **Nourriture**

Les animaux étaient nourris une seule fois par jour de façon égale et à heure fixe, à 06 :30 h, L'aliment utilisé durant notre expérience est un aliment sous forme de copeaux et composées d'un mélange de céréales, de suppléments protéiques et de divers autres composés, dont des vitamines.

**Tableau 09:** Les trois régimes donnés aux rates.

	<b>Lot N° 01</b>	<b>Lot N° 02</b>	<b>Lot N° 03</b>
<b>Régime</b>	-100 g de granulés d'un mélange de céréales -100ml d'eau du robinet « bouilli et refroidi »	-100 g de granulés d'un mélange de céréales + 25 g de beurre - 100ml d'eau du robinet traitée.	100 g de granulés d'un mélange de céréales + 25 g de beurre -10ml de lait fermenté par la souche NSCA1 + 90ml d'eau du robinet traitée + 01g de prébiotique

### *b.1.2 Mise en place de l'infrastructure d'élevage*

L'unité d'élevage se compose de 03 cages (voire annexe 05-2 : Hébergement) (37cm x 25cm x 17cm) étaient disposées dans un garage. Les abreuvoirs sont une sorte de biberon fabriqués à l'aide de bouteilles en plastique d'une contenance de 500 ml. « Voire annexe 05-01 : entrave et manipulations ».



**Figure 20** : Cage d'élevage.

### *b.1.3 Administration indirecte des probiotiques*

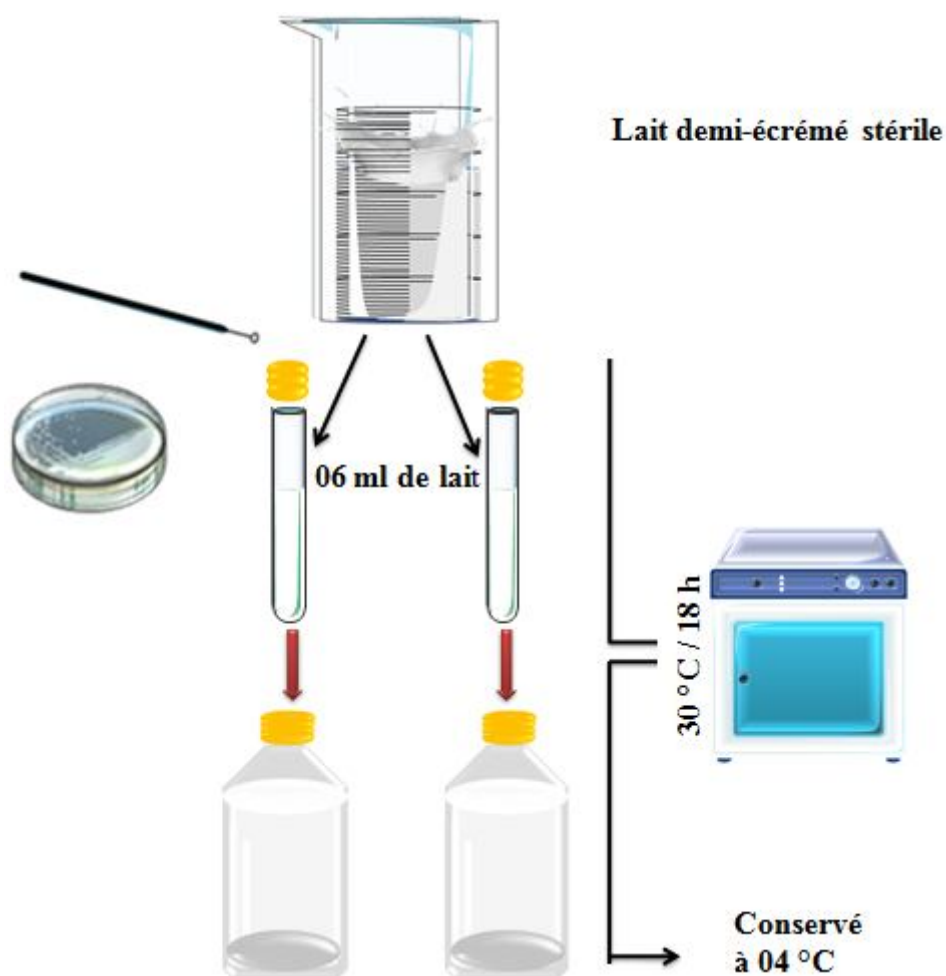
L'administration est possible dans lait fermenté dilué dans l'eau d'abreuvement 10 ml de lait fermenté + 90 ml d'eau traitée/ jour / lot N° 03.

### *b.1.4 Préparation du lait fermenté*

La souche NSCA1, isolées et identifiée précédemment est utilisée comme souche cible. Cette dernière est repiquée sur gélose MRS, puis incubée à 30 °C/24h.

Après incubation 02 colonies sont reprises dans 06 ml de lait demi écrémé stérile, incubé à 30°C /18h jusqu'à coagulation.

A partir des deux inocula, onensemence des flacons de 200 ml de lait écrémé, l'ensemble est incubé et le coagulat obtenu est ensuite conservé à 04°C jusqu'à ce qu'il soit présenté aux rats.



**Figure 21:** Méthode de préparation du lait fermenté

### *b-2 Paramètre zootechniques*

#### *b-2-1 Paramètres biologiques :*

Le suivi et le contrôle des performances de croissance et d'assimilation de la nourriture distribuée, sont révélés par les mesures du poids et pesée de nourriture consommée. Ces paramètres sont effectués sur chaque lot et Chaque semaine à jeûne à partir du 04 mai 2015 jusqu'à la fin de l'expérience le 02 juin 2015. En respectant le jour et l'heure de la pesée.

#### ➤ *Nourriture consommée*

L'aliment était distribué quotidiennement une seule fois par jour. 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 :

**Nourriture consommée (g) = nourriture présentée (g) – nourriture résiduelle (g)**

#### ➤ *Pesée des animaux*

## Matériels et méthodes

---

La biométrie des poids est effectuée à l'aide d'une balance électronique. Les rats sont pesés individuellement.

### ➤ *Taux de survie*

Le taux de survie est calculé à partir du nombre total de rats à la fin de l'expérience et de l'effectif en début d'élevage, selon la relation ci-dessous :

$$\text{Survie (\%)} = \frac{\text{Nombre de rats final}}{\text{Nombre de rats initial}} \times 100$$

### **b.2-2 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 :

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

#### ➤ *Le poids vif moyen*

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

$$\text{Poids vif moyen} = \text{Poids total} / \text{Nombre d'individus par lot}$$

### **b-2-3 Paramètres biochimiques**

Tous les 07 jours, des prélèvements sanguins ont été réalisés au niveau du sinus orbital, (voire annexe 4-2), les échantillons prélevés étaient récoltés dans des tubes héparinés, les rats ont été choisis de façon aléatoire à parti de chaque lot.



Après Centrifugation à 3000 tr/min pendant 15 min, le sérum et le plasma sont récupérés dans des tubes secs et conservés à -20°C en vue de la séparation des fractions lipoprotéiques (sérum) et le dosage des paramètres lipidiques et protéiques.

Les prélèvements sanguins ont été effectués dans le but d'étudier l'évolution du taux des constituants sanguins suivants: le glucose, les triglycérides et le cholestérol.

Le dosage de ces composants a été réalisé au niveau du laboratoire de biochimie de polyclinique de Rebahia (wilaya de Saida).

### ➤ *Détermination des teneurs en glucose*

Le glucose plasmatique est déterminé par la méthode enzymatique et colorimétrique en présence du glucose oxydase (GOD). Le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de peroxydase et de phénol, oxyde un chromogène

(le 4- amino-antipyrine) incolore en couleur rouge à structure quinoneimine. La coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en glucose présente dans l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde de 505 nm (Kit Chronolab).

### ➤ *Détermination des teneurs en cholestérol et triglycérides*

#### • *Dosage du cholestérol*

Le cholestérol est dosé par une méthode colorimétrique enzymatique au niveau du sérum. Les esters de cholestérol sont hydrolysés par le cholestérol ester hydrolase en cholestérol libre et acides gras. Le cholestérol libre produit et celui préexistant est oxydé par une enzyme cholestérol oxydase en  $\Delta^4$  Cholesterone et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier en présence de peroxydase, oxyde le chromogène en un composé coloré en rouge. La concentration quinoneimine colorée mesurée à 510 nm est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol contenu dans l'échantillon et est exprimée en g / l.

#### • *Dosage des triglycérides*

Le dosage des triglycérides sériques se fait entièrement par voie enzymatique par l'action d'une lipase selon la méthode colorimétrique enzymatique. Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et en acides gras grâce à des lipases. Une suite de réaction aboutit à la formation du peroxyde d'Hydrogène qui en présence de la peroxydase et d'un chromogène donne un composé coloré, la quinonéimine. La concentration en quinonéimine est proportionnelle à la concentration totale en triglycérides présents dans l'échantillon. La concentration en TG est déterminée à une longueur d'onde  $\lambda=500$  nm.

### *b-2-4 Sacrifice et prélèvement des organes*

À la fin de la période d'expérimentation, les rats sont anesthésiés au chloroforme par inhalation. La méthode de l'entonnoir (cloche) de verre pour l'induction de l'anesthésie est toujours utilisée pour les anesthésiques volatiles et, en ce qui concerne le maintien de l'anesthésie, on utilise la méthode du cône nasal qui permet d'ajouter de l'anesthésique selon les besoins. Après 12h de jeûne les rats sont sacrifiés. Le foie, le cœur, sont soigneusement prélevés et pesés.



**Figure 22:** Anesthésie des rats par inhalation du chloroforme.

### *b-2-5 : Analyse statistique des résultats:*

Les moyennes ont été calculées pour chaque mesure réalisée. Une analyse est réalisée pour la comparaison de moyennes de plusieurs échantillons.

# Résultat Et Discussion

## **3-1 Expérimentation in vitro**

### **3.1.1 Identification des bactéries lactiques isolées**

#### **3.1.1.1 Etude morphologique**

##### ***a. L'étude macroscopique***

Un total de dix souches ont été isolées et purifiées sur milieu MRS.

**a.1 Sur gélose :** Les cultures obtenues sur les boîtes de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies (Badis et *al.*, 2006).

Les isolats sont apparus de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, à pourtour régulier et de couleur blanchâtre.



**Figure 23:** l'aspect macroscopique des colonies de la souche sur milieu MRS après 24 h d'incubation à 37°C.

**a.2 Sur bouillant :** les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques.

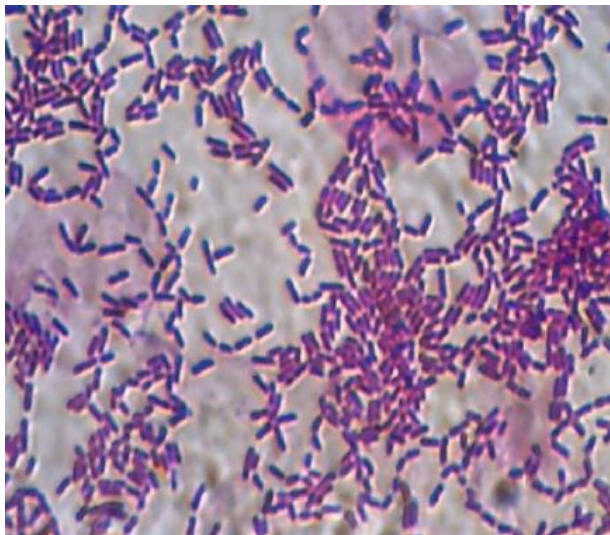
Trouble bactérien

**Figure 24** : cultures pures des bactéries lactiques sur milieu MRS liquide après incubation à 37°C pendant 24h.

### *b- L'étude microscopique*

Après la coloration de Gram, nous avons passé à l'observation microscopique aux grossissements (G: x100) avec l'huile à immersion.

Les résultats obtenus suite a la coloration des Gram et au test de la catalase, montre que les 10 souches sont des bâtonnets **Gram positif** et **catalase négative**, Toutes les souches présentent une forme cellulaire en bâtonnet(en forme VouY) ou en bacille, Le mode d'association varie d'une souche à l'autre (en amas diplobacille ou en chaînettes plus ou moins longues.)



**Figure 25**: La morphologie des cellules de la souche après coloration de Gram observé sous le microscope optique (G x 100).

### 3.1.1.2 Sélection des souches probiotiques

#### ➤ *La résistance aux antibiotiques*

Ce test permis de mettre en évidence une activité de résistance aux antibiotiques. En effet, dans toutes les boites de pétri, on observe l'apparition de la zone d'inhibition autour du disque d'antibiotique.

Plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (Botes et *al.*, 2008), Il est nécessaire avant de lancer une culture d'amorçage ou un produit probiotique de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne contient pas des gènes de résistance aux antibiotiques (Ammor et Mayo, 2007).

## Résultat Et Discussion

Les résultats observés en milieu solide indiquent que les souches sont quasiment toutes sensibles au Tétracycline, à l'Imipenem, la clavulaniques, l'Ampicilline et à la Ticarciline. Toutes les souches montrent une résistance à 4/18 antibiotiques testés (Streptomycine, Kanamycine et Fosfomycine). Tandis que quelques souches possèdent un profil intermédiaire.

Les expériences en milieu solide montrent que de nombreuses souches présentent des polyrésistances (figure 26). comme par exemple la souche **NSC3** qui montre 09 résistances à des antibiotiques de 05 familles différentes.( tableau 10)

Selon Hemme *et al*, cette résistance est généralement une caractéristique intrinsèque, elle est liée à la présence des pentapeptides avec D-lactate lié au C-terminal à la place de D-alanine dans la composition de peptidoglycane ce qui empêchent la pénétration de l'antibiotique et par conséquent la lyse cellulaire.

**Tableau 10** : Comportement des souches vis à vis de divers antibiotiques.

Souches	ATB																	
	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
NSC2C	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
Mech C3	+/-	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
NSC3	+/-	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R
Mech C7	R	R	R	R	R	S	+/-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
NSC6*	S	R	+/-	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Bech B1	R	R	R	R	R	S	+/-	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
Mech C8	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Bech 2	S	R	R	R	R	S	+/-	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
NSCA1	S	R	+/-	R	R	S	+/-	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
NSC10	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S

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

Diamètre d'inhibition mesure en (mm)



AMC :clavulaniques      C : chloramphénicol  
 AML :Amoxicilline      CM : Clindamycine  
 AMP : Ampicilline      CN : Gentamicine



FC : L'acide fusidique      K : Kanamycine  
 FEP :Cefepime      IPM : Imipenem  
 FOS : Fosfomycine      NET : Netilmicine



OX :Oxacilline

**A**



CTX : Céfotaxime

**B**

S : Streptomycine

TC :Ticarciline

TE : Tétracycline

Figure 26: (A, B, C et D) Résultat du test d'antibiogramme de la souche Bech B1.

Selon Dalache *et al.*, cette polyrésistance est fréquemment attribuée à des plasmides ou des transposons chez de nombreuses espèces bactériennes. Pour l'ensemble d'antibiotiques testés, on n'observe pas une grande différence entre les souches étudiées.

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 lié à la présence fréquente de plusieurs gènes de résistance sur un même plasmide (ADN extra chromosomique transmissible entre bactéries). Par un phénomène de co-sélection, l'amplification et

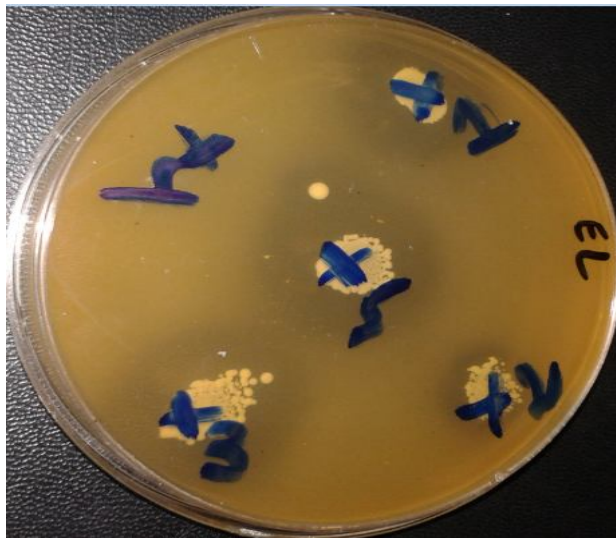
la dissémination interspécifique d'un tel plasmide de multi-résistance seront favorisées par n'importe quels antibiotiques dont la résistance est codée par le plasmide.

La résistance des probiotiques aux antibiotiques peut poser un problème si elle peut être transmise à des pathogènes chez lesquels la résistance thérapeutique pourrait avoir des conséquences néfastes.

L'utilisation de différentes souches lactiques en tant que probiotiques doit faire l'objet de travaux extrêmement attentifs (Marteau et *al.*, 2004). De même l'autorité Européenne de Sécurité Alimentaire, suggère que les probiotiques ne doivent pas avoir une résistance acquise aux antibiotiques (Zago et *al.*, 2011).

### ➤ *Pouvoir antibactérien des souches*

La méthode par diffusion sur milieu solide (Fleming et *al.*, 1975) est utilisée pour la détection des inhibitions; elle se traduit par la formation d'un halo autour de la souche ensemencée en touche. La lecture des résultats consiste à mesurer le rayon de l'halo d'inhibition de la souche indicatrice ensemencée en double couche au-dessus des souches inhibitrices (figure 27 )



**Figure 27 :** Activité inhibitrice des souches lactiques sur *Hafnia alvei* (EL1).

Les résultats de ce test sont illustrés dans le tableau 11.



**Tableau 11** : Activité antibactérienne des bactéries lactiques sur les entérobactéries

souches	T2	T3	T4	T6	T7	32	EC	EL
NSC2C	30	23	25	23	25	30	32	22
Mech C3	22	25	0	0	15	23	12	19
NSC3	19	16	0	0	22	25	28	24
Mech C7	5	19	0	0	0	0	0	0
NSC6*	21	20	16	23	15	22	12	26
Bech B1	12	20	16	23	15	22	12	26
Mech C8	0	0	0	0	0	0	0	0
Bech 2	0	0	0	0	0	0	0	0
NSCA1	20	36	18	0	17	24	32	21
NSC10	25	45	15	0	15	23	30	27

Diamètre d'inhibition mesure en (mm)

La capacité de compétition de bactéries lactiques résulte de leurs activités fermentaires associées à la production de divers composés antimicrobiens dans le but d'inhiber la prolifération de microorganismes. De nombreuses substances à activité antagoniste produites par les bactéries lactiques ont régulièrement été mises en évidence (Rodrigues et *al.*, 2002)

Au laboratoire de microbiologie en exploitant les potentialités inhibitrices naturelles par des tests d'interaction entre les bactéries pathogènes et les isolats de bactéries lactiques, qui nous ont permis de remarquer que le diamètre des zones d'inhibition varie selon l'espèce (Prioult, 2003).

Les microorganismes pathogènes testés dans notre étude sont impliqués dans les toxiinfections ou les intoxications alimentaires appartiennent aux espèces suivantes :

*Citrobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogènese*, *Clostridium fragilis*, *Enterococcus sp*, *Salmonella pullorum*, *Hafnia alveei*.

Les résultats des interactions montrent que, les souches **Mech C8** et **Bech 2** ne présentent aucune activité inhibitrices.

La souche NSCA1 et NSC10, présentent une activité inhibitrice sur toutes les bactéries pathogènes avec des diamètres des zones d'inhibition de 20 à 45 mm., Sauf sur *Listeria monocytogènese* (T6) où aucune inhibition n'a été obtenue.

La souche NSC2C, NSC6\* et **Bech B1** présentent une nette inhibition des huit souches tests dont le diamètre des zones d'inhibition est compris entre 12 et 32 mm.

## Résultat Et Discussion

---

Ces valeurs coïncident pour certaines souches avec les travaux de Belyagoubi et Abdelouahid (2013), où les diamètres des zones d'inhibition de bactéries lactiques isolées des produits laitiers traditionnels d'Algérie sont de l'ordre de 4 mm jusqu'à 34 mm sur les mêmes bactéries pathogènes.

Ce résultat n'est pas surprenant, en effet les lactobacilles sont connus pour leur pouvoir inhibiteur par rapport au *Leuconostoc*, ceci est noté par plusieurs auteurs. Jensen et al., (2009) ont montré dans leur étude, que les Lactobacilles inhibent la plupart des souches de leuconostocs utilisées (66,7%) et inhibent peu les espèces de lactobacilles (37%).

Karam et al. (2004), ont observé que les souches de *Lactobacillus* présentent un grand effet inhibiteur (82,5%) contre des souches de *Lactococcus*, utilisées pour leur étude, et que les lactocoques inhibent peu les lactobacilles (2,3%).

D'après les travaux de Boudjani (2009), les diamètres des zones d'inhibition de bactéries lactiques isolées du lait cru de vache peuvent atteindre environ 20 mm.

La capacité inhibitrice *in vitro* des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes semble être une bonne propriété probiotique, comme elle peut jouer un rôle dans la préservation de la qualité hygiénique des denrées alimentaires (Ammor et al., 2006).

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens inhibant la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes ( Dortu et Thonart, 2009).

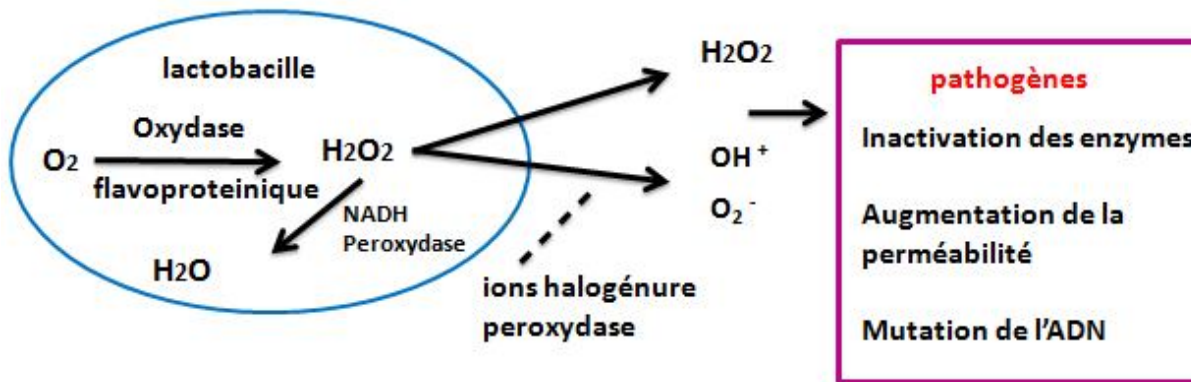
La production d'acides organiques permet une acidification du milieu qui peut limiter la croissance de certaines bactéries entre autres les bactéries indésirables. Des expositions prolongées dans un milieu acide peuvent entraîner la mort de plusieurs bactéries, y compris les ferments lactiques (Champagne et al., (1992); kostinek et al., 2005).

Ainsi, les acides organiques ont différentes actions telles qu'un excellent pouvoir bactéricide ou un effet bactériostatique contre les micro-organismes pathogènes se trouvant dans le tube digestif ( Jedidi, 2007).

Les acides organiques à l'état indissocié, l'acide lactique et l'acide acétique traversent passivement la membrane cytoplasmique et, pour de fortes concentrations d'acides, le milieu

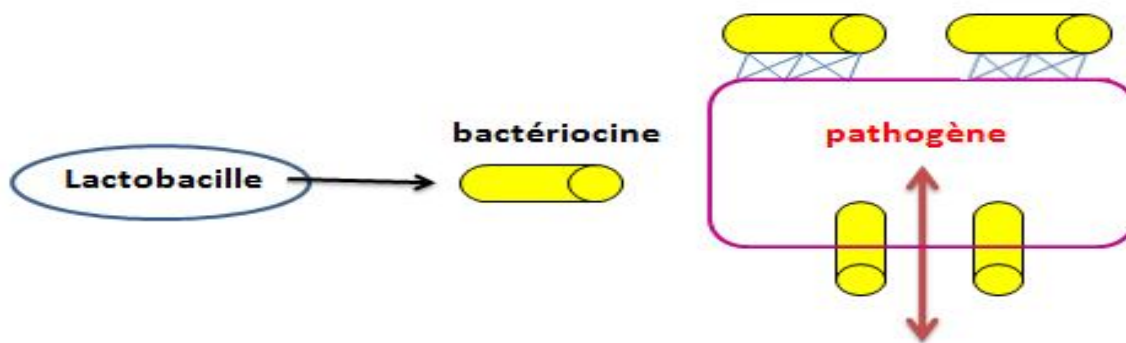
intracellulaire peut s'acidifier à un point tel, que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire est annulé (Ammor et al., 2007).

Le Peroxyde d'hydrogène est un inhibiteur de la croissance microbienne car il bloque le fonctionnement de certaines enzymes-clés intervenant dans la glycolyse, comme l'hexokinase (Desmazeaud, 1996).



**Figure 28 :** Modes d'action sur les pathogènes du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés produits par les lactobacilles (Rousseau, 2004).

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur, la mannose perméase, pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule ce qui induit la perméabilité de la membrane et la mort de la cellule (Hécharde *et al.*, 2001; Gravesen *et al.*, 2002).



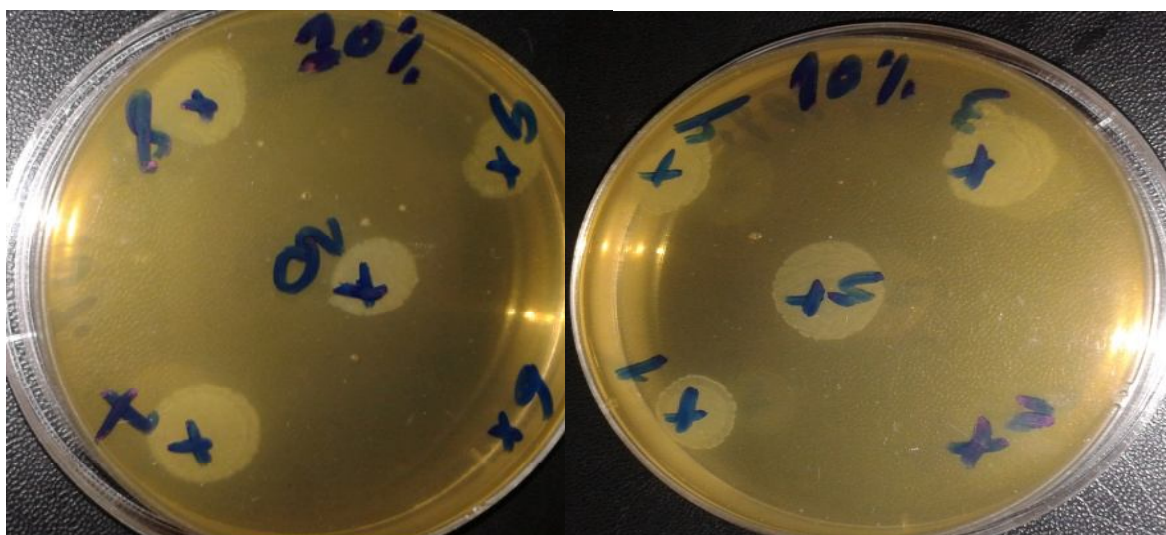
**Figure 29 :** Mode d'action sur les pathogènes des bactériocines produites par les lactobacilles (Rousseau, 2004).

### ➤ *La tolérance aux sels biliaries*

Le taux de sécrétion et la concentration de la bile dans les différentes régions de l'intestin varie principalement en fonction du type d'aliment consommé et il ne sera pas possible de prédire la concentration de bile dans l'intestin à un moment donné.

Davenport (1968) rapporte que les concentrations biliaries dans l'intestin, sont entre 0,5 à 2,0% pendant la première heure de la digestion. Les niveaux peuvent diminuer pendant la deuxième heure. Les concentrations biliaries allant de 0% à 1,5% ont été utilisées dans plusieurs milieux microbiologiques pour l'isolement sélectif des bactéries résistantes aux sels biliaries à partir de cultures mixtes.

Les sels biliaries sont l'une des barrières à franchir par les bactéries probiotiques pour gagner leur site, de ce fait la tolérance des bactéries lactiques a été évaluée. (Figure 30)



**Figure 30** : aspect des colonies des nos souches sur un milieu MRS à 10 % de sels biliaries.

Il apparaît que les souches ont présenté une sensibilité variable vis-à-vis des sels biliaries.

Les souches isolées étudiées ont montrées une bonne croissance en milieu additionné de 2% de sels biliaries par rapport aux autres concentrations (05% et 10 %).comme le suggèrent les résultats montrés dans le Tableau 12.

On peut noter que la taille des colonies diminue visiblement en fonction de l'augmentation de la concentration en sels biliaries. (Amara 2012).

**Tableau 12:** croissance des bactéries lactiques en présence des sels biliaries

SOUCHES	0.25%	0.5%	01%	02%	05%	10%
NSC2C	/	0.9	0.4	0.6	0.9	1.3
Mech C3	0.7	1.2	1.6	1.6	1.5	00
NSC3	1.4	1.9	1.3	1.1	1.4	1.5
Mech C7	0.4	00	1.5	1	1.2	1.2
NSC6*	2.3	1.3	2	1.6	1.7	1.5
Bech B1	1	1	1.6	1.5	1.6	00
Mech C8	1.5	1.8	1.5	1.4	1.5	1.4
Bech 2	1.3	1.6	1.7	1.6	1.3	1.2
NSCA1	1.5	1.8	1.3	1.6	1.3	1
NSC10	1.6	1.8	1.3	1.1	1.3	1

Cette capacité des lactobacilles à croître dans des concentrations élevées en sels biliaires est due à une activité exo- hydrolasique, qui leur permet de résister à l'action détergente des sels biliaires en les transformant en dérivés inoffensifs (Roy, 2006). La «Bile Salt Hydrolase» (BSH , EC 3.5.1.24), aussi appelée cholyglycine hydrolase, est responsable de la déconjugaison des sels biliaires. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des sels biliaires conjugués avec la glycine ou la taurine en résidus d'acides aminés et en sels biliaires libres. Cette activité a été notamment observée chez des souches isolées à partir du tube digestif ou des fèces de certains mammifères. Elle est très élevée chez les bifidobactéries (Roy, 2006).

La déconjugaison des sels biliaires 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. Il a été proposé que la déconjugaison des sels biliaires possède des effets bénéfiques sur l'hôte comme la diminution des niveaux de cholestérol (Zhang, 2008). Il est donc souhaitable de vérifier si un probiotique possède une activité BSH préalablement à sa mise en marché pour ses bénéfices escomptés.

Des résultats trouvés par Burns et al. (2008) ont montré que la plus part des souches de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* sont sensibles aux sels biliaires. De même Zago et al. (2011) ont révélé une moyenne de survie de 40% chez des lactobacilles isolés à partir de lait et du fromage.

### ➤ *Résistance aux pH acides*

L'étude de la survie des bactéries lactiques 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.

L'étude de l'exposition prolongée des nos souches aux conditions acides a été réalisée par incubation dans le milieu MRS à différents pH (1, 2, 3, 4, 5, 6). La densité optique est mesurée après 24-48h à une longueur d'onde de 600 nm.

La résistance aux faibles valeurs du pH est l'un des critères de sélection des souches Probiotiques (Quwehand et al ., 1999 ; Çakir, 2003), car avant d'atteindre le tractus intestinal, les bactéries probiotiques doivent d'abord survivre au transit dans l'estomac où le pH peut être aussi bas que 1,5 à 2 (Dunne et al., 2001). La résistance à pH 3 est souvent utilisée dans des essais *in vitro* pour déterminer la résistance au pH de l'estomac .La survie de 00 souches de *Lactobacillus* à pH1 est illustré dans le tableau (13). Dans notre expérience, la totalité des souches ont résisté à un pH 3, quant au pH 2, on a une importante diminution et seulement trois souches NSCA1, NSC3 et Bech B1 ont montré une croissance supérieure ou égale à 0,200.

D'une manière générale, la résistance aux conditions acides diminue avec la diminution du pH du milieu jusqu'à atteindre le minimum, les densités optiques les plus importantes ont été notées à pH5 pour quasiment la totalité des souches, à pH4 et pH6 la croissance est légèrement moins importante mais restent comprises entre 0,564 et 2,241.

Les résultats d'une étude menée par McDonald et al. (1990) révèlent un arrêt de la croissance des souches de *Ln. mesenteroides* et *Lb. plantarum* à pH voisin de 3. D'autre part, les travaux de Mathara et al. (2008) ont montré une tolérance élevée des souches de *Lactobacillus* sp. vis-à-vis aux pH 2.5 et pH 2 après 2h d'incubation.



**Figure 31** : Effet de pH sur la croissance des bactéries lactiques

**Tableau 13:** Croissance des bactéries lactiques en milieu acide

SOUCHES	1	2	3	4	5	6
NSC2C	0	0,011	0 ,206	0,492	2,056	1,243
Mech C3	0	0,048	0,230	0,721	1,116	1,981
NSC3	0	0,202	0,204	1,855	2,305	2,241
Mech C7	0	0,152	0,347	0,835	1,040	0,859
NSC6*	0	0,190	0,368	0,821	1,839	1,123
Bech B1	0	0,234	0,389	0,840	1,660	1,355
Mech C8	0	0,093	0,104	2,000	2,335	2,075
Bech 2	0	0,142	0,218	1,918	2,294	2,185
NSCA1	0	0,200	0,207	0,800	1,349	1,393
NSC10	0	0,031	0,483	0 ,564	1,746	0,617

Even et *al.* (2003) ont observé un effet important de l'acidification sur l'activité glycolytique des cellules. En conditions acides, le taux spécifique de consommation de glucose est augmenté, permettant ainsi un plus grand apport d'énergie ce qui permis aux bactéries lactiques de mieux résistées à pH acide.

O'Sullivan et Condon (1997) ont montré une bonne résistance de la souche *Lc. lactis* ssp.cremoris NCDO 712 au pH acide dont la survie était de 100% à pH 4 après 2h d'incubation. Ils ont rapporté

que la majorité des bactéries lactiques possèdent un mécanisme de tolérance en milieu acide, ils sont capables de survivre à des concentrations en acide létales.

Les travaux de Mathara *et al.* (2008) ont montré une tolérance élevée des souches de *Lactobacillus* sp. vis-à-vis aux pH 2.5 et pH 2 après 2h d'incubation.

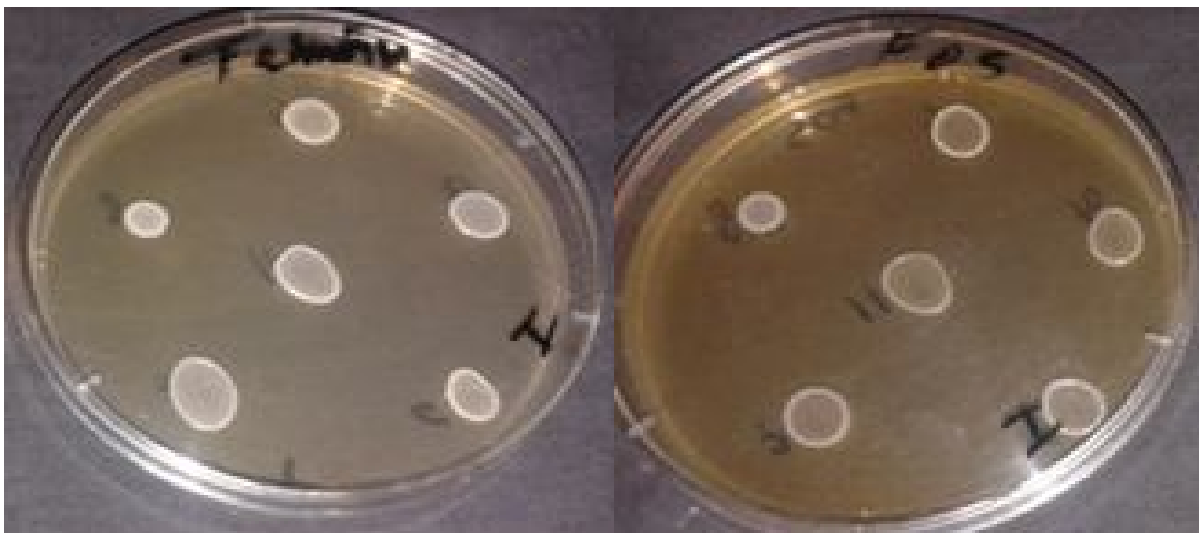
Chez les bactéries, cette résistance au stress acide est attribuée à un ensemble de protéines. Trois protéines, GroES, GroEL et DnaK, sont fortement induites en condition d'adaptation au stress. Ces trois protéines appartiennent à la famille des protéines induites en réponse à des conditions de stress variées, notamment le stress acide, et cela a été décrit chez d'autres bactéries à Gram positif comme *Lactococcus lactis* (Hartke *et al.*, 1994; Kilstrup *et al.*, 1997), *Bacillus subtilis* (Petersohn *et al.*, 2001) et *Listeria monocytogenes* (Hanawa, 1995).

Une autre molécule qui a un rôle essentiel pour la résistance des bactéries lactiques au stress acide est l'une des sous-unités de l'ATPase F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> qui est surexprimée lors de l'adaptation à l'acidité. Ce complexe protéique expulse les protons hors de la cellule en hydrolysant l'ATP (Nannen *et* Huntkins, 1991 ; O'Sullivan, 1999).

La capacité de survie à l'acidité gastrique varie beaucoup selon genres et souches.

### ➤ *Croissance des souches lactiques en présence de fructooligosaccharides (F.O.S)*

Beaucoup d'études, notamment *in vitro*, ont été effectuées avec les FOS stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries capables d'améliorer la santé de l'hôte. Les suivis de croissance des 10 souches des lactobacilles sélectionnées en présence et en absence des oligosaccharides testés sont représentés dans la Figure 32 et les diamètres de croissance sont résumés dans le Tableau 14.



(A)

(B)

**Figure 32** : colonies obtenues sur le milieu MRS en présence et en absence des FOS

**Tableau 14** : diamètres des colonies sur le milieu MRS en présence et en absence des FOS.

Les souches	NSC2C	Mech C3	NSC3	Mech C7	NSC6*	Bech B1	Mech C8	Bech 2	NSCA1	NSC10
<b>T - MRS</b>	05	07	08	08	06	06	09	06	08	06
<b>MRS+</b>	08	09	09	11	10	09	10	10	12	08
<b>FOS</b>										

Le diamètre des colonies est représenté en Mm

En absence de FOS (témoin), La taille des colonies des nos souches après 24h d'incubation est inférieure à leur taille en présence des FOS, l'ensemble des lactobacilles ont atteint un bon niveau de croissance en présence de FOS toutefois cette croissance varie selon les souches. NSCA1 a montré une bonne croissance en présence de FOS de même que Mech C7 qui révèlent des diamètres de colonies supérieurs à 10 Mm.

Une substance prébiotique stimule la flore bénéfique et n'est pas métabolisée par la flore pathogène.

Kaplan et Hutkins ont poursuivi leur étude et ont mis en évidence en 2003 la présence d'un système de transport spécifique aux FOS Actilight chez une souche de lactobacille.

Malgré l'intérêt de l'utilisation des oligosaccharides en tant que prébiotiques au niveau intestinal, peu d'informations sont disponibles concernant les systèmes responsables du

transport de ces glucides complexes et leurs voies métaboliques, notamment chez les lactobacilles [Barrangou et al., 2003].

Les FOS stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries capables d'améliorer la santé de l'hôte.

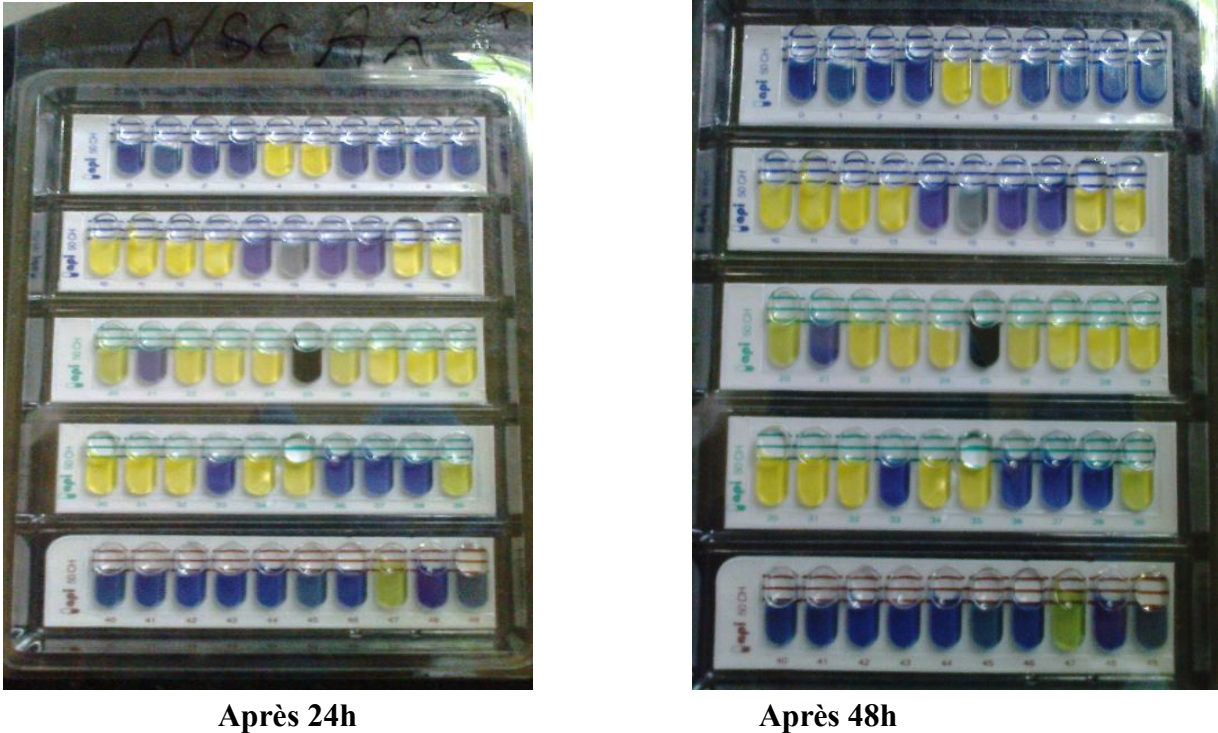


✓ D'après ces résultats, la souche candidate pour essais *in vivo* chez les rats c'est NSCA1.

### 3.1.1.3 Identification de la souche NSCA1 par Galerie API 50

Parmi les 10 souches isolées, la souche NSCA1 a été sélectionnée selon leur caractéristique Probiotique pour une identification approfondie avec les galeries API 50 CH.

Les résultats de la fermentation des hydrates de carbone sur la galerie API 50CH, ont permis l'identification de espèce, la figure (33)



**Figure 33** : Test de fermentation des hydrates de carbone sur galerie API 50 CHL de la souche NSCA1.

C'est une étape confirmative indispensable dans l'identification des souches. Après 24h puis 48h d'incubation, il a été remarqué un virage de la couleur du milieu de culture de pourpre au jaune dont 23 cupules de la galerie API 50 CHL de la souche, pour le test esculine (tube n° 25) on observe un virage du pourpre au noir.

Ce virage de l'indicateur coloré est attribué à la production d'une quantité plus ou moins forte d'acide lactique par les deux souches en utilisant les sucres fermentescibles (annexe 3).

L'interprétation de ce test a été faite par l'utilisation du logiciel Apiweb de la galerie API 50 CHL (Tableau 14) qui suggère une appartenance de la Souche *NSCA1* à l'espèce *lactobacillus plantarum* donnant une identité probabilistique de 99,9% avec le profile fermentaire typique de la même espèce.

# Résultat Et Discussion

REFERENCE	DATE
NSC A1	02/06/15
COMMENTAIRE	
Origine lait de chamelle, Naama	

EXCELLENTE IDENTIFICATION	
Galerie	API 50 CHL V5.1
Profil	----++-----++++-----++-----+++++-----++-----+---
Note(s)	

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Lactobacillus plantarum 1	99.9	0.98	

Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Lactobacillus pentosus	0.1	0.51	GLY 75% DXYL 100% MDM 1% MLZ 25%

**Tableau 15 :** Traitement des résultats d'identification de la souche NSC A1 en utilisant le logiciel apiweb.

### 3.2 Expérimentation in vivo

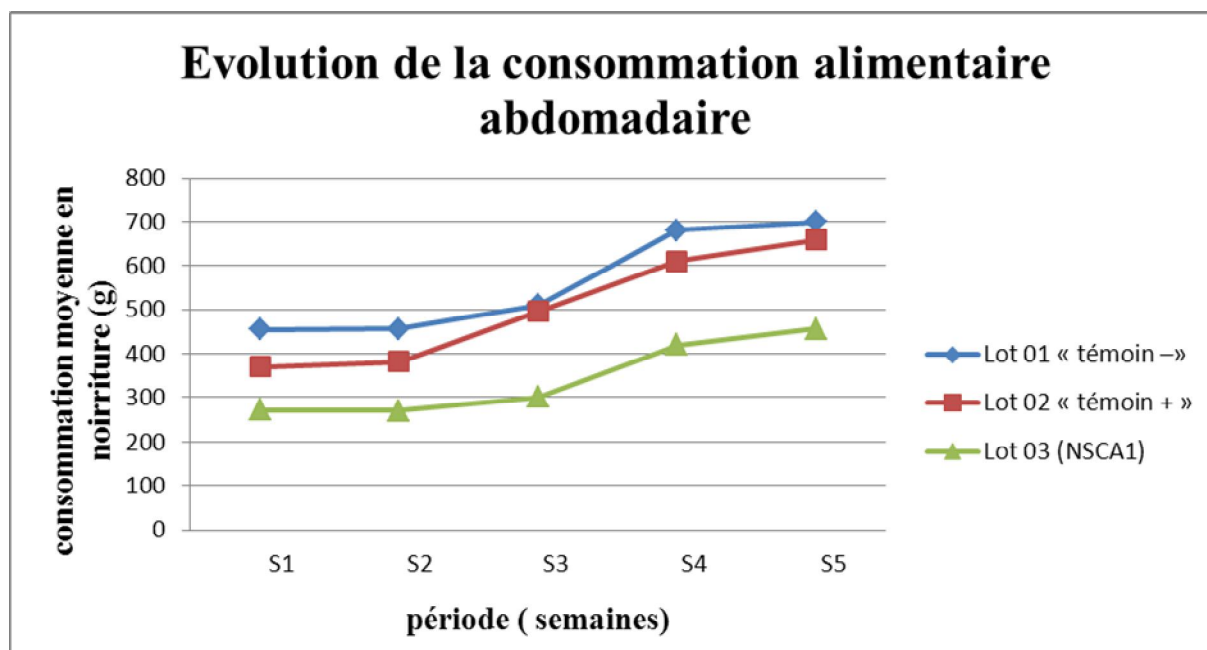
#### 3.2.1 Paramètre zootechniques

Les résultats relatifs à l'influence de l'apport du pro/ prébiotique sur les paramètres de croissance du rat sont donnés aux tableaux ci-dessous.

##### a- Paramètres biologiques

##### ➤ Nourriture consommée

L'évolution de la consommation alimentaire au cours de la période d'étude est montrée dans la figure 34.



**Figure 34 :** consommation alimentaire hebdomadaire.

## Résultat Et Discussion

Le rat est un animal très coprophage et cette habitude peut fausser et masquer les effets d'un régime sur les résultats expérimentaux. Il y a possiblement jusqu'à 50-65 % des matières fécales de rats nourris avec des régimes alimentaires adéquats qui peuvent être réingérées par coprophagie (NEALE, 1982); il semble que cette caractéristique soit amplifiée si les rats sont alimentés avec des régimes déficients.

Nos résultats montrent que Les quantités moyennes consommées sont marquées par des valeurs croissantes durant les 5 semaines d'élevage, y compris la période d'une semaine d'adaptation et quatre semaines du traitement.

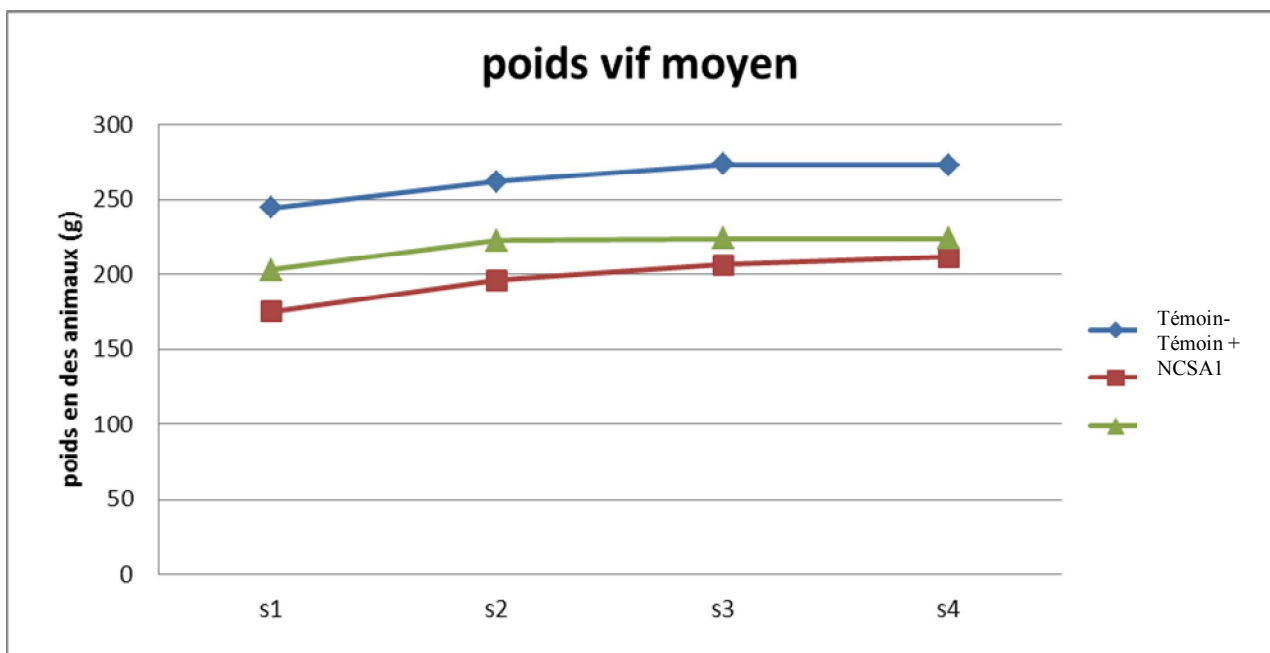
En suivant l'évolution de la consommation d'aliment par semaine on constate que l'incorporation de *lactobacillus plantarum* dans l'aliment des rats wistar a une influence sur leur appétibilité.

Cependant, on observe une augmentation de la consommation pour le lot témoin (-) à la 3<sup>ème</sup> semaine d'expérimentation

Ces résultats indiquent la bonne valorisation des diètes par les animaux recevant le régime hyperlipidique.

les travaux de Milagro et *al.*(2006) qui ont indiqué qu'un régime hyperlipidique chez le rat Wistar induit une augmentation de la prise alimentaire et du poids corporel avec une accumulation des lipides dans le tissu adipeux.

### ➤ *Le poids vif moyen*



**Figure 35** : Evolution du poids vif.

Afin de mieux voir l'effet du régime hypergras et l'ajout de la souche probiotique «*Lactobacillus plantarum* » sur le poids corporel, l'évolution de ce poids chez les trois lots de rats est représentée dans la figure 35

Les observations sur le développement des poids corporels des rats prennent deux voies, il est estimé qu'un poids corporel normal d'animaux augmenterait avec l'âge.

Le poids corporel accru est influencé par les facteurs diététiques, les régimes avec le contenu à haute teneur en graisse entraînant une augmentation de poids corporel sans compter l'existence

des anomalies dans le métabolisme peut également affecter le poids corporel. Nos résultats sont prouvés par les travaux de Lanjar et al ,(2011).

Du point de vue évolution pondéral, nous pouvons dire que l'addition d'un probiotique a été intéressante. Ce ci se traduit, à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine par des poids significativement supérieur par rapport au lot témoin (+) (195.85 g versus 222.66g). Ce ci s'explique par le fait que le probiotique en stabilisant l'écosystème microbien digestif, permet le développement et la fonctionnalité de l'intestin.

L'appareil digestif fonctionnant plus tôt et plus efficacement, l'animal peut alors valoriser au mieux les aliments ingérés, cette augmentation peut-être également du au poids corporel de départ du lot NSCA1 est supérieur au lot 2.

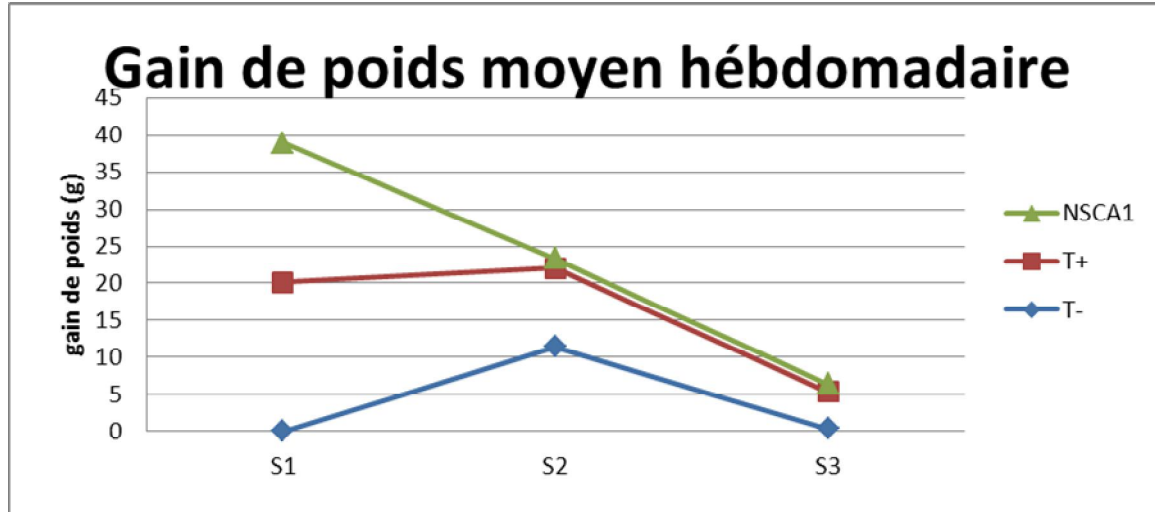
On retrouve cet effet dans la bibliographie, des résultats positifs avec ce type de micro-organisme (type espèce *lactobacillus plantarum* ) et autres sur la croissance :

\*Les travaux de Savoini et al.,(2004) ont démontré une amélioration de poids à j 35 de 3% alors que Awwad (2001) a constaté un taux de 7,5% à j 49.

\* Enfin, nous pouvons ajouter que, Kabir et al.,(2004) avait observé une amélioration du poids avec les lactobacilles à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine. Ces résultats semblent concorder avec ceux de Vittorio et al., (2005) pour la même souche bactérienne que nous avons testée dans notre expérimentation.

### b- Paramètres de croissances

### c- Gain de poids moyen par semaine



**Figure 36:** Evolution du gain de poids moyen.

L'évolution des gains de poids moyens des rats est donnée par le tableau n ° 02 (annexe 06), et illustré par les figures données ci- dessus (fig. 36).

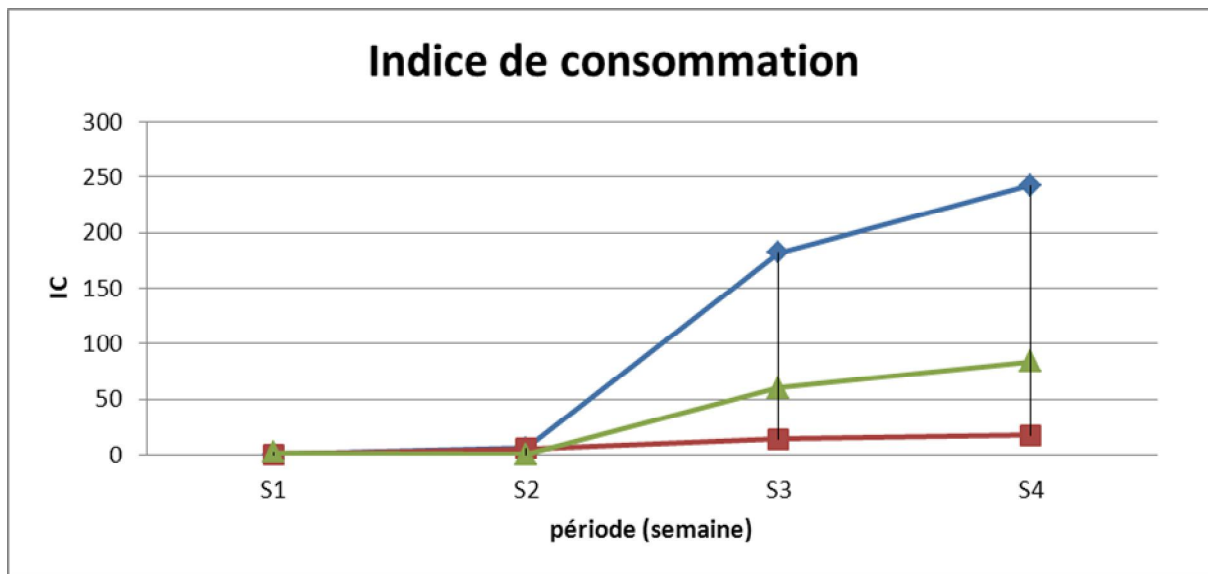
Nous observons à la première semaine de la période expérimentale une augmentation du gain de poids pour l'ensemble des animaux, cette augmentation est due à la croissance des animaux, le gain de poids est plus remarquable chez le lot témoin + et le lot NSCA1 par rapport au témoin -, cela est expliqué par le régime hyperlipidique, le gain de poids chute à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine, la stabilisation du poids des animaux correspond au ralentissement de la croissance des rats qui est du

à l'atteinte de l'âge adulte néanmoins les deux lot recevant le régime hyperlipidique montent un gain de poids supérieur au lot témoin négatif.

Les gains poids moyen à la fin de l'expérimentation c'est à dire au 35ème jour sont respectivement de 1 g chez les rates du lot expérimental 5g pour le lot 2, tandis qu'il est de 0,4 g chez ceux du lot témoin (-), témoignant que la consommation en symbiotiques réduit l'absorption des lipides et par conséquent l'augmentation du poids des animaux, le GPM du lot expérimental est plus proche du lot témoins – ne recevant pas les lipides comme supplément que du lot 2.

Les résultats trouvés sont en accord avec ceux de Mahrous et al. (2011) qui rapport des effets de l'apport de probiotique (deux souches de *Lactobacillus acidophilus*) sur les gains de poids chez les rats wistar comparé aux groupes témoins.

### ➤ L'indice de consommation



**Figure 37:** Evolution de l'indice de consommation.

Les indices de consommation (IC) du lot témoin et celui du lot expérimental sont consignés dans le tableau n° 03 (annexe 6) et illustré par les figures données ci- dessus (fig. 37).

Les indices de consommation montrent des variations significatives tout au long de la période expérimentale ceci est nettement observé pour les 3 lots marqué par une augmentation croissante. L'I.C est plus faible chez les deux lots recevant le régime hyperlipidique, pour le même poids d'aliment présenté aux 3 lots, la valeur énergétique est plus élevée dans les potions additionnées de lipide engendrant une augmentation du poids des animaux expérimentaux par rapport aux témoins.

Le lot expérimental n°3 a un indice de consommation plus élevé que le lot témoin + indiquant que ces animaux consommant les pro et prébiotiques prennent moins de poids ces résultats confortent l'hypothèse que certaines souches de probiotiques favoriseraient l'élimination des lipides contribuerait à la lutte contre l'obésité. Il faut noter néanmoins que les sujets du lot expérimental n°3 recevant un régime supplémenté en pré/probiotique, présentent au cours des différentes phases d'élevage des indices de consommation supérieur aux témoins.

Les résultats trouvés sont en accord avec ceux de Gunes et al. (2001) et Runho et al.(1997) qui rapportent des effets positifs de l'apport de probiotiques ou d'acides organiques sur le gain de poids et l'amélioration de l'indice de consommation. En revanche, les travaux de Vale et al. (2004); Ceylan et al. (2003) et Ozturk et Yildirim (2004) montrent que la supplémentation de la ration par

de acides organiques, par des probiotiques ou par des antibiotiques n'a pas assez d'effet sur le gain de poids et la valorisation de la digestion de l'aliment.

### ➤ Taux de survie

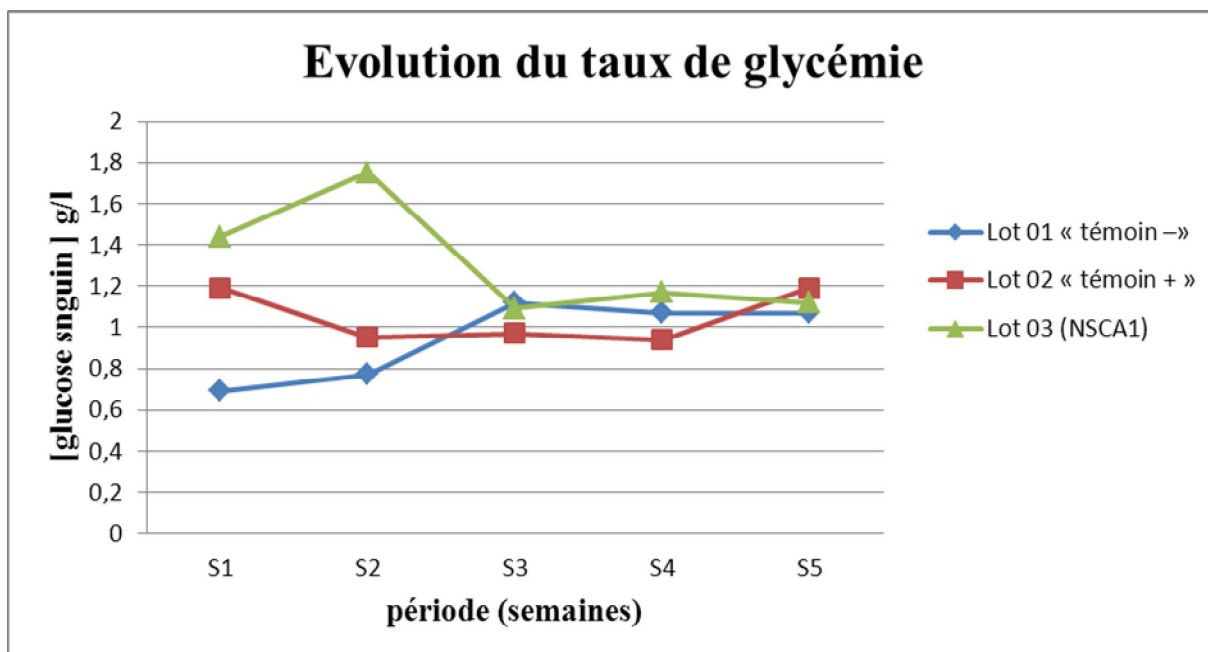
Le taux de survie obtenu durant l'expérience est très élevé, En effet, nous remarquons que les rats témoins (-) et témoins (+) présentent un taux de survie de 100 %, le taux de survie est de 71.42 % pour le lot 03. Les quelques morts dénombrés au cours de l'expérience ne semblent pas être liées à l'alimentation, la mortalité observée causée par l'anesthésie lors des prélèvements sanguins.

Ces résultats rejoignent ceux d'Idoui et *al.*, (2009), indiquant que l'utilisation de probiotique n'affecte pas la mortalité au cours de l'élevage.

### d- Paramètres biochimiques

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'impact d'une diète riche en gras, riche en symbiotique (combinée symbiotique/gras) administré pour une période de 5 semaines chez les rats Wistar, sur le métabolisme lipidique, et de bien caractériser les altérations métaboliques en étudiant les paramètres sanguins (cholestérol total, triglycérides et glycémie au niveau du plasma).

### ➤ Détermination des teneurs en glucose



**Figure 38 :** Evolution du taux de glycémie.

Les rats expérimentaux sont hyperglycémiques comparés aux rats témoins, lors du premier prélèvement.

A la semaine 02, le taux de glycémie augmente progressivement de 0.69 g/l - 0.77 g/l pour le lot 01, contrairement au lot 02 dont le taux de glycémie chute de 1.19g/l - 0.95g/l ce qui correspond à leur période d'adaptation à leur nouveau régime alimentaire.

Concernant le lot 03 on observe une diminution significative du taux de glycémie de 1.95g/l - 1.09g/l due à l'apport en probiotique et la présence du supplément prébiotique (FOS) qui semble stabiliser leur concentration en glucose sanguin à des valeurs relativement basses. Hata et al. (1985), Hidaka et *al.*, (1986), Drevon et Bonet (1992 et 1994) ont également constaté que les FOS

ont un effet régulateur sur le métabolisme glucidique: la glycémie, la fructosémie et l'insulinémie plasmatique poste prandiale ne varient pas, même chez les diabétiques après la prise de 25g de FOS.

Le régime hyperlipidique induit une augmentation très significative des teneurs plasmatiques en glucose chez les rats expérimentaux (lot 02) par rapport à leurs témoins nourris au régime standard observé au cours de la semaine 05.

### ➤ Détermination des teneurs en cholestérol et triglycérides

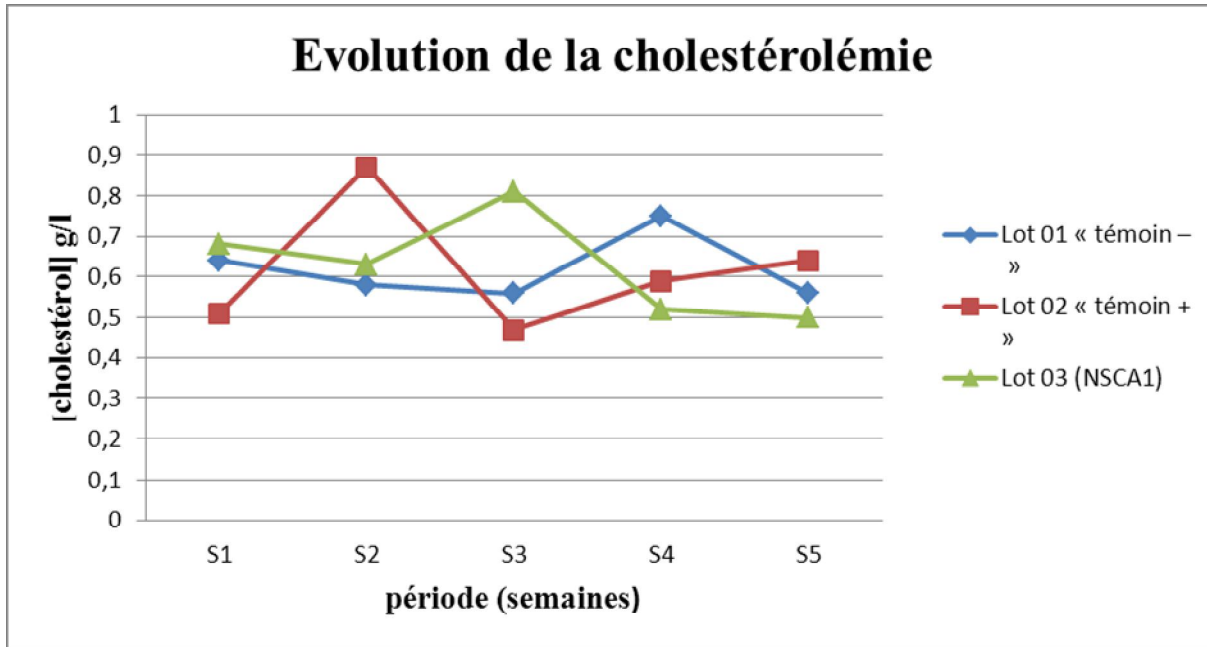


Figure 39 : Evolution du taux de cholestérol.

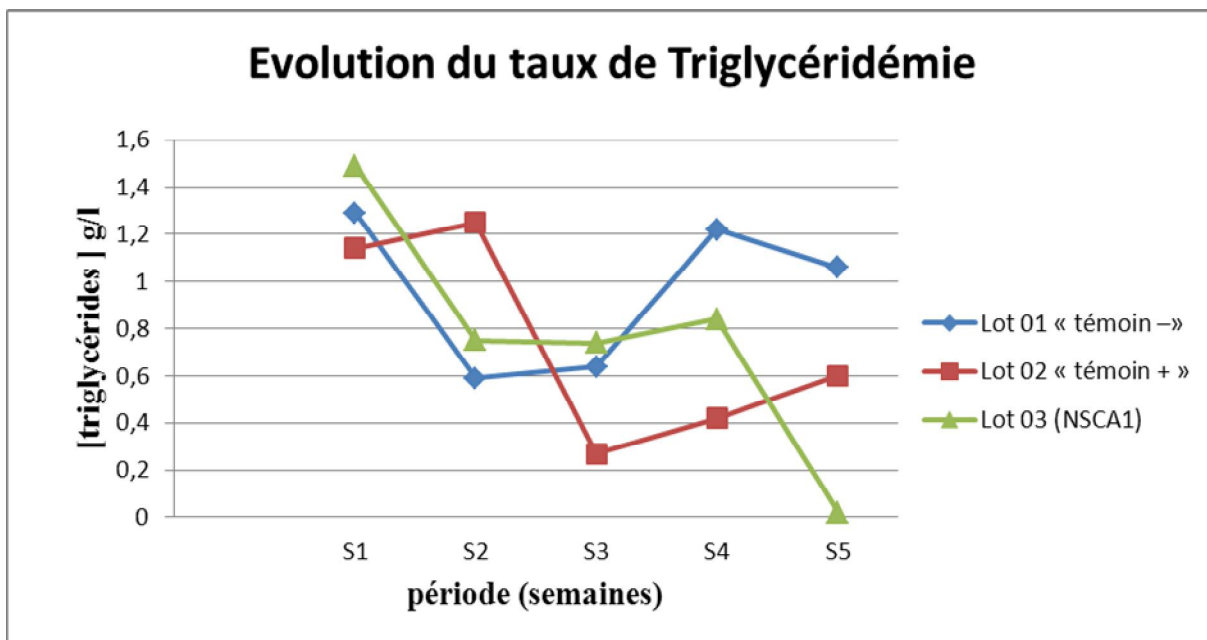


Figure 40 : Evolution du taux de triglycérides.

Les teneurs en cholestérol total et triglycérides du plasma chez les rats expérimentaux présentent des variations comparés aux valeurs témoins.

01- Les teneurs en cholestérol total du plasma chez les rats témoins et expérimentaux (figures 39 et tableau 6 (annexe 6)).

Une augmentation très significative du cholestérol est notée du niveau des plasmas des rats expérimentaux (témoins +) recevant le régime hypergras et aux rats du lot 03 par rapport aux témoins au cours de la première semaine

Les rats du lot 03, reçoivent la souche *Lactobacillus plantarum* et *F.O.S* reconnue par son activité hypocholestérolémiantes, Ce qui se confirme effectivement, en constatant la réduction du taux de cholestérol chez ces rats jusqu'à la semaine 5, passant d'une moyenne de 0,81g/l à 0,5 g/l.

Les rats du lot 02 nourries au régime hyper lipidique montre une réduction encore plus importante de ce taux, avec des valeurs minimal de 0.87g/l -0.47g/l a la deuxième semaine, indiquant vraisemblablement une période d'adaptation et la mise en œuvre des systèmes de régulation ; la production d'enzymes régulatrices du cholestérol sanguin notamment la 7- $\alpha$ -mono-oxygénase qui est la principale enzyme intervenant dans la dégradation du cholestérol en acides biliaire. Elle est régulée au niveau de la transcription, l'activité de cette enzyme est contrôlée par les sels biliaires les plus hydrophobes comme le glycodésoxycholate et par le cholestérol. Le taux de transcription de l'enzyme est accru par le cholestérol d'origine alimentaire.

A partir de la semaine 03 jusqu'à la semaine 05, une augmentation remarqué du taux de cholestérol sanguin de 0.59g/l -0.64g/l. Cette augmentation reflète les perturbations du métabolisme lipidique dues à l'état inflammatoire chronique provoqué par l'excès du poids. Ces données vont dans le même sens que les travaux montrant l'existence d'une relation entre le régime alimentaire et la l'hypercholestérolémie.

**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 des risques d'hypercholestérolémie responsable des maladies coronariennes. Par exemple, Bukowska et al., (1998) ont mis en évidence une diminution du taux de cholestérol sanguin chez des sujets soumis à un régime supplémenté avec *Lactobacillus plantarum***

**À l'heure actuelle, les recherches démontrent que le mécanisme premier derrière les probiotiques et leur capacité de baisser le taux de cholestérol réside dans le fait que les bactéries actionnent l'inhibition de l'intestin grêle dans son absorption du cholestérol, l'empêchant d'être absorbé par le flux sanguin. Dans une revue datant de juin 2010, le US National Library of Medicine dit : « Les études antérieures *in vivo* démontrent que l'utilisation des probiotiques/prébiotiques est efficace pour améliorer la structure des lipides, incluant la réduction du sérum/plasma, le cholestérol ainsi que les triglycérides.**

Les probiotiques possèdent une activité anticholesterolémiant. Selon (Novel,1993) les acides organiques sont vraiment des agents hypocholestérolémiants et les acides hydroxyméthyl et oratique abaissent le cholestérol sérique; par contre l'acide urique inhibe la synthèse du cholestérol. (Desmazeaud, 1996)

Des tests *in vitro* ont montré une réduction du taux de cholestérol dans un milieu de culture avec certains *Lactobacillus* (Zhanget al.,2008). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce fait, comme l'assimilation du cholestérol par les bactéries ou l'hydrolyse des sels biliaires conjugués.



Les acides biliaires, synthétisés par le foie à partir du cholestérol, sont "recyclés" et utilisés en moyenne trois fois pendant un même repas. L'hydrolyse des sels biliaires conjugués (les acides biliaires doivent être conjugués à la taurine et à la glycine pour être solubles) rend nécessaire la synthèse de sels biliaires supplémentaires, ce qui conduirait à une réduction du cholestérol (Liong et Shah,2005).

Bien que la déconjugaison des sels biliaires puisse avoir des effets bénéfiques sur l'hôte, comme la diminution des niveaux de cholestérol, une déconjugaison excessive ou une déshydroxylation des acides biliaires par certains microorganismes semble avoir plusieurs effets néfastes sur l'hôte. Les bactéries les plus fréquemment désignées comme probiotiques, telles que les souches des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, sont incapables de déshydroxyler les sels biliaires déconjugés.

L'effet est dû à l'enzyme bactérienne Bsh ou hydrolase des sels biliaires. Déconjugés, les sels biliaires sont moins solubles et donc plus facilement éliminés via les selles. Cela diminue leur réabsorption et leur recirculation des sels biliaires vers le foie. Par conséquent, l'organisme a besoin de plus de cholestérol pour la synthèse de novo des sels biliaires. L'activité Bsh dépend de la capacité des probiotiques à survivre dans le milieu acide des sécrétions digestives et de coloniser l'intestin. Cependant, cette activité Bsh n'est pas sans effet secondaire : une formation excessive d'acides biliaires déconjugés aboutit à une stéatorrhée et à la formation d'acides biliaires secondaires toxiques

(Vizoso Pinto, 2006).

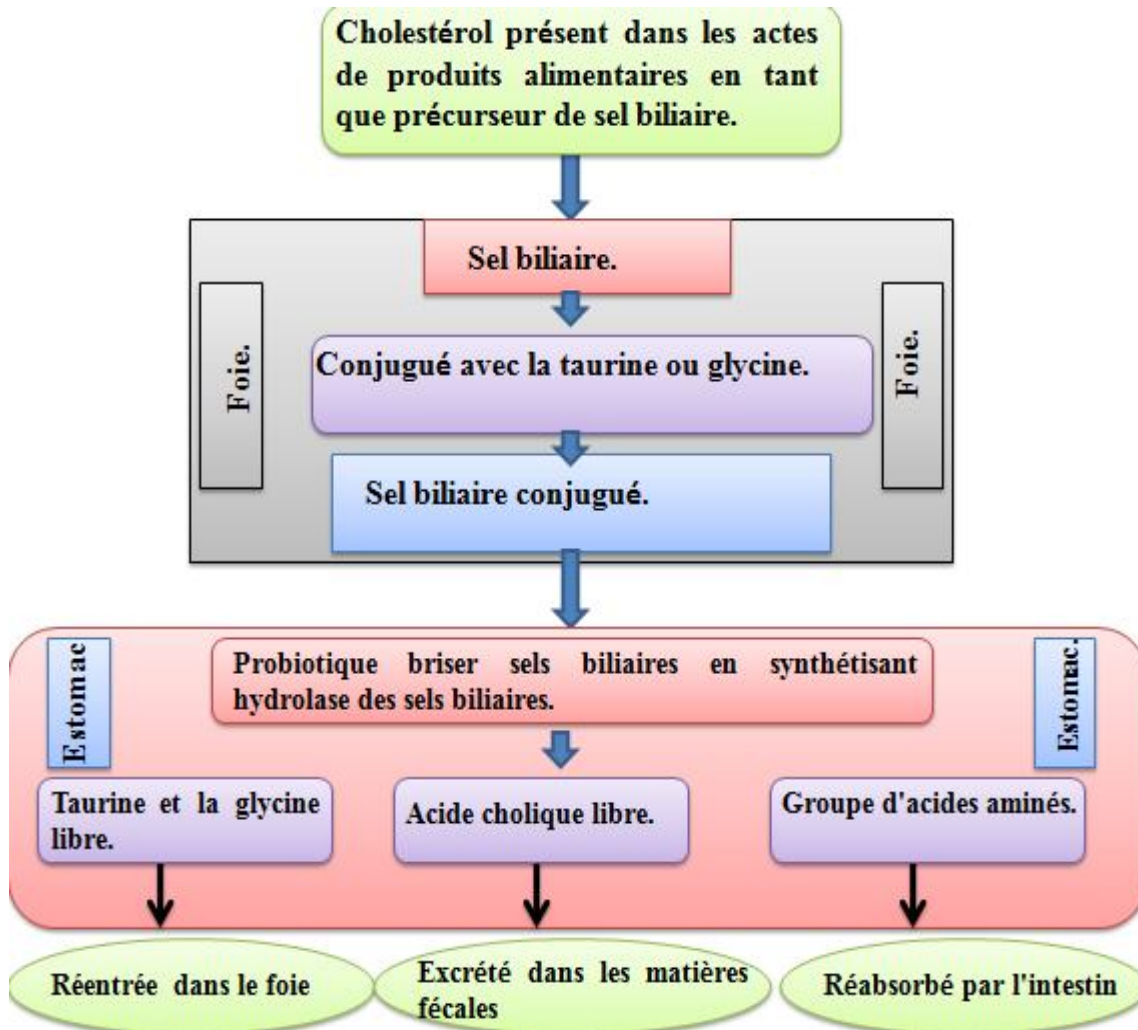
Une autre explication évoque une diminution du taux de cholestérol qui serait uniquement due à la co-précipitation du cholestérol avec les sels biliaires déconjugés, phénomène qui ne peut pas se produire in vivo car le pH est plus élevé que dans un milieu de culture acidifié. Des études ont été réalisées sur des humains pour tester l'influence de la consommation de produits laitiers fermentés sur le taux de cholestérol sanguin, mais les résultats n'ont jamais été concluants (Pereira et Gibson ,2002).

Dans d'autre expérience, Ngyeur a démontré que *lactobacillus plantarum* PHO4 a réduit le taux de cholestérol chez les souris hypercholestérolémique.

En outre, l'addition de *lactobacillus plantarum* JR 64 est capable de dégrader le cholestérol à la koprostanol (un stérol) qui ne peut pas être absorbé par les intestins, puis le koprostanol et les résidus du cholestérol sont excrétés ensemble.

Un autre mécanisme en abaissant le taux du cholestérol est par la formation du composé d'acide gras insaturé d'acide propionique qui empêche la synthèse du cholestérol par inhibition du coenzyme 3 hydroxy 3- metilglutaril (HMG COA) ainsi il n'ya pas formation de mévalonat (Harianto ,1996 et Napitipulu ,2003) .

Nos résultats sont en accord avec plusieurs travaux ayant prouvés l'activité anticholestérolémiant de bactéries lactiques probiotiques (Jin et al. 1998 ; Mahdavi et al. ,2005).



**Figure 41:** Mécanisme de réduction du cholestérol de micro-organisme probiotique.

2- Les teneurs en triglycérides du plasma chez les rats témoins et expérimentaux (figures 40 et tableau 7(annexe 6)).

Lors du premier prélèvement, on observe un taux élevé de triglycérides, atteignant 1,49g/l pour les rats du lot 03, et 1,14g/l pour les témoins +, 1.29 g/l pour les témoins -, et diminue au fur et à mesure jusqu'à la semaine 3 arrivant à des concentrations très basses de **0.74**, **0.27** et **0.64** g/l pour les lots 3, 2,1 respectivement (Figure40).

Le taux de triglycérides reste stable chez les rats du lot 01 et des lots 03 consomment les symbiotiques. Ces valeurs obtenues augmentent à la semaine 4 puis diminuent progressivement jusqu'à la dernière semaine.

Concernant le lot 02, le taux de triglycérides augmente progressivement entre les semaines 03 et 05, se situant entre 0.27 g/l et 0.60g/l.

Les acides gras issus de l'alimentation proviennent majoritairement des triglycérides. La digestion de ces triglycérides est sous la dépendance des enzymes pancréatiques et des sels biliaires. Cette réaction entraîne la libération de molécules d'acides gras et des monoglycérides qui sous l'action des sels biliaires sont regroupées sous forme de micelles qui sont absorbées. Les acides gras à courte chaîne quant à eux parviennent à entrer directement dans les capillaires sanguins. Une fois

dans les cellules intestinales, les acides gras issus des micelles sont activés et réutilisés pour la synthèse des triglycérides qui rejoignent la circulation sanguine sous forme de chylomicrons.

Ces acides gras sont alors captés par le foie, le tissu adipeux et le muscle. Le type d'utilisation

De acides gras dépend de leur structure (RAMIREZ et al., 2001).

Ce qui peut expliquer qu'un régime riche en lipides puisse conduire à une augmentation des apports énergétiques, et entraînant à long terme une augmentation de la masse adipeuse (Blundelle et King, 1996)

Ceci peut expliquer l'augmentation du poids des rats expérimentaux consommant le régime

hyperlipidique hypercalorique par rapport à leurs témoins consommant le régime standard, qui est en accord avec les travaux de Milagro et al. (2006) qui ont indiqué qu'un régime hyperlipidique chez le rat Wistar induit une augmentation de la prise alimentaire et du poids corporel avec une accumulation des lipides dans le tissu adipeux.

Dans notre étude, l'introduction d'une concentration définie de prébiotique F.O.S (1g) ainsi que *lactobacillus plantarum* a réduit le taux de triglycéride chez les rats alimentés avec le régime riche en lipide.

On note que le triglycéride est le paramètre le plus affecté par l'alimentation quotidienne de *lactobacillus plantarum* et F.O.S.

Plusieurs expériences *in vitro* avec lactobacilles (De Smet et al., 1998 ; Lion et al., 2005) et la bifidobactérie (Tanaka et al., 1999 ; Scand, 2004) ont fournis les preuves que quelques souches de ces bactéries ont le potentiel d'assimiler le cholestérol en présence des acides biliaires.

Une étude de Delzenne et Kok en 1999 a permis de mettre en évidence l'effet hypotriglycéridémique des F.O.S Raftilose chez des rats qui ont consommé des repas contenant 10 % (p/p) de F.O.S pendant 4 à 5 semaines. Des dosages réalisés 15 heures après les repas ont montré une diminution des triglycérides sanguins, corrélée à une réduction de l'activité des enzymes lipogéniques dans des prélèvements de tissus hépatiques.

L'ingestion de F.O.S a augmenté la teneur en bactéries lactiques dans le cæcum, ainsi que la concentration de lactate et de butyrate.

Ces études ont montré que les enzymes digestives humaines ne reconnaissent pas les liaisons  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) des F.O.S [Roberfroid, 2002]. Par contre, les bactéries lactiques, notamment les bifidobactéries, ont adapté leur équipement enzymatique pour dégrader les F.O.S avec une activité  $\beta$ -fructofuranosidase capable d'hydrolyser les liaisons  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) [Perrin et al., 2002].

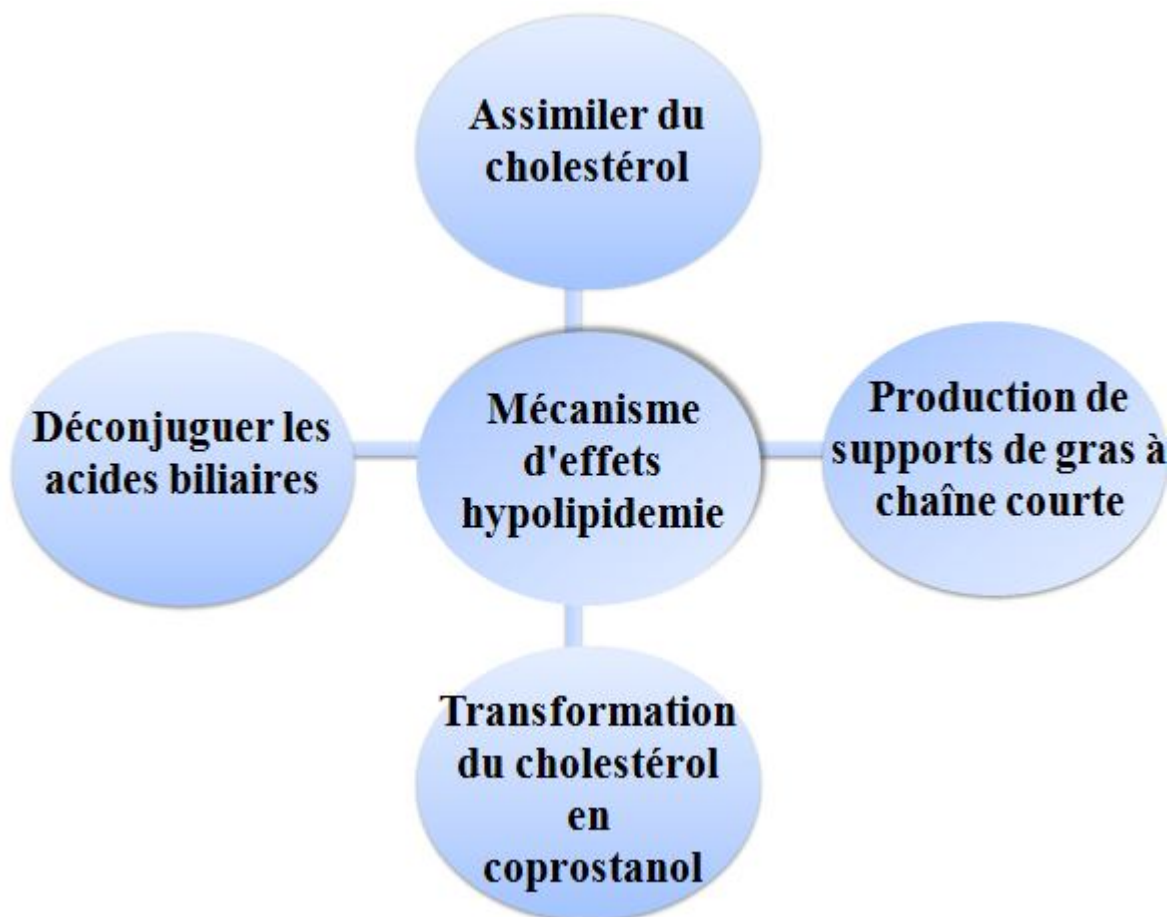
Les résultats trouvés sont en accord avec ceux de Fiordaliso et al. (1995), Takase et al. (1994) et Davidson et al. (1998) qui rapportent que certains oligofructoses diminuent la concentration des triglycérides et du cholestérol.

Fazeli et autre, (2010) rapportaient que la consommation de *L.17 plantarum* (108 cfu /ul) pendant 14 jours était efficace en abaissant des niveaux des lipides sériques chez les rats.

Tarento et autre, (2000) rapportaient que l'administration de *lactobacillus reutri* était efficace en empêchant l'hypercholestérolémie chez les souris et observaient une diminution en cholestérol total (22%) et triglycérides (33%).

Les résultats de cette étude indiquent que *lactobacillus plantarum* à le potentiel de réduire le cholestérol sérique, et les niveaux de triglycerides.

Ces résultats sont conformes à autre études qui rapportaient l'efficacité des bactéries lactiques : par exemple *L. casei* (Nguye et al.,2007), *L.* (Mirlohi et al.,2009;Kawase et al.,2000) et *lactobacillus plantarum PHO4* (Taranto et al., 1998).



**Figure 42:** Mécanisme des effets hypolipidémiques de probiotiques.

Am. J. Food Technol., 7 (5) :251-265,2012

*Le poids de quelques organes internes.*

**Tableau 16 :** Poids des quelques organes internes

<i>lot</i>	<b>Lot 01 « témoin - »</b>	<b>Lot 02 « témoin + »</b>	<b>Lot 03 (NSCA1)</b>
<i>Poids</i>			
<b>Le foie</b>	<b>7.25</b>	<b>9.135</b>	<b>8.114</b>
<b>Le cœur</b>	<b>1.10</b>	<b>0.924</b>	<b>0.77</b>

Le régime hypergras induit une augmentation très significative du poids des foies et cœurs chez les rats **témoins (+)** par rapport aux témoins (-). (fig.43)

Cela correspond aux résultats de MILAGRO et *al* (2006) qui montrent que le poids corporel total du foie a augmenté (6%) chez les rats nourris avec un régime riche en matière grasse en comparaison avec le groupe témoin.

La lipogenèse convertit les substrats provenant du catabolisme des glucides ainsi que du catabolisme des acides aminés en acides gras. Ces acides gras nouvellement synthétisés pourront être utilisés par les tissus ou stockés sous forme de triglycérides.

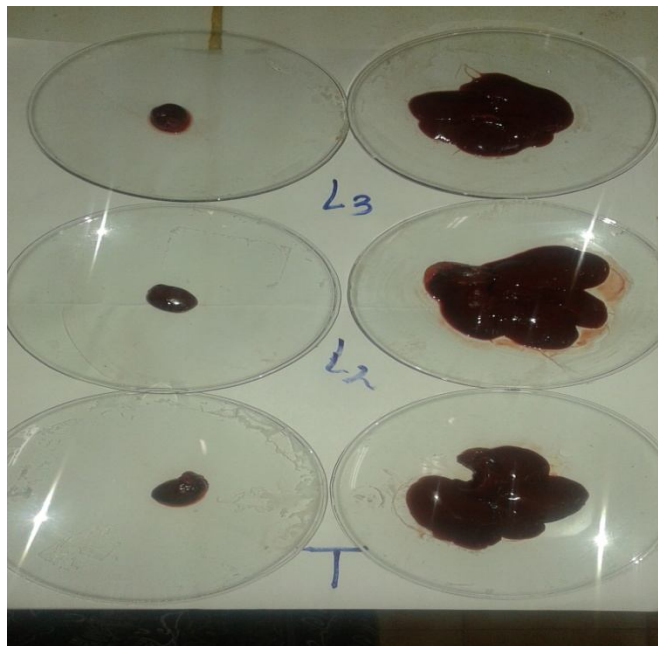
Chez les mammifères, la lipogenèse a lieu majoritairement dans le foie et le tissu adipeux où elle est 10 à 1000 fois supérieure comparés aux autres tissus (Hillgartner et *al.*, 1995). Les glandes sébacées et les glandes mammaires des mammifères synthétisent également les

acides gras à un taux élevé (Hillgartner et *al.*, 1995). Dans le muscle, la synthèse des acides gras est plus faible que celle du tissu adipeux et du foie chez le rat (Carbó et *al.*, 1991).

Les résultats de l'étude macroscopiques ont montré que les rats male de lot 01 qui n'ont pas reçus aucun traitement, montrent des signes d'infections au niveau du foie, par rapport aux rats expérimentales.

Le tissu hépatique présentait des zones blanchâtres témoignant la présence d'un kyste, Probablement due à une inflammation.

Une étude de 2001 par des chercheurs suédois de l'Université de Lund a exploré les propriétés et l'utilisation de *Lactobacillus plantarum*. Cette souche particulière provient de la muqueuse intestinale de l'homme. Sujets des animaux avec cette souche bactérienne ont montré amélioration de l'état du foie et une réduction de l'inflammation des muqueuses.



**Figure 43** : Aspect des foies et des cœurs.



**Figure 44:** une anomalie au niveau de foie du rat témoin.

# Conclusion Et Perspectives

Le screening des bactéries lactiques appartenant au genre *lactobacillus* et *bifidobacterium* à été effectuées à partir du lait de différentes régions d'Algérie.

Les 10 isolats ont subit des tests physiologiques et biochimiques pour l'identification de l'espèce. les espèces sont *lactobacillus* Sp (70 % ,*bifidobacterium*Sp 30%).

Parmi les 10 souches, une seule souche ( *lactobacillus plantarum* NSCA1 ) a montré de bonnes aptitudes pour résister aux conditions hostiles du tractus digestif (acidité, concentration élevées en sels biliaries, pouvoir antagoniste vis-à-vis des entérobactéries, et la résistance à un panel de 18 antibiotiques).

Le but de ce mémoire était d'amener le lecteur, d'un concept « probiotique » vers les preuves d'efficacité dans les domaines métabolique, et digestif de l'hôte.

L'objectif des probiotiques étant d'apporter, à un moment donné, une barrière de défense contre des agents pathogènes, et une aide pour la flore intestinale locale en vue de se repeupler. Une fois l'équilibre intestinale rétabli, le relais doit être pris par les prébiotiques, fibres alimentaires non-digestibles, aliment bactérien.

Ces prébiotiques assurent le bon équilibre et le maintien de la thérapeutique probiotique. Ce phénomène de symbiose montre qu'il est bien difficile de maintenir la flore intestinale en bon état sans une alimentation correcte et une hygiène de vie saine, à moins de consommer un complément alimentaire prébiotique adéquat.

A travers notre étude, il ressort que l'utilisation du probiotique (*Lb . plantarum* ) avec le prébiotique ( F.O.S ) dans les régimes alimentaires des rats wistar a montré que les effets les plus probants se font sur les performances zootechniques mais également sur les résultats biochimiques obtenus, entraînant une incidence économique et sanitaire favorable non négligeable.

La comparabilité entre les trois lots a été vérifiée concernant le poids initial, la souche, les conditions d'élevage et les régimes alimentaires.

Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

- Il a été mis en évidence, en faveur du lot expérimental une différence significative pour l'évolution pondérale des rats aussi bien en croissance qu'en finition.
- Les rats (de type wistar) du lot expérimental ont présenté un I.C. améliorés par rapport aux témoins.
- Malgré un effet peu probant sur le poids des abats, le probiotique *lactobacillus plantarum* a tout de même un effet sur les autres résultats zootechniques.



- L'étude biochimique des paramètres sanguins révèle cependant que les rats sous pro/prébiotique ont une cholestérolémie et triglycéridémie plus bas que ceux ayant ingéré une ration classique ou hyper lipidique, ces résultats sont dus à l'action du *Lb.plantarum* sur le métabolisme lipidique des rats et leur effet sur l'absorption intestinale des produits terminaux du métabolisme.

Ceci permettrait certainement d'obtenir des animaux en meilleur forme physique et susceptibles de donner les meilleures performances en matière de qualité sanitaire pour l'homme, ce qui concilierait le profil économique et l'utilisation des substances non médicamenteuses.

Les concepts probiotique et prébiotique appliqués à l'écosystème digestif sont ainsi originaux et séduisants. Ils satisferont sûrement les adeptes des traitements dits naturels qui souhaitent éviter l'utilisation excessive de médicaments. Cependant, de nombreuses études *in vivo* sont encore nécessaires afin de valider leur efficacité en tant que traitement préventif ou curatif.

L'approche symbiotique semblerait intéressante en préventif pour lutter contre des infections récidivantes. L'avenir des lactobacilles à potentiel probiotique et des fOS à effet prébiotique au sein de l'écosystème digestif est donc prometteur...

### **Perspectives :**

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives. Donc pour compléter ce travail sur la flore lactique, nous proposons :

- D'une étude *in vivo* des propriétés probiotiques des souches possédant des bonnes aptitudes *in vitro* (par exemple l'adhésion aux cellules épithéliales humaines).

- D'une meilleure caractérisation des activités enzymatiques des souches bactériennes, car la qualité des produits fermentés passe par une meilleure connaissance des activités métaboliques des bactéries lactiques.

- Application du génie génétique pour la sélection des souches améliorées afin de produire des cultures probiotiques à usage thérapeutiques.

- Etude supplémentaire sur le potentiel probiotique des souches, surtout l'activité lipolytique.

- Etude de l'association entre les bactéries lactiques et les ferments lactiques dans le lait camélin

# Références Bibliographique

**AFSSA** (2003) Alimentation infantile et modification de la flore intestinale. Rapport du groupe de travail. <http://www.afssa.fr>.

Am. J. Food Technol., 7 (5) :251-265,2012.

**Amara (2012)**: effets probiotiques des bactéries lactiques sur le poulet de chair, laboratoire de biologie des microorganismes et de biotechnologie, université d'Oran Es-Sénia.

**Ammor** M.S. et Mayo B., 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science*. 76 : 138-146.

**Aslam** S. et Qazi J.I., 2010. Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. *Pakistan . J. Zool.* 42 (5) : 567-573.

**Awaad**, M. H. H., 2001. Effect of pediococcus acidilactici on layer hens zootechnical performance. Internet 2001.

**Axelsson** L., 2004. Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.).<sup>3e</sup> Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66.

**Badis**, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.E., Kihal, M. (2004). Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*, 21: 343–349.

**Bartosch** S., Woodmansey E. J., Paterson J. C., McMurdo M. E., & Macfarlane G. T., 2005. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 40, 28-37.

**Baumgart D. C., & Dignass A. U.**, 2002. Intestinal barrier function. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 5, 685-94.

**Belyagoubi**, L. and Abdelouahid, D.E. (2013). Isolation, identification and antibacterial activity of lactic acid bacteria from traditional algerian dairy products. *Advances in Food Sciences*. 35 (1) :84-85

**BENT MOHAMED** A. et **MINT SIDI BABA** A. (2007). Manuel de travaux pratiques de microbiologie. Université de Nouakchott faculté des sciences et techniques département de Biologie.

**Berg** R. D., 1998. Probiotics, prebiotics or ‘conbiotics’. *Trends in Microbiology*, 6, 89-92.

**Blundell** JE., King NA. (1996). Overconsumption as a cause of weight gain: behavioural physiological interactions in the control of food intake (appetite). In: Chadwick DJ, Cardew GC. The origins and consequences of obesity. Chichester (Royaume-Uni), Wiley,: 138-158.

**Bornet** F. (2001) Fructooligosaccharides et autres fructanes : chimie, structure et effets nutritionnels. Industries Alimentaires et Agricoles juill -aout:74-80.

**Broadbent** J.R., 2001. Genetics of Lactic Acid Bacteria. In : Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.). 2<sup>e</sup> Ed., Marcel Dekker, Inc. New York .243-300.

**Bruno** F.A, Lankaputhra W.E.V and Shah N.P.(2002): Growth, viability and activity of Bifidobacterium spp. in skim milk containing prebiotics, *Journal of Food Science*,67; 2740 – 2744.

**Burns** P., Vinderola G., Binetti A., Quiberoni A., de los Reyes-Gavilan C.G. et Reinheimer J., 2008. Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *Int. Dairy J.* 18: 377-385

---

### C

**Calder** P.C. and Kew S. (2002): The immune system: a target for functional foods. *Br. J. Immunol, Microbiol Infec Dis* . 30: 111- 118.

**Çakir İ** . (2003): Determination of some probiotic properties on Lactobacilli and Bifidobacteria Ph.D. Thesis. Ankara University p. 84.

**Carbó** N., López-Soriano FJ., Argilès JM.(1991). Effects of starvation on the tissular lipogenic rate in the obese zucker rat. *Biochem. Int.* 24 : 1043-1049.

**Champagne** et al., (1992). In Boudjani, W. (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.

**Cocaign-Bousquet** M., Garrigues C., Loubière P. and Lindley N. (1996) Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:253-267.

**Collins** M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. et Wallbanks S., 1993. Taxonomic studies of some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.*(75): 595 - 603.

**Dalache**, M. Kacem et N.E. Karam. Antibiorésistance de bactéries lactiques isolées de laits crus de vache, chèvre, brebis et chamelle d'Algérie. *Renc. Rech. Ruminants*. (2003) p 231.

Dalache F., Karam H. et Karam N.E. Effet inhibiteur de bactéries lactiques sur différentes bactéries pathogènes et d'altération dans différents milieux sélectifs et différentes conditions caractérisation de l'agent inhibiteur. Faculté des Sciences Agronomiques et des Sciences Biologiques - Université Hassiba Ben Bouali (2010).

**Dellaglio** F., de Roissard H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage*. 1: 25-116.

**Delzenne** N. (2003) Oligosaccharides : state of the art. Proceedings of the nutrition society 62:177-182.

**Deng** Y., Ryu J. H., Beuchat L.R. (1999): Tolerance of acid adapted and non adapted *Escherichia coli* O157:H7 cells to reduced pH as affected by type of acidulant. *J. Appl Microbiol.* 88: 203 – 210.

**Desmazeaud** M.J. 1983. L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait*. 63 p (267-316)

**Desmazeaud**, M. (1996). L'état des connaissances en matière de nutrition de bactéries lactiques. *Le lait*, 63: 267-16.

**De Smet** I, De Boever P, Verstraete W. Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. *Br J Nutr* 1998; 79(2):185-94.

**Dortu**, C. et Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 143-154.

**Ducluzeau, R. (1969)**. "[Influence of the zoological species on the microflora of the gastrointestinal tract ]" *Rev Immunol Ther Antimicrob* 33(6) : 345-83.

**Dunne** C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan G. C., Shanahan F., & Collins J. K, 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in Vivo* findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 386-392.

**Duobos, R., R. W. Schaedler, et al.** (1963). "Composition, Alteration, and Effects of the Intestinal Flora." *Fed Proc* 22 : 1322-9.

### ***E***

---

**Euzéby**. J.P, (2002 a) :Nomenclature bactérienne. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire.

**Even** S., Lindley N.D. et Cocaign-Bousquet M., 2003. Transcriptional, translational and metabolic regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 grown in continuous acidic cultures. *Microbiology*. 149 : 1935-1944.

### ***F***

---

**FAO/WHO** (2001) Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation.

**Fazeli**; J Moshtaghian; M Mirlohi; M Shirzadi, Iran Journal of Diabetes Lipid Disorders, 2010, 9, 1-7.

**Font** de Valdez, G. (2002). Maintenance of Lactic Acid Bacteria. In Food Microbiology Protocols. Spencer, J. F. T et Ragout de Spencer, A. L. eds Humana Press.Totowa, New Jersey, Argentine. 163-171.

**Fooks** L.J and Gibson G.R .(2002): Probiotics as Modulators of the Gut Flora. *British Journal of Nutrition* 88, 1; S39 - S49.

**Franck** A. (2002) Prébiotiques. In : Aliments Fonctionnels. Ed Tec & Doc, Londres-Paris-NewYork, 104-123.

**Fuller**. R, (1989): Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* , 66: 365-378.

**Fleming** H.P., Etchells J.L. et Costilow R.N., 1975.Microbial inhibition of isolates of *Pediococcus* from cucumber brine. *Appl. Env. Microbiol.* 30: 1040 -1042.

### ***G***

---

**Gérard, P. and A. Bernalier-Donadille** (2007). " Les fonctions majeures du microbiote intestinal. " *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **42**(Supplement 2) :28-36.

**Gill** H.S. (2003): Probiotics to enhance anti- infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*17: 755 – 73.

**Gilliland** SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 1985;49: 377-381.

**Goldin B.**, Gorbach S., Saxelin M., Barakat S., Gualtieri L. and Salminen S. (1992) Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastroin testinal tract. *Digestive Diseases and Sciences* 37(1):121-128.

**Gosselink M. P.**, Schouten W. R., van Lieshout L. M., Hop W. C., Laman J. D., & Ruseler-van 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.

**Gravesen, A.**, Ramnath, M., Rechinger, K.B., Andersen, N., Jänsch, L., Héchard, Y.,

Hastings, J.W., Knochel, S. (2002). High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *L. monocytogenes*. *Microbiology*, 148: 2361-2369.

**Grizard D.** and Barthomeuf C. (1999) Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents : mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reproduction, Nutrition, Development* 39(56):563-588.

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

**Gueimonde M.** and Salminen S. (2003) Probiotics : efficacy in gut health promotion. *Nutrafoods* 2(2):13-21.

**Gunes, H.**, Cerit, H., Altinel, A., 2001. *Ist.Univ.Vet.Fak.Derg.*, 27, 217-229.

**Guiraud J.P.** et Rosec J.P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR*. 237-251.

**Gusils C.**, Chaia A.P., Olivier G. et Gonzalez S., 2010. Microtechnique for identification of lactic acid bacteria. *Methods in molecular biology*, Vol. 268: *Public Health Microbiology: Methods and Protocols*. Humana Press. Totowa. 453- 458.

---

## H

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

**Haryanto, B.** 2002. Penggunaan Probiotik dalam Pakan untuk Meningkatkan Kualitas Karkas dan Daging Domba. *J. Ilmu Ternak dan Veteriner*. Vol 5 (4). HLM 224-228.

**Hartke 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.

**HARKNESS, J.E.**, WAGNER, J.E. 1983. *The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents*

(2nd Ed.). Lea & Febiger, Philadelphia, PA.

**Hassan** A.N. et Frank J.F., 2001. Starter Cultures and their use. *In: Applied Dairy*

*Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) 2<sup>e</sup>Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 151-205.

Hemme, C. Foucaud-Scheunemann. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy* . (2004) 467–494.

**Héchar**d, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y., Frère, J. (2001) Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis* : a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, 147: 1575-1580.

**Hidaka**, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T., and Tashiro, Y. (1986). Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora* 5, 37-50.

**Hillgartner** FB., Salati LM., Goodridge AG. (1995). Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol. Rev.* 75 : 47-76.

**Ho** T.N.T., N. Tuan N., Deschamps A. et Caubet R., 2007. Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*. 134-142.

**Hogg** T., 2005. Essential microbiology. *John Wiley & Sons*, Ltd. 188-190.

<http://www.probiotic.org/lactobacillus-plantarum.htm>

<http://aliments-sains.santeverte.org/prebiotiques-fructo-oligosaccharides-fos.html>

**Huang** C.H. & Huang S.L., (2004): Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation, and liver glutathione level of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O.aureus*: Fed oxidized oil. *Aquaculture*, 237, 381-389.

---

## I

**Idoui** T; Boudjerda, D; Leghouchi E and Karam N-E.(2009). ACTIVITE PROBIOTIQUE DE LACTOBACILLUS PLANTARUM: ETUDE REALISEE CHEZ LE POULET DE CHAIR ISA 15. Huitièmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo, 25 et 26 mars 2009.

**Idoui** . T. , Boubjerda.D., Karam. N., Leghouchi. E. Rôle des probiotiques et d'un médicament hypocholestérolémiant dans une hyperlipémie expérimentale : Etude réalisée chez le rat Wistar. Les 6<sup>emes</sup> Journées Nationales de Microbiologie, Faculté des Sciences Agronomiques et des Sciences Biologiques - Université Hassiba Ben Bouali, 27 et 28 octobre 2010.



**Idoui T.** et Karam N.E., 2008. Lactic acid bacteria from Jijel's butter: isolation, identification and major technological traits. *Gr.Y.Aceites*. 59(4): 361-367.

**Isolauri E., Kirjavainen P. V., & Salminen S.,(2002).** Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut*, 50, 54-59.

**Isolauri E., Arvola T., Sutas Y., Moilanen E. and Salminen S. (2000)** Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy* 30(11):1604-1610.

---

### **J**

**Jedidi, H. (2007).** Effet du stress gastro-intestinal sur la physiologie et le métabolisme des bactéries lactiques et probiotiques. Mémoire de Maître Es-Sciences, Institut de biologie, Université de Tlemcen. Université Laval Québec. 90 pages.

**Jiang T., Mustapha A., & Savaiano D. A., 1996.** Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Sciences*, 79, 750-757.

**Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N., Ali, M., Jalaludin, S., 1998.** *Poult.Sci*, 77, 1259-1265.

---

### **K**

**Kabir, S.M.L., Rahman, M.M., Rahman, M.B., M.M. Rahman and S.U. Ahmed., 2004.** The Dynamics of Probiotics on Growth Performance and Immune Response in Broilers. *Poult. Sc.*, 3 (5): 361-364.

**Kaplan H. and Hutkins R. (2000)** Fermentation of fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66(6):2682-2684.

**Kaur I. P., Chopra K., and Saini A.(2002):** Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J.Pharm. Sci.* 15(1): 1–9.

Kawase M, Hashimoto H, Hosoda M, et al. Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J Dairy Sci* 2000; 83(2):255-63.

**Khalid N.M. et Marth E.H., 1990.** Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73: 158-167.

**Kilstrup M., Jacobsen S., Hammer K., Vogensen F.K., (1997):** Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 1826–1837.

**Kim Y**, Whang JY, Whang KY, Oh S, Kim SH. Characterization of the Cholesterol-reducing Activity in a Cell-free Supernatant of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 2008;72: 1483-1490.

**Kimoto H**, Ohmomo S, Okamoto T. Cholesterol Removal from Media by Lactococci. *Journal of Dairy Science* 2002; 85(12): 3182-3188

**Kimura K.**, McCartney A. L., McConnell M. A., & Tannock G. W., 1998. Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3394-3398.

**Kostinek, M.**, Specht, I., Vinod, A., Edward., Ulrich Schillinger, U., Hertel, C.,

Wilhelm, H., Holzappel., Charles, M. A. P., Franza. (2006). Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 527–540.

**KRAUS, A.L.** 1980. Research Methodology. In: *The Laboratory Rat*. Vol. II, Research Applications (H.J. Baker, J.R. Lindsey, S.H. Weisbroth, eds.). Academic Press, New York, NY. pp. 1-4.

---

### ***L***

**LANE-PETTER, W.**, PEARSON, A.E.G. 1971. *The Laboratory Animal. Principles and Practice*. Academic Press, New York, NY.

**Lanjar S** , Djumali M, Anas M. , Khaswar S , Nastiti S , and Bambang P., 2011. Ability of *Lactobacillus plantarum* JR64 isolated from noni juice in lowering Cholesterol *in vivo*. *Internat. J. of Sci. and Eng. Vol. 2(1):17*.

**Larpent J.P.**, 1997. *Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier*. Paris. 10-72.

**Leclerc H.**, Gaillard F L. et Simonet M., 1994. Les grands groupes de bactéries. In: *Microbiologie générale: la bactérie et le monde microbien. DOIN*. Paris. 445.

**Leveau J.Y.**, Boiux M. et De Roissart H.B., 1991. La flore lactique: technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. 2<sup>e</sup> Ed., *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 3: 2-40. **Liévin – Le Moal V.**, Servin A. L. (2006): The front line of enteric host defence against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides and microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 19 (2):315 -37.

**Lilly D .M. , & Stillwell R.H .,** 1965.probiotic : growth-promoting factors produced by micro-organisms , science , 147, 747-748.

**Liong M. T.and Shah N. P.,** 2005.Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co-precipitating properties.*Food Research International.*,38 pp: 135-142.

**Liong MT, Shah NP.** Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *J Dairy Sci* 2005; 88(1):55-66.

---

### **M**

**Mahdavi, A.H., Rahmani, H.R., Pourreza, J.,** 2005. *Int. J.Poult. Sci.*, 4, 488-492

**Mahrous Hoda; UF Shaalan; AM Ibrahim,** *International Research Journal of Microbiology*, 2011, 2, 242-248.

**Malin M., Suomalainen H., Saxelin M. and Isolauri E. (1996)** Promotion of Ig A immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. *Annals of Nutrition and Metabolism* 40(3):137-145.

**Man J.C., de Rogosa M. and Sharpe, ME.**A médium for the cultivation of lactobacilli, *Appl.Bact.* (1960) 23,130-135.

**MARCHAL N., OBRE A., BUTTION R., BOUDON J.L. et RICHARD C.L. (1982).** Les Milieux de Cultures pour l'Isolément et l'Identification Biochimique des Bactéries. DOIN, 2ème Ed., Paris.

**Marteau P. et Seksik P.,** 2004.Place des probiotiques dans la prévention et le traitement des diarrhées postantibiotiques. *Re. Fran. Lab.*73-76.

**Mathara J.M., Schillinger U., Guigas C., Franz C., Kutima P.M., Mbugua S.K., Shin H.K. et Holzapfel W.H.,** 2008.Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int. J. FoodMicrobiol.* 126 : 57-64.

**Matsumoto M., & Benno Y.,** 2004. Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutation Research*, 568, 147-153.

**McDonald L.C., Fleming H.P. et Hassan H.M.,** 1990.Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *App. Env. Microbiol.* 56 (7): 2120-2124.

**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. *In Optimistic Studies* (Heinemann W., Ed.), pp. 1-100. G. P. Putnam and Sons, London, UK.

**Milargo FI.**, Campion J., Martinez JA. (2006). Weight gain induced by high fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity*. 14: 1118-1123.

**Mirlohi M.** Soleimanian-zad S, Dokhani SH, et al. Investigation of acid and bile tolerance of native lactobacilli isolated from fecal samples and commercial probiotics by growth and survival studies. *Iran J Biothechnol* 2009; 7(4):233-240.

**Montes R.**, Bayless T., Saavedra J. and Perman J.(1995) Effect of milks inoculated with *Lactobacillus acidophilus* or as a yogurt starter culture in lactose-maldigesting children. *Journal of Dairy Science* 78(8):1657-1664.

**Moore W. E. C.**, Holdeman L. V.,(1974).Human faecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology*, 27, 961-979.

---

### N

**Nannen NL**, Huntkins RW, (1991): Proton-translocating adenosine triphosphatase activity in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 74: 747-751.

**Napitupulu.** 2003. Daya Ikat Kolesterol dan Produksi Asam Organik Isolat Lactobacillus Terseleksi untuk Penurun Kolesterol. Abstrak Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia. 29-30 Agustus 2003. Hal 137. Bandung.

**NEALE**, R.J. 1982. Coprophagy in iron-deficient rats. *Lab. Anim.* 16, 204.

**Nguyen TD**, Kang JH, Lee MS. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int J Food Microbiol* 2007; 113(3):358-61.

**Novel G.**,(1993). Les bactéries lactiques, in: Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Lavoisier, Paris, 171-329.

---

### O O'Sullivan

E.et Condon S., 1997. Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *App. Env. Microbiol.*63 (11) : 4210-4215.

**Ouwehand A.C.** and,Vesterlund S.,2003.Health aspects of probiotics and drugs. Thèse doctorat. Université Laval. Québec.,6 pp :573-580.

**Ozturk**, E., Yildirim, A., 2004. U.Zoot.Bil.Kon, 1-3.

---

### P

- Parker R.B ., 1974 .** probiotics, the other half of the antibiotic story . animal nutrition and health , 29 , 4-8.
- Patterson, J. A. and K. M. Burkholder (2003).** "Application of prebiotics and probiotics in poultry production." *Poultry Science* **82**(4) : 627-631.
- Pereira D. I. A. and Gibson G. R., 2002.**Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*,37pp:259-281.
- Perrin S., Fougnyes C., Grill J., Jacobs H. and Schneider F. (2002)** Fermentation of chicory fructo-oligosaccharides in mixtures of different degrees of polymerisation by three strains of bifidobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 48(8):759-763.
- 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.
- PETTY, C. 1982.** Research Techniques in the Rat. Charles C. Thomas, Springfield, IL.
- Picard C., 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.
- Pigeon RM, Cuesta EP, Gilliland SE.** Binding of Free Bile Acids by Cells of Yogurt Starter Culture Bacteria. *Journal of Dairy Science* 2002;85: 2705-2710.
- Pilet M.F., Magras C., Federighi M., 2005.** Bactéries lactiques. In: bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2<sup>e</sup>Ed., *Economica*. Paris. 219-240.
- Playne M. and Salminen S. (2002)** Health benefits of probiotics : human studies and clinical trials. *Nutrafoods* 1(1):5-11.
- 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. *International Microbiology*, 7, 59-62.
- Pot B., 2008.**The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*.Paris.1-106.
- Prioult, G. (2003).** Effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la  $\beta$ -lactoglobuline chez la souris et étude de leurs mécanismes d'action. Thèse université Laval Québec.

**RAMIREZ M, AMATE L, GIL A (2001).**Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Hum Dev.* 65:95-101.

**Roberfroid M. (2002)** Functional food : concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* 87(suppl2):139-143.

**Rodrigues et al. (2002).** In Boudjani,W. (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. Pages 73

**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.

**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.

**Rousseau Virginie, 2004.** Evaluation d'oligosaccharides à effet probiotique vis-à-

vis de la microflore vaginale. Actions des lactobacilles vis-à-vis des microorganismes potentiellement pathogènes. Thèse de Doc, Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bio ingénieries 34, Toulouse.

**Roy Vincent (2006) :** Caractérisation de gènes codant pour des protéines de surface de la bactérie *actinobacillus pleuropneumoniae* à l'aide d'un procédé d'invasion de cellules HeLa .*thèse. Trois-Rivières, Université du Québec à Trois-Rivières*, 166 p.

**Runho, R.C., Sakomura, N.K., Kuana, S., Banzatto, D., Junoqueria, O.M., Stringhin, J.H., 1997.**Rev. Bras. Zoot, 26, 1183- 1191.

---

## S

**Savage, D. C. and R. J. Dubos (1967).** "Localization of Indigenous Yeast in the Murine Stomach." *J bacteriol* **94**(6) : 1811-1816.

**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.

- Sanders M.** and Huis in't Veld J. (1999) Bringing a probiotic-containing functional food to the market : microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:293-315.
- Salmimen S.**, Von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassard D., de vos W. M., Fonden R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S. E., & Mattila Sandholm T., 1998. Demonstration of safety of probiotics- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 93- 106.
- Scand J** Gastroenterol 2004; 39 (12): 1266-71.
- Schrezenmeir J.**, & de Vrese M., 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 361- 364.
- Servin A.** (2004):Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 405 – 440.
- Servin. A.**,Coconnier M.H. (2003): Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*,17, pp. 741– 754.
- SINGLETON P.** (2004). Bactériologie pour la médecine, biotechnologie, la biologie et les .6 éd.DUNO. paris p 440.
- Siitonen S.**, Vapaatalo H., Salminen S., Gordin A., Saxelin M., Wikberg R. and Kirkkola A. (1990) Effect of *Lactobacillus GG* yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Annals of Medicine* 22(1):57-59.
- Smith, H. W.** (1965). " Observations on the Flora of the Alimentary Tract of Animals and Factors Affecting Its Composition." *J Pathol Bacteriol* **89**: 95-122.
- Spanhaak S.**, Havenaar R. and Schaafsma G. (1998) The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 52(12):899-907.
- Spears, R. W.** and R. Freter., (1967). " Improved isolation of anaerobic bacteria from the mouse cecum by maintaining continuous strict anaerobiosis. " *Proc Soc Exp Biol Med* **124**(3) : 903-9.
- Stanton, C.**, G. Gardiner, et al. (2001). "Market potential for probiotics." *Am J Clin Nutr* **73**(2 Suppl): 476S-483S.
- Stiles M.E.** et Holzapfel W.H., 1997.Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36:1-29.

**Tamime** A.Y., 2002. Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3<sup>e</sup> Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.

**Tanaka** H, Doesburg K, Iwasaki T, et al. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *J Dairy Sci* 1999; 82(12):2530-5

**Tannock** G. W., 1997. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends in Biotechnology*, 15, 270-274.

**Taranto** M., Medici M., Perdigon G., RuizHolgado A. and Valdez G. (1998) Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypocholesterolemic mice. *Journal of Dairy Science* 81(9):2336-2340.

**Taranto**; M Medici; G Perdigon; AP Ruiz-Holgado; GF Valdez, *Journal of Dairy Science*, 2000, 83, 401-403.

**Thompson** J. and Gentry-Weeks C. (1994) Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In De Roissart H. and Luquet F. Bactéries lactiques I : aspects fondamentaux et technologiques, pp239-290. Loriga, Grenoble, France.

**TIMM**, K.I. 1979. Orbital venous anatomy of the rat. *Lab. Anim. Sci.* **29**, 636.

**Titiek** F.D., Endang S.R., Djoko W. et Slamet S., 1996. Antimicrobial substance produced by *lactobacillus* sp. TGR-2 isolated from Growol. *Indonesian. Food Nutr. Prog.* 3 (2): 29-34.

**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.

---

## V

**Vale**, M. M., Menten, J.M.F., Morais, S.C.D., Brainer, M.M.A., 2004. *Sci. Agr. Pirac.*, 61, 371-375.

**Vandamme** P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Keresters K. et Swwings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60 : 407.

**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.



**Vermeiren L.**, Devlieghere F., and Debevere J. (2004): Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 96 (2): 149-164.

**Vilain, A.C.** 2010. Qu'est-ce que le lait ? What's milk ? .revue française d'allergologie. 50 : 124-127

**Vittorio, S. A.**, Mauro, F., Carla, B., Giovanna, D. D., Giovanni, S., Eric, C., 2005. Effets de l'addition de *pediococcus acidilactici* dans la ration de poulets de chair sur les performances zootechniques et la microflore intestinale. Sixièmes journées de la recherche avicole. S.Malo.

**Vizoso Pinto, M. G.** (2006). *Molecular and physiological studies on the functionality of probiotic lactobacilli.* Karlsruhe

---

### W

**Wang K.**, Li S., Liu C., Perng D., Su Y., Wu D., Jan C., Lai C., Wang T. and Wang W. (2004) Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *American Journal of Clinical Nutrition* 80(3):737-741.

**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 P. H.**, Hsu C. I., Tang S. C., Huang Y. L., Lin J. Y., & Ko J. L., 2004. Fungal immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes* induces interferon-gamma production through p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2721-2725.

www.healthsystem. Viriginia. Edu/uvahealth/adult\_digest/images/ei\_0132.gif

**WAYNFORTH, H.B.** 1980. *Experimental and Surgical Technique in the Rat.* Academic Press, London, UK. pp. 84.

---

### Z

**Zago M.**, Fornasari M.E., Carminati D., Burns P., Suárez V., Vinderola G., Reinheime rJ. et Giraffa G., 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* 28: 1033-1040.

**Zhang, M.**, X. Hang, X. Fan, D. LI, and H. Yang. ( 2008 ): Characterization and selection of lactobacillus strains for their effect on bile tolerance, taurocholate déconjugation and

cholestérol removal. *World Journal of Microbiology and Biotechnoloy* 24:7-14.

# Annexes

## Annexe 01 :

### ➤ *Les milieux de culture*

#### Milieu LB

-Tryptone	.....	10 g
-Extrait de levures	.....	05 g
-NaCl	.....	10 g

Autoclave à 121°C

#### Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure	.....	05 g
Extrait de viande	.....	10 g
Polypeptone	.....	10 g
Citrate de sodium	.....	02g
Acetate de sodium	.....	05 g
Glucose	.....	20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	.....	02g
MgSO <sub>4</sub>	.....	0,25g
MnSO <sub>4</sub>	.....	0,05 g
Agar- Agar	.....	15 g
Cysteine		
Chlorhydrique	.....	0.5g
Acide nalidixique	.....	02 mg
Eau distillee	.....	1000 ml
pH	.....	06.8

Autoclavage 120°C/ 20 minutes.

#### Milieu API 50 CHL

Polypeptone	.....	10g
Extrait de leueur	.....	50g
Tween 80	.....	1 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.....	29g
Acétate de sodium	.....	05g
Citrate diamoniaque	.....	02 g
Sulfate de magnésium	.....	0.20 g
Sulfate de magenèse	.....	0.05 g
Bromocrésol Pourpre	.....	0.17 g

## ➤ *Les colorants*

### *Violet de gentiane au cristal*

Violet de gentiane	.....	10g (ou 5g)
Phénol	.....	20g
Ethanol à 0.95	.....	100 cm <sup>3</sup>
Eau distillée	.....	01 dm <sup>3</sup>

Les 3 premiers composants sont dans un premier temps dissous ensemble d'eau est ajoutée ensuite

### *Lugol*

Iode	.....	05g
IO dure de potassium	.....	10g
Eau distillée qsp	.....	01g
Flacon brun		

### *Fuchsine de Ziehl*

Fuchsine bosique	.....	10g
Phénol	.....	50g
Ethanol à 0.5	.....	10cm <sup>3</sup>
Eau distillée	.....	01dm <sup>3</sup>

## **Annexe 02 :**

### *Coloration de Gram*

#### **Préparation de frottis**

Au moyen d'une boucle d'inoculation, on dépose un peu d'eau sur une lame porte objet propre, puis on mélange à cette eau un tout petit peu de matériel prélevé sur une colonie pour obtenir une suspension de cellules. Avec la même boucle, on étale cette suspension sur une surface d'un ou deux centimètres carrés et on laisse sécher

– on obtient un frottis .Le frottis est ensuite fixé par deux passages rapides dans la flamme d'un bec bunsen.

Le frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de cristal ; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par la solution de lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) et de nouveau rincé rapidement (SINGLETON,2004).

On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec un solvant comme l'éthanol (95%), l'acétone ou l'acétone iodée. Il s'agit là de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 1 à 3 secondes seulement, jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui –ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. A ce stade, les cellules GRAM-négatives seront incolores, les cellules GRAM- positives violettes.

On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la fushine basique diluée, pour colorer en rouge les cellules GRAM-négatives présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif (x100) à immersion (SINGLETON,2004).

### **Annexe 03 :**

#### **API 50 CHL**

##### **Principe**

API 50 CHL Medium prêt à l'emploi, permet l'étude de la fermentation des 49 sucres de la galerie API 50 CHL. Le microorganisme à tester est mis en suspension dans le milieu puis inoculé dans chaque tube de la galerie.

Pendant l'incubation, le catabolisme des glucides conduit à des acides organiques qui provoquent le virage de l'indicateur de pH. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique de la souche et servent à son identification ou à son typage.

##### **Reactifs :**

###### **Composition du coffret (10 tests) :**

- 10 ampoules de milieux API 50 CHL Medium
- 01 notice technique

Produits complémentaires non fournis :

- Galeries API 50 CHL (réf. 50 300)
- McFarland Standard, point 2 (réf. 70 900) ou densitomètre ATB 1550
- Logiciel d'identification ( consulter bioMérieux)
- Pipettes ou PSIpette (réf. 70 250)
- Huile de paraffine (réf. 70 100)
- Portoir à ampoules (réf. 70 200 )
- Ecouvillons (réf. 70 610)
- Milieu MRS
- (suspension Medium, 02 ml (réf. 70 600)et 05 ml (réf. 20 110))

##### **Matériel de laboratoire nécessaire :**

- Etuve (30 °C)
- Bec Bunsen
- Crayon marqueur
- Système d'anaérobiose

# Annexes

---

## Conservation des milieux

API 50 CHL Medium se conserve à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

## Composition des milieux

---

Suspension Medium 2 ou 5 ml	Eau déminéralisée	
API 50 CHL Medium 10 ml	Polypeptone	10 g
	Extrait de levure	05 g
	Tween 80	01 ml
	Phosphate dipotassique	02 g
	Acétate de sodium 3H <sub>2</sub> O	05 g
	Citrate diammonique	02 g
	Sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0.20g
	Sulfate de manganèse 4 H <sub>2</sub> O	0.05g
	Bromocrésol Pourpre	0.17g
	Eau déminéralisée	1 000ml

---

## Mode opératoire

Les prélèvements et cultures bactériennes doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée par un personnel compétent et averti.

Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout le long de la manipulation (se référer à « Biosafety in Microbiological and Biomedical Safety, US department of Health and Human Services, 1988 » ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation).

## Sélection des colonies

- Vérifier la pureté de la souche
- La cultiver sur milieu MRS gélosé 24 h à 30 °C ou 37 °C en anaérobiose. La température d'incubation varie selon l'origine de la souche.
- Vérifier son appartenance aux bactéries lactique : bacilles Gram (+), catalase (-), non sporulés, anaérobies (stricts ou facultatifs), cultivant sur milieu MRS.
- Si des souches lyophilisées ou congelées sont utilisées, réaliser 02 subcultures en bouillon MRS avant l'isolement sur milieu MRS gélosé.

## Préparation d'inoculum

- Avec le densitomètre ATB 1550 :

-ouvrir une ampoule de API 50 CHL Medium

-prélever plusieurs colonies identiques et réaliser une suspension d'opacité égale à celle de l'étalon 2 de McFarland

- Sans densitomètre ATB 1550 :

-ouvrir une ampoule de suspension Medium 2 ml (ou eau distillée stérile sans additif)

-prélever toutes les bactéries de la culture, à l'aide d'un écouvillon, et réaliser une suspension dense (S1) dans l'ampoule.

-réaliser dans une ampoule de suspension Medium 05 ml une opacité égale à celle de l'étalon 2 de McFarland en transférant un certain nombre de gouttes de la suspension S1 : note ce nombre de gouttes (n).

-inoculer une ampoule de API 50 CHL Medium avec 2 fois le nombre de gouttes trouvé (soit 2 n). Homogénéiser.

### **Inoculation de la galerie**

- Répartir API 50 CHL Medium ainsi inoculé dans les tubes seulement, et recouvrir les tests avec de l'huile de paraffine.
- Incuber à 30 ou 37 °C, en aérobiose pendant 48 h.

### **Lecture de la galerie**

Tous les tests sont lus à 24 et 48 heures.

On recherche dans chaque tube l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du bromocrésol pourpre contenu dans le milieu. Pour le test esculine (tube n° 25) on observe un virage du pourpre au noir.

- Enregistrer les résultats sur la fiche de résultats.
- Le profil biochimique ainsi obtenu peut être :
  - Enregistré tel quel, définissant un biotype d'une espèce déjà déterminée ;
  - identifié grâce à un logiciel d'identification ou au tableau d'identification ;
  - utilisé avec d'autres profils pour une étude taxonomique d'un groupe bactérien ;
  - adressé au service d'aide au diagnostic.

### **Elimination du matériel utilisé**

Après utilisation, ampoules, écouvillons, pipettes et galeries doivent être incinérés ou décontaminés par autoclavage ou immersion dans un désinfectant avant d'être jetés.

### **Précautions**

- Destiné au diagnostic in vitro seulement
- Un personnel de laboratoire qualifié doit utiliser les techniques aseptiques et les précautions habituelles contre les agents infectieux.
- Ne pas pipeter à la bouche les prélèvements et les réactifs.
- Ne pas employer les réactifs après la date d'expiration.
- Après la sortie du réfrigérateur, laisser les réactifs revenir à la température ambiante (20 - 30°C) avant emploi.
- Tous les produits inoculés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés de façon appropriée.



## Annexes

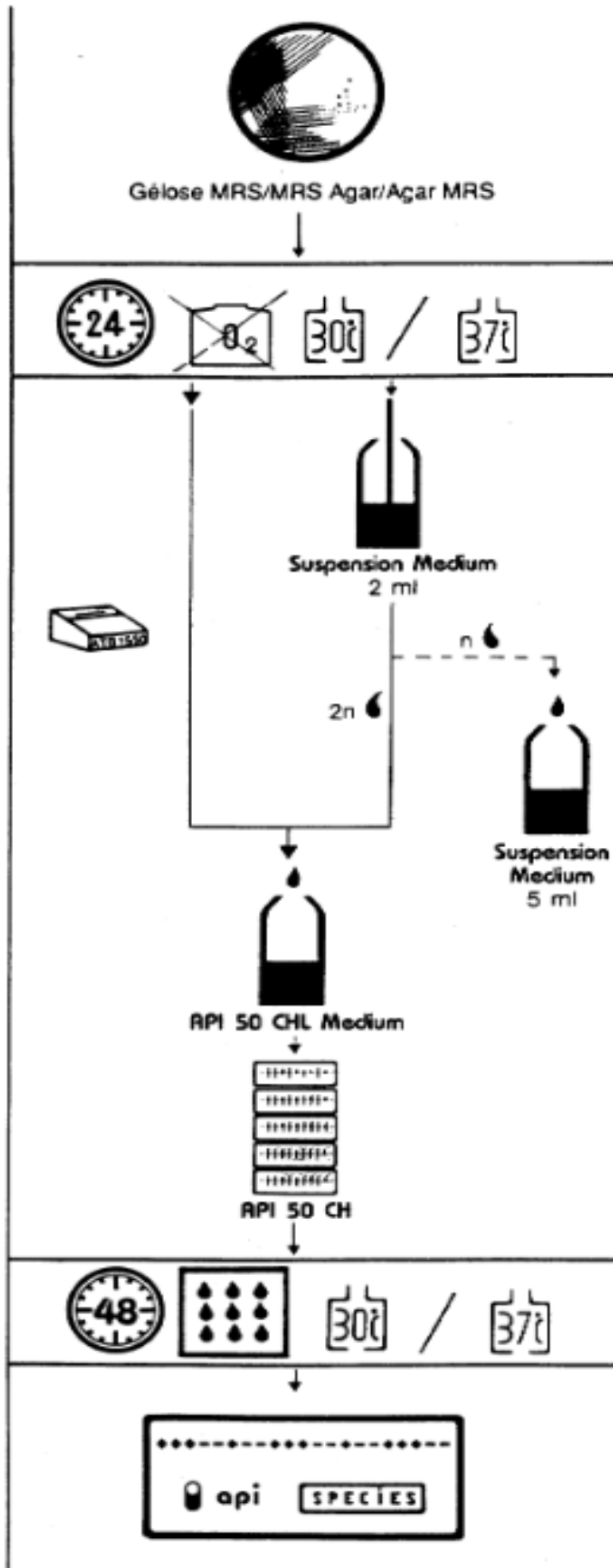
---

- A la fin du test, après lecture et interprétation, tous les prélèvements, souillures et produits inoculés doivent être autoclaves, incinérés ou immergés dans un désinfectant germicide avant élimination.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite par un microbiologiste compétent qui prendra en considération le contexte clinique, l'origine du prélèvement, les aspects macro et microscopiques et éventuellement les résultats d'autres tests, en particulier l'antibiogramme.

### Composition de la galerie

<b>BANDE N° 1 tube / substrat</b>	<b>BANDE N° 2 tube / substrat</b>	<b>BANDE N° 3 tube / substrat</b>	<b>BANDE N° 4 tube / substrat</b>	<b>BANDE N° 5 tube / substrat</b>
0 TEMOIN	10 GALactose	20 $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	30 MELibiose	40 D TURanose
1 GLYcerol	11 GLUcose	21 $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside	31 SACcharose	41 D LYXose
2 ERYthritol	12 FRUctose	22 N-Acetyl-Glucosamine	32 TREhalose	42 D TAGatose
3 D ARABinose	13 MaNnosE	23 AMYgdaline	33 INUline	43 D FUCose
4 L ARABinose	14 SorBosE	24 ARButine	34 MeLeZitose	44 L FUCose
5 RIBose	15 RHAmnose	25 ESCuline	35 RAFFinose	45 D ARabitoL
6 D XYLose	16 DULcitol	26 SALicine	36 AMiDon	46 L ARabitoL
7 L XYLose	17 INOsitol	27 CELlobiose	37 GLYcoGene	47 GlucoNaTe
8 ADOnitol	18 MANnitol	28 MALtose	38 XyLiTol	48 2-Keto-Gluconate
9 $\beta$ Methyl-D-Xyloside	19 SORbitol	29 LACTose	39 GENTIobiose	49 5-Keto-Gluconate

METHODOLOGIE / PROCEDURE / METHODIK / TECNICA / PROCEDIMENTO



SELECTION/AUSWAHL  
PRELIEVO/SELECCION-

*Lactobacillus*

INCUBATION/INKUBATION  
INCUBAZIONE/INCUBACION

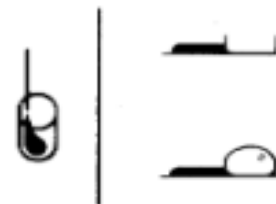
INOCULUM/INOKULUM  
SOSPENSIONE/INOCULO

toutes les bactéries  
all the bacteria  
gesamte Kultur  
tutti i batteri  
todas las bacterias

2 McF

2 McF

INOCULATION/BEIMPFFEN  
INOCULO/INOCULACION

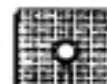


INCUBATION/INKUBIEREN  
INCUBAZIONE/INCUBACION

LECTURE/READING/ABLESEN  
LETTURA/LECTURA

INTERPRETATION/INTERPRETIEREN  
INTERPRETAZIONE/INTERPRETACION

- Tab. identif.



## Annexe 04 :

1-1 Paramètre biochimiques sanguins\* des rats WISTER RjHan : WI 6-13 semaines

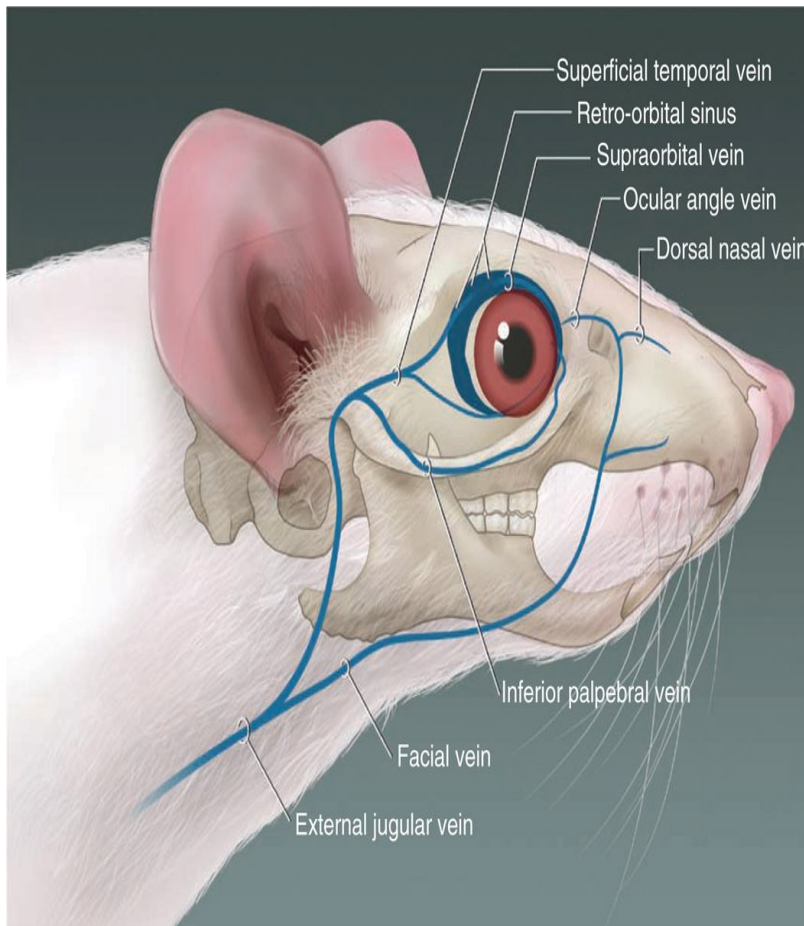
<b>paramètres</b>	<b>Mâle</b>	<b>Femelle</b>
<b>Glucose (g/l)</b>	6.0 ± 0.9	5.4 ± 0.8
<b>Urée (g/l)</b>	5.2 ± 0.7	5.5 ± 1.0
<b>ASAT (UI/l)</b>	93 ± 20	89 ± 17
<b>ALAT (UI/l)</b>	32 ± 5	30 ± 8
<b>Phosphatase alcaline (UI/l)</b>	135 ± 32	104 ± 32
<b>Cholestérol total (g/l)</b>	1.8 ± 0.3	1.9 ± 0.4
<b>Triglycérides (g/l)</b>	0.9 ± 0.3	0.5 ± 0.1
<b>Créatinine (mg/l)</b>	49.1 ± 3.7	47.6 ± 4.6

\*Données BAYER CROPS SCIENCES 2012, à titre indicatif

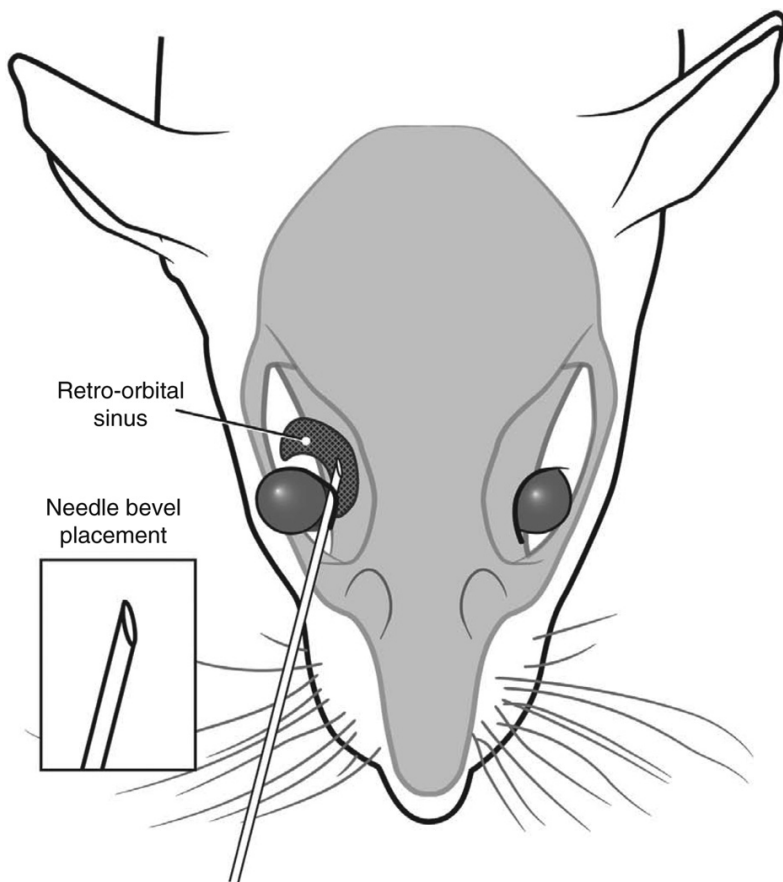
### 1-2 *Prise de sang chez les rats Wistar*

Plusieurs techniques de prise de sang ont été décrites et révisées dans des publications récentes (HESS et al., 1981 ; ; KRAUS, 1980 ; PETTY, 1982 ). Le choix d'une procédure dépend habituellement du volume de sang requis et de la fréquence de l'échantillonnage. D'autres considérations doivent inclure les effets possibles des anesthésiques et de la technique utilisée sur les éléments sanguins à l'étude. En ce qui concerne les échantillonnages répétés de petites quantités de sang, le sinus orbital est l'endroit préféré pour les prises de sang ( HARKNESS, 1983 ; HESS et al., 1981 ; KRAUS, 1980 ; PETTY, 1982). Cette technique est généralement exécutée sous anesthésie; la guérison est rapide et complète et on peut la répéter quelques jours plus tard. Cependant, grâce à cette technique, on peut prélever de plus grandes quantités de sang (jusqu'à 4 à 6 ml chez des rats de 115 à 130 grammes) si on utilise une pipette plus grosse (13 x 100 mm) ou plusieurs petits tubes héparinés commerciaux (LANE-PETTER et al., 1971). Lorsqu'on essaye, pour la première fois, d'obtenir du sang du sinus orbital, il est essentiel que le rat soit anesthésié et que l'opérateur ait rafraîchi ses connaissances anatomiques de la région oculaire (TIMM, 1979).

Il est important de savoir que si on utilise cette procédure à répétition, des dommages tissulaires surviennent.



Anatomie de la région  
oculaire chez les rats  
Wistar



### Annexe 05 :

*01-Manipulation et entrave  
physique*

La technique du sinus  
orbital

La répétition des manipulations faites chez les rats au cours des nombreuses expériences peut représenter une variable importante non contrôlable si des procédures routinières et non stressantes ne sont pas instaurées.

L'usage de pinces et de gants pour

prendre et manipuler les rats est rarement justifié et il n'est absolument pas apprécié de la part de l'animal qui dès lors a tendance à lutter, à se blesser et en conséquence à devenir plus difficile à manier au cours de manipulations futures.

Les rats s'adoucissent lorsqu'on les manipule avec les mains nues (à cause du dégagement de chaleur par les mains), cessent rapidement de lutter et deviennent progressivement plus dociles lors de manipulations subséquentes. Des méthodes pour empoigner et tenir les rats ont été décrites et illustrées fréquemment dans la littérature (HESS et *al.*, 1981, KRAUS, 1980 ; GREEN, 1979). En général, la procédure consiste à tenir l'animal à la base de sa queue avec une main alors que l'autre main empoigne le dos au niveau du thorax de telle sorte que le pouce et l'index sont situés derrière les coudes et les poussent vers l'avant; l'index peut être placé sous le cou en arrière du maxillaire inférieur. Si le rat est empoigné correctement, il ne peut pas mordre mais s'il essaye, on doit avoir plusieurs points présents à l'esprit lorsqu'on prend un rat d'expérimentation pour la première fois:

- a. ne pas empoigner ni mouvoir les mains soudainement, laisser le rat sentir notre main étant donné que la vue du rat est faible et qu'il a besoin de sentir la configuration de la main;
- b. ne pas avoir peur; la nervosité est contagieuse;
- c. ne pas exercer de pression sur le thorax ou autour de la gorge; cela obstrue la respiration et force le rat à se débattre;
- d. ne pas soulever un gros rat par le bout de la queue, la peau peut être facilement déchirée si l'animal se débat et elle peut même se détacher des tissus sous cutanés de la queue;
- e. prendre les rats plus petits à la base de la queue .jamais plus loin que la base, car les rats se tortillent, grimpent le long de leur queue et mordent parce qu'ils ont peur;
- f. essayer de s'assurer que tous les animaux dans un groupe expérimental de rats soient manipulés par leurs responsables aussi souvent que possible avant le début d'une expérience.

Il existe sur le marché plusieurs types d'appareils à contention (entrave) mécanique.

Ils sont construits pour un certain nombre d'usages telle l'injection ou la prise de sang, la collecte à court terme de liquides corporels à l'aide d'une canule et l'immobilisation (posture) pendant la chirurgie. Quelques-uns de ces appareils ont été décrits en détails par Kraus (1980) qui, de plus, fournit plusieurs références utiles à la construction d'appareils maison semblables et économiques.

### ***02-Hébergement***

La cage représente la résidence principale dans laquelle le rat passe sa vie. Sa forme, sa fabrication et son contenu (bouteilles d'eau, nourrisseurs, litière et occupants) influencent profondément le micro-milieu qui se crée à l'intérieur de la cage, micro-milieu qui, à son tour, à travers les variations sur la physiologie, la santé et le comportement de ses occupants, influence aussi profondément les réponses expérimentales.

**Annexe 06 :****Aptitudes des probiotiques sur le rats wistar****Tableau0 1: consommation alimentaire hebdomadaire**

consommation alimentaire hebdomadaire /lot (g)	Lot 01 « témoin -> »	Lot 02 « témoin + »	Lot 03 (NSCA1)
S <sub>1</sub>	455.5	370	272
S <sub>2</sub>	457	382	270
S <sub>3</sub>	510	495	300
S <sub>4</sub>	680	610	420
S <sub>5</sub>	700	658	456

**Tableau02 : le gain de poids**

Gain de poids	Lot 01 « témoin -> »	Lot 02 « témoin + »	Lot 03 (NSCA1)
S <sub>1</sub>	17,72 124,04	20,14 140,98	18,81 131,67
S <sub>2</sub>	11,42 79,94	10,57 73,99	1,33 9,31
S <sub>3</sub>	0,4 2,8	5 35	1 5

**Tableau 03: indice de consommation**

IC	Lot 01 « témoin -> »	Lot 02 « témoin + »	Lot 03 (NSCA1)
S <sub>1</sub>	3,67	2,62	2,06
S <sub>2</sub>	5,71	5,16	29
S <sub>3</sub>	182,14	14,14	60
S <sub>4</sub>	242,85	17,42	84

**Tableau 04: poids vif moyen**

poids Vif moyen	Lot 01 « témoin -> »	Lot 02 « témoin + »	Lot 03 (NSCA1)
S <sub>1</sub>	244.28	175.71	203.85
S <sub>2</sub>	262	195.85	222.66
S <sub>3</sub>	273 ,42	206.42	224
S <sub>4</sub>	273.85	211.42	226

### Tableau 05 : Glycémie

Glycémie g/l	Lot 01 « témoin - »	Lot 02 « témoin + »	Lot 03 (NSCA1)
S1	0.69	1.19	1.44
S2	0.77	0.95	1.75
S3	1.12	0.97	1.09
S4	1.07	0.94	1.17
S5	1.07	1.19	1.12

### Tableau 06 : Cholestérolémie

Cholestérolémie g/l	Lot 01 « témoin - »	Lot 02 « témoin + »	Lot 03 (NSCA1)
S1	0.64	0.51	0.68
S2	0.58	0.87	0.63
S3	0.56	0.47	0.81
S4	0.75	0.59	0.52
S5	0.56	0.64	0.50

### Tableau 07 : Triglycéridémie

Triglycéridémie g/l	Lot 01 « témoin - »	Lot 02 « témoin + »	Lot 03 (NSCA1)
S1	1.29	1.14	1.49
S2	0.59	1.25	0.75
S3	0.64	0.27	0.74
S4	1.22	0.42	0.84
S5	1.06	0.60	0.02

