

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE Dr. TAHER MOULAY SAIDA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



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

Option: Microbiologie appliquée

Présenté par: M^{elle} Hassani Zahira Malika

Thème

**Contribution à l'étude des propriétés probiotiques des cultures mixtes de
certaines bactéries lactiques sur quelques paramètres biochimiques et
microbiologiques des rats Wistar**

Soutenu le : 10/10/ 2017 devant la commission d'examen :

Président: Mr. Benreguieg Mokhtar

Examineur :Mr Halla Noureddine

Encadreur :Melle Amara Sabrina

Maitre de conférence U.SAIDA

Maitre assistant B U.SAIDA

Maitre Assistant A U.SAIDA

ANNEE UNIVERSITAIRE 2016/2017

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مَا لَوْ سَبَّحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ
سورة البقرة "الآية 32"

Remercîments

*Je rends d'abord grâce à **DIEU** le tout puissant pour m'avoir donné la force, le courage, la volonté, l'amour du savoir et surtout la patience pour pouvoir produire ce modeste travail.*

*Je ne saurais de remercier en premier lieu mon cher professeur **Pr Chekroun Abdellah** université Ahmed ben Bella 1 Oran qui m'a fait découvrir le monde des probiotiques que dieu l'accueille dans son immense paradis*

*Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères tout particulièrement et avec reconnaissance à Melle **Sabrina Amara** Maitre assistant A à l'Université de Saida de m'avoir accordé sa confiance et m'avoir permis de réaliser ce modeste travail.*

A travers ses qualités professionnelles en tant qu'encadreur elle m'a transmis de précieuses reconnaissances ainsi qu'une rigueur scientifique qui me seront très utiles dans mon avenir professionnel.

Je tiens également à la remercier pour sa générosité au nom du savoir et sa modestie au profit de l'étudiant pour son soutien, ses conseils et ses encouragements je suis très reconnaissante également pour les discussions que nous avons pu avoir qui ont toujours été une source d'information et ont beaucoup contribué à me faire avancer dans ma réflexion.

*Mes vives reconnaissances vont également à Mr **Benreguig Mokhtar** Maitre de conférence Université de Saida de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury et d'avoir mis en disposition tous les moyens nécessaires pour mener à bien notre travail, je tiens aussi à lui exprimer ma profonde gratitude pour son aide précieuse ses conseils et ses qualités scientifiques et humaines qui nous servent de modèle et d'exemples*

*Je tiens aussi à remercier Mr **Halla Noureddine** Maitre assistant B Université de Saida d'avoir accepté d'examiner et d'apporter son jugement sur ce travail c'est un honneur pour moi de le voir siéger parmi les membres de jury qu'il trouve aussi le témoignage de mon profond respect.*

Un immense merci à mes très chers parents tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez cessé de consentir pour mon instruction et mon bien être

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondé en moi . Par ce modeste travail je vous exprime ma reconnaissance éternelle, mon amour infini vous résumez si bien le mot parents qu'il serait superflu d'y ajouter quelque chose

Que dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie

Un très grand Merci à ma sœur adorée « Meriem » ainsi que mes frère.
Mohadem, Abdelkarim et Abderrezak

*Je tiens à remercier ma très chère copine « **Ahlem Guettaf** » qui a été toujours la pour me soutenir dans mes galères me remonter le moral et m'encourager ainsi pour les moments inoubliables qu'on avait partagé.*

*Mes remerciements les plus chaleureux vont à Mr « **kader Zegga** » mon oncle qui est un 2ème père pour moi je ne saurai comment le remercier pour toute l'aide qu'il m'a apportée ainsi que sa femme, ses enfants **Walid, Imad, malek** et mon adorable **roumayssa**.*

*Je suis très reconnaissante à Mr **Cheikh Abdelkader** pour son aide ainsi que Melle **Hafsa Dellaoui** et Mr **Hakim Dellaoui***

*Un Grand Merci à mes chers collègues chacun par son nom et je ne saurai comment remercier Dr « **Magharbi Khadidja** » pour son aide concernant le matériel de laboratoire.*

*Un Grand Merci aux techniciens de laboratoire pédagogique Mr **Ahmed**, Mr **Laaradj**, Mme **fouzia**, Mme **Amel** .*

*Je suis reconnaissante à Mr « **Ishak Meddah** » pour son aide précieuse*

*Je clos mes remerciements aux enseignants de la faculté des sciences biologique précisément Mr « **Ammam Abdelkader** » pour son aide dans la partie in vivo et Mr « **Benreguig Mokhtar** » pour ses conseils, sa disponibilité et sa modestie.*

Dédicace

Je dédie ce travail à :

*La mémoire de Mr **chekroun Abdellah** mon cher professeur*

La mémoire de ma très chère grand mère

Mes très chers parents

Ma sœur adorée et mes très chers frères

*Mon encadreur, Mon exemple Melle « **Sabrina Amara** »*

***Sally** ma deuxième sœur,*

*Les amies de ma vie : **Nouna, Samira, Rouba, Asmaa,**
Ikram, Zahra, fatima.*

Toutes les personnes avec qui j'ai partagés de beaux moments

« A cœur vaillant, rien d'impossible »

« A cœur vaillant, rien d'impossible » Charles VII. 15^{ème} siècle

Charles VII. 15^{ème} siècle

Résumé

la prise de poids et l'accumulation de réserves de graisses a été considérées comme des signes de santé et de prospérité. Quelques années après des pathologies dues à l'excès du gras commencent à apparaître et le domaine médical déclare l'alerte.

Notre objectif a été pour but d'évaluer l'impact d'un régime hyper gras sur un modèle animal avec l'incorporation de l'apport probiotique et prébiotique

Notre travail illustre les aptitudes technologiques et thérapeutiques des lactobacilles, cinq souches ont été purifiées dont une identifiée par la galerie biochimique API 50CH, nous avons également démontré leurs effets inhibiteurs envers des souches indicatrices pathogènes ainsi que leur résistance vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques.

Notre étude s'inscrit aussi dans l'étude *in vivo* de l'impact d'un régime hyper-lipidique sur des rats Wistar à travers 7 lots dont 02 ayant consommé l'additif de souches probiotiques isolées de lait de chamelle combinées à des prébiotiques en comparaison à des témoins dont un recevant des souches commercialisées d'un laboratoire français, il s'est avéré à travers nos résultats que nos souches additionnées des prébiotiques semblent être plus performantes pour la réduction de certains germes pathogènes intestinaux et favorisent considérablement la diminution du taux de cholestérol et triglycérides sanguins, elles ont également contribué à préserver les fonctions hépatiques des animaux ayant reçu nos souches comme complément.

Mots clés : Lactobacilles, régime hyper-lipidique, probiotiques, prébiotiques, cholestérol, triglycérides.

Abstract

Weight gain and the accumulation of fat reserves have been considered as signs of health and prosperity. A few years after pathologies due to the excess fat begin to appear and the medical field declares the alert.

Our objective was to evaluate the impact of a fatty diet on an animal model with the incorporation of probiotic and prebiotic intake

Our work illustrates the technological and therapeutic abilities of the lactobacilli, five strains were purified, one of which was identified by the API 50CH biochemical gallery, we also demonstrated their inhibitory effects on pathogenic indicator strains and their resistance against a range antibiotics.

Our study is also part of the in vivo study of the impact of a hyperlipid regimen on Wistar rats through 7 batches, including 02 that consumed the additive of probiotic strains isolated from camel milk combined with prebiotics in comparison to controls one of which received strains marketed from a French laboratory, it was shown through our results that our strains plus prebiotics appear to be more effective for the reduction of certain intestinal pathogens and greatly promote the reduction of cholesterol and blood triglycerides, they also helped to preserve the liver functions of the animals that received our strains as a complement.

Key words: Lactobacilli, hyper-lipid diet, probiotics, prebiotics, cholesterol, triglycerides

ملخص

لقد تم اعتبار زيادة الوزن وتراكم احتياطات الدهون علامات على الصحة والرخاء. ولكن بعد بضع سنوات بعد ظهور الأمراض الناجمة عن الدهون الزائدة في الظهور والمجال الطبي يعلن التنبيه.

كان هدفنا لتقييم تأثير اتباع نظام غذائي دهني على نموذج حيواني مع إدراج بروبوتيك و بريبيوتيك

يوضح عملنا المهارات التكنولوجية و العلاجية للعصيات اللبنية التي انتقينا منها 5 سلالات، السلالة 46 حددت عن طريق بيوكيميائي API50CH أضف إلى ذلك إثبات مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية و قدرتها على تنشيط سلالات مؤشر الحيوية.

دراستنا ركزت أيضا من تأثير اتباع نظام غذائي شديدة الدهون في الفئران وبستار و قد أثبتت التجارب التي دامت شهرين أن سلالات لدينا بالإضافة إلى البريبايوتكس ويبدو أن أكثر فعالية للحد من مسببات الأمراض المعوية معينة وتعزيز كبير في انخفاض الكوليسترول والدهون الثلاثية في الدم، كما أنها ساعدت على الحفاظ على وظائف الكبد من الحيوانات التي تلقت سلالات كمكمل

الكلمات الرئيسية : العصيات اللبنية، والنظام الغذائي فرط الدهون، البروبيوتيك، البريبايوتكس، الكوليسترول، والدهون الثلاثية

Tables des matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Tables des matières.....	I
Listes des figures.....	II
Liste des tableaux.....	III
Glossaire.....	IV
Les abréviations	V
 Introduction	 1
 Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I .1-Le microbiote intestinal.....	2
1-1-Définition.....	2
1-2-Mise en place et composition.....	2
1-3-la répartition.....	3
1-4-Comparaison du microbiote chez des enfants nourris au lait maternel	
par rapport à des enfants nourris avec des préparations industrielles	4
1-5-Fonction du microbiote intestinal.....	6
1-6-Les fonctions métaboliques du microbiote intestinal.....	6
1-6-1-Métabolisme des glucides	6
1-6-2-Digestion des protéines.....	6
1-6-3-Digestion des lipides.....	7
1-6-4-Minéraux et vitamines.....	7
1-7-Impact sur la physiologie digestive	7
1-8-Rôle sur la santé.....	8
1-8-1-Stimulation du système immunitaire	8
1-8-2-Protection contre les microorganismes néfastes	8
1-8-3-Production des substances et métabolites	9
I .2- Les bactéries lactiques	10
2-1-Généralités.....	10
2-2-Habitat.....	11
2-3-Taxonomie.....	12
2-4-Applications industrielles des bactéries lactiques	13
2-4-1-Domaine alimentaire.....	13
2-4-1-1- Rôle sur la structure, la texture et les	
caractéristiques Organoleptique.....	13
2-4-1-2- Rôle dans la conservation.....	17
2-4-2-Domaine de santé.....	17
2-4-3-En chimie.....	18

I .3-Les bifidobactéries et les lactobacillus.....	18
3-1-Le genre <i>Bifidobacterium</i>.....	18
3-1-1-Morphologie	19
3-1-2-Physiologie.....	19
3-1-2-1-Température.....	19
3-1-2-2-L'oxygène.....	19
3-1-2-3Le pH.....	20
3-1-3-Profil fermentaire.....	23
3-2-Le genre <i>lactobacillus</i>.....	24
3-2-1-Habitat.....	27
3-2-2-Caractères culturels.....	31
3-2-3-Identification.....	31
3-2-3-1-Identification par l'ARNr 16S.....	31
3-2-3-2-Séquençage par la méthode PCR	32
I .4- Les probiotiques	32
4-1-Définition.....	33
4-2-Applications des probiotiques.....	34
4-2-1-Inhibition des bactéries indésirables.....	35
4-2-2-L'amélioration de la digestion du lactose.....	36
4-2-3-Réduction du taux de cholestérol sanguin.....	36
4-2-4-Diminution des allergies alimentaires.....	38
4-2-5-Réduction du risque de diarrhée.....	39
4-2-6-Les traitements gastriques.....	40
4-2-7-La prévention du cancer du côlon et autres cancers.....	41
4-2-8-Production de bactériocines.....	43
4-2-9-Application des probiotiques à la santé buccodentaire.....	44
4-2-10-Probiotiques et carie dentaire.....	44
4-2-11-Probiotiques et halitose.....	45
4-2-12-Protection contre les infections uro-génitales.....	45
4-3-La sélection des probiotiques.....	46
I .5-Les prébiotiques.....	48
5-1-Rôle des composés prébiotiques.....	49
I .6-Les symbiotiques.....	50
I .7-Les rats de laboratoire.....	50
7-1-Rat Wistar.....	50
7-2-Présentation de rat Wistar.....	51
7-3-Particularités du développement.....	52
7-4-L'appareil digestif du rat.....	52
7-5-La flore du rat.....	53

Chapitre II : Matériel et Méthode

II .1.Lieu de l'étude.....	55
II .2Matériel.....	55
2.1-Les souches de bactéries lactiques.....	55
2.2-Les souches indicatrices pathogènes.....	56
2.3-Les milieux de culture.....	57
2.4-Expérimentation.....	57
2.4.A. la partie in vitro.....	57
A-1-purification des souches.....	57
A-2-Identification.....	57
A-3-Test de catalase.....	58
3.1. Conservation des souches.....	58
A-4-L'antibiogramme.....	59
A-5-La galerie API 50.....	61
A-6-Test de l'antagonisme.....	62
2.4.B. La partie in vivo.....	62
B.1. Conditions d'élevage.....	62
B.2. Régime alimentaire.....	63
B.3.Préparation du lait fermenté par nos souches probiotiques....	64
B.4. Paramètres zootechniques.....	65
B.5. Paramètres de croissance.....	66
B.6. Paramètres biochimiques.....	67
B.7. Paramètres microbiologiques.....	68
B.8. Sacrifice et prélèvement des organes.....	69
B.9. Analyse statistiques des résultats	70

Chapitre III: Résultats et discussion

III .1. Expérimentation in vitro.....	72
1.1.Vérification de la pureté des souches lactiques.....	72
A. Etude macroscopique.....	72
A.1. Sur milieu liquide.....	72
A.2.Sur milieu solide.....	72
B. L'observation microscopique.....	73
C.Test de catalase.....	73
D.Résultat de résistance aux antibiotiques.....	74
E. Résultat de la galerie API50.....	78
F.Résultat des disques imbibés.....	79
III .2. Partie in vivo.....	81
2.1. Paramètres zootechniques.....	81
2.2. Paramètres biochimiques.....	86
2.3. Paramètres microbiologiques.....	93
III .3. La dissection des rats.....	100

Conclusion et perspectives.....	VI
Annexe.....	VII
Annexe 1 composition des Milieux Culture	106
Annexe 2 coloration de Gram.....	108
Annexe 3 Paramètres de croissance.....	109
Annexe 4 Paramètres biochimiques.....	109
Annexe 5 les tableaux d'antibiotiques des souches.....	111
Annexe 6 tableau de dénombrement de la flore fécale, la composition de la aglerie API50.....	113
Références bibliographiques.....	VIII

Listes des figures

Figure 01 :	Evolution du microbiote du tractus gastro-intestinal de la naissance jusqu'à la petite enfance.....	04
Figure 02 :	Le microbiote intestinal humain.....	05
Figure 03 :	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques...	13
Figure 04 :	Comparaison entre L'emmental et le Fromages (à pâtes pressées cuites).....	16
Figure 05 :	Les relations phylogénétiques entre les espèces du genre <i>Bifidobacterium</i>	21
Figure 06 :	Observation microscopique des cellules de <i>Bifidobacterium</i> sp.....	22
Figure 07 :	Contraste de phase (A-E) et d'électrons (F) des micrographies montrant la différence de morphologie des cellules de Lactobacilles	26
Figure 08 :	Arbre phylogénétique représentant les relations entre les espèces de <i>Lactobacillus</i> basée sur les séquences des gènes ARNr 16S.....	30
Figure 09 :	Bactérie intestinale dégradant le cholestérol vue par microscope électronique.....	38
Figure 10 :	Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques en vue d'une utilisation alimentaire.....	47
Figure 11 :	Rat de la souche Wistar.....	51
Figure 12 :	Présentation du rat Wistar.....	51
Figure 13 :	L'appareil digestif du rat	52
Figure 14 :	Habitat des rats.....	63
Figure 15 :	Les souches commercialisées.....	64
Figure 16 :	Prébiotiques donnés aux rats.....	65
Figure 17 :	Semi automate de dosage.....	68
Figure 18 :	Anesthésie des rats par inhalation du chloroforme.....	69
Figure 19 :	Aspect des souches pures sur MRS liquide.....	72
Figure 20 :	Aspect macroscopique des colonies de lactobacilles sur gélose MRS	73
Figure 21 :	Observation microscopique des cellules bactériennes après coloration de GramGx100.....	73
Figure 22 :	Sensibilité e de la souche CHTD 27 aux antibiotiques	76
Figure 23 :	Galerie API50 de la souche <i>Lactobacillus plantarum</i>	78
Figure 24 :	Activité inhibitrice des souches de lactobacilles sur <i>Citobacterssp</i> , <i>Acenitobacter baumannii</i>	79
Figure 25 :	Evolution de l'indice de consommation	82
Figure 26 :	Evolution du gain de poids au cours des semaines.....	83
Figure 27 :	Evolution du gain de poids moyen au cours des semaines	85
Figure 28 :	Evolution de la glycémie chez les rats.....	86
Figure 29 :	Evolution de la cholestérolémie chez les rats.....	88
Figure 30 :	Evolution de la triglycéridémie chez les rats.....	90
Figure 31 :	le taux de la bilirubine à la 8ème semaine.....	92
Figure 32 :	Evolution de la flore mésophile totale.....	93
Figure 33 :	Evolution de la charge des entérobactéries.....	95

Figure 34 :	Evolution de la charge des bactéries lactiques.....	96
Figure 35 :	Evolution de la charge en salmonelles et Shigelles dans les selles des rats.....	97
Figure 36 :	Evolution de la charge des staphylocoques.....	98
Figure 37 :	Comparaison de l'intestin des lots B ,G , C.....	100
Figure 38 :	Comparaison entre un foie normal et un foie atteint de la bilirubine	101

Liste des tableaux

Tableau 01 :	Différence entre la composition de la flore bactérienne chez l'enfant nourri au lait maternel et au lait commercialisé.....	05
Tableau 02 :	Les principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques	17
Tableau 03 :	profile fermentaire des différentes espèces de Bifidobacterium	23-24
Tableau 04 :	Classification des lactobacilles selon les paramètres métaboliques et du type fermentaire (Haydersah, 2010).....	28
Tableau 05 :	Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine.....	43
Tableau 06 :	Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques(Izquierdo Alegre, 2009).....	48
Tableau 07 :	Genres, espèces et sources d'isolement des bactéries lactiques utilisées	55
Tableau 08 :	Souches des bactéries pathogènes utilisées et leurs origines.....	56
Tableau 09 :	Les antibiotiques testés, famille et mode d'action	59
Tableau 10 :	Le régime alimentaire de chaque lot	63
Tableau 11 :	La sensibilité et la résistance aux antibiotiques des différentes souches lactiques.....	74
Tableau 12 :	Identification de <i>Lactobacillus plantarum</i> par la galerie API50.....	78
Tableau 13 :	Les diamètres d'inhibition des souches lactiques vis-à-vis les souches pathogènes.....	79
Tableau 14 :	La moyenne des différents organes pour chaque lot.....	100

Glossaire :

Flore commensale : est un ensemble complexe de bactéries exerçant les effets bénéfiques sur son hôte.

Anaérobies : L'ensemble des conditions de vie des organismes vivants dans un milieu sans oxygène

Ecosystème : l'ensemble formé par une association ou communauté d'êtres vivants (ou biocénose) et leur environnement biologique, géologique, édaphique, hydrologique, climatique.

L'homéostasie : est un processus physiologique, permettant de maintenir certaines constantes du milieu intérieur de l'organisme (ensemble des liquides de l'organisme),

L'hôte : un organisme qui héberge un parasite, un partenaire mutuel, ou un partenaire commensal.

Axénique : une culture exempte de tous germes saprophytes ou pathogènes. Les premières cultures axéniques ont été réalisées avec des bactéries ainsi qu'avec des organismes unicellulaires eucaryotes.

L'acide folique : vitamine B9 (folate, *folacine* ou vitamine M, acide pteroyl-L-glutamique, pteroyl-L-glutamate et acide pteroylmonoglutamique), est une vitamine hydrosoluble.

Bifidogènes : facteur permettant la régénération en profondeur de la flore intestinale.

Cæcums : la première partie du côlon.

La lamina propria : un tissu conjonctif lâche situé sous les épithéliums qui tapissent notamment les muqueuses digestives, respiratoires ou urogénitales.

Rotavirus : virus causant des gastro-entérites grave chez les nourrissons et les jeunes enfants.

L'halitose : avoir une haleine dont l'odeur est considérée comme incommodante.

L'acide lactique : acide organique qui joue un rôle dans divers processus biochimiques provenant de la fermentation.

Coagulation du lait : provoquée par la dénaturation de la caséine, protéine majoritaire du lait.

Bactériocines : substance synthétisées par certaines bactéries notamment les bactéries lactique pour inhiber d'autres bactéries.

Chimioorganotrophe : espèce bactérienne dont le type trophique se base sur une matière chimique comme source d'énergie, le CO₂ comme source de carbone et une matière organique comme accepteur d'électrons et H⁺

Fermentation malolactique : la transformation de l'acide malique en acide lactique par l'intermédiaire des bactéries lactiques

Thermophiles : organisme ayant besoin d'une température élevée pour leurs croissance

β-galactosidase : hydrolase dont le rôle est d'hydrolyser des β-galactosides en oses simples.

Cholestérol : lipide de la famille des stérols qui joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques.

Triglyceride : ont des glycérides dans lesquels les trois group du glycérol sont estérifiés par des acides gras.

Glycémie : le taux de glucose dans le sang, ou plus exactement dans le plasma sanguin

Antibiotique : une substance naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. Dans le premier cas, on parle d'antibiotique bactéricide et dans le second cas d'antibiotique bactériostatique

Bactéries pathogènes : bactérie qui attaque l'organisme et provoque des effets néfastes

Dénombrement bactérien : technique scientifique de comptage de micro-organismes

Sensibilité aux antibiotique : mécanisme dans le quel la bactérie réagit par un effet bactéricide ou bactériostatique

Résistance aux antibiotique : mécanisme dans le quel la bactérie ne présente aucune réaction à l'antibiotique

Entérocytes : un des quatre principaux types de cellules de l'épithélium intestinal, au sein de la muqueuse intestinale. Ils proviennent de la division asymétrique de cellules somatiques.

Antagonisme : une situation dans laquelle deux phénomènes ou leurs conséquences s'opposent dans leurs effets.

Régime hyper gras : nourriture en excès de la grasse

Flore autochtone : la flore originaire

Diabète : hyperglycémie chronique, un excès de sucre dans le sang et donc un taux de glucose (glycémie) trop élevé

Cultures mixte : la combinaison de deux souches bactériennes exerçant le même effet bénéfique.

Liste des abréviations :

Bl : Bactéries lactiques

ARN16S : acide ribonucleique ribosomique constituant la sous unité 16S des procaryotes

°C : Celsius

% : pourcentage

g : gramme

mg : milligramme

NH₃ : ammoniac

IgM : immunoglobuline M

IgG : immunoglobuline G

IgA : Immunoglobuline A

L : *lactobacillus*

Aéro : aérobie

ADN : acide désoxyribonucléique

CO₂ : dioxyde de carbone

EPS : exopolysaccharide

FAO/WHO: Food and agriculture organization

pH : potentiel d'hydrogène.

Ca⁺⁺ : les ions de calcium

FOS : fructo oligosaccharide

UFC : unité formant colonie

G +C : Guanine+Cytosine

ARNr : Acide ribonucleique ribosomique

Gx : Grossissement

µm : micromètre

Introduction

Introduction générale

Tout au long de l'histoire de l'Humanité, la prise de poids et l'accumulation de réserves de graisses ont été considérées comme des signes de santé et de prospérité.

Cependant, l'industrialisation et l'urbanisation amènent une élévation du niveau de vie, entraînant des changements dans les comportements, les habitudes alimentaires, la prise de poids et l'obésité constituent une menace pour la santé dans l'ensemble des pays du monde, aussi bien chez les adultes que chez les enfants (**Ndiaye, 2007**).

Une alimentation riche en graisses, en apport énergétique, et l'insuffisance des dépenses sous forme d'activité physique jouent un rôle central. Cela a joué un rôle clé dans l'augmentation de la prévalence des maladies chroniques d'origine nutritionnelle telles que l'obésité, le diabète, les maladies cardio-vasculaires, certains cancers et l'ostéoporose (**Henri, 2005**).

Des études récentes ont montré que l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie sont plus des facteurs de risque qu'une véritable cause. Un taux de cholestérol trop élevé provoque un risque de boucher les artères, ce qui peut entraîner de l'athérosclérose ou de l'artériosclérose en augmentant de façon considérable le taux de mortalité.

Les apports alimentaires jouent un rôle primordial, les acides gras d'origine animale tels que la viande et plus particulièrement les viandes rouges qui peuvent contenir jusqu'à 30 % de graisses cachées ; les produits laitiers et tout particulièrement les fromages gras ; les abats et la charcuterie. Les graisses saturées issues de la transformation de l'industrie agroalimentaire (huiles raffinées, chips, margarine, mayonnaise, sauces en tout genre, plats cuisinés, biscuits industriels, viennoiseries, pâtes à tarte industrielles...). Cependant un apport alimentaire d'origine végétal est bien pour abaisser le taux du cholestérol et triglycéride oléagineux en tout genre (avocats, noix, amandes...) de même que la consommation de certaines huiles riches en oméga 3 et 6. Ces huiles non raffinées sont riches en vitamine E qui inhibe la production de cholestérol tout en nettoyant les dépôts sur les artères.

L'industrie pharmaceutique a du mal à combler l'ensemble des attentes du marché actuelle en vue du nombre de personnes atteintes par les maladies issues de l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie, ainsi que des effets secondaires des médicaments de synthèse, les statines en tête, engendrent de nombreux dommages notamment au foie, des problèmes musculaires, des troubles de la concentration, de la mémoire et des troubles de l'humeur. Ironie du sort, non seulement ces molécules de

Introduction générale

synthèse abîment bien souvent le foie par encrassement des cellules hépatiques, mais en plus elles inhibent une précieuse substance, la coenzyme Q10, protectrice des risques cardiovasculaires par sa fonction antioxydant.

Depuis quelques années, les bactéries probiotiques ayant des effets bénéfiques sur la santé reçoivent un engouement croissant. L'utilisation des probiotiques en thérapeutique a naturellement concerné en premier lieu les maladies cardiovasculaires.

À une époque où nous avons besoin de nouvelles façons de contrôler et traiter les maladies cardiovasculaires ; des stratégies se développent pour élargir les applications des probiotiques en tant qu'aliments fonctionnels (**Nagpal et al., 2012**). Les probiotiques, pourraient combiner un profil d'innocuité favorable avec une amélioration de la nutrition et de la fonction du microbiote intestinal et par conséquent peuvent constituer une bonne stratégie de lutte contre l'obésité et les maladies cardiovasculaires dans les pays en développement (**FAO/OMS, 2001 ; Preidis et al., 2011**), ainsi plusieurs études cliniques ont démontré l'efficacité des BL probiotiques, en particulier les souches de lactobacilles (**Preidis et al., 2011**).

Dans notre étude, il nous a semblé intéressant d'évaluer l'impact nutritionnel d'un régime hyper-lipidique afin de mieux comprendre les anomalies associées à ces maladies ainsi que l'efficacité des bactéries probiotiques comme remède naturel. Ce régime est donné aux rats "Wistar" pendant une période de deux mois d'expérimentation. Notre objectif principal est de rechercher *in vivo* la combinaison de probiotiques adéquate pour une efficacité optimale.

Nous avons jugé utile de partager notre travail en deux parties :

➤ Une première partie fait référence à une revue bibliographique comportant des notions sur le microbiote intestinal, des généralités sur les bactéries lactiques et leurs taxonomie, les lactobacilles et les bifidobactéries, les probiotiques et prébiotiques en terminant par les rats Wistar.

➤ La deuxième partie représente la partie expérimentale au cours de laquelle nous avons effectué des tests *in vitro* et *in vivo*

✓ **In vitro** : nous avons entamé la purification des souches utilisées, les tests d'inhibitions et de résistance aux antibiotiques ainsi que l'identification par la galerie API 50.

Introduction générale

✓ ***In vivo*** : nous avons exploré l'efficacité de nos souches sur un modèle animal (le rat Wistar) à travers un régime bien précis (quantitativement et qualitativement) donné aux animaux durant 8 semaines au cours desquelles nous avons dénombré la flore fécales et analysé les principaux paramètres biochimiques (cholestérolémie, triglycéridémie et glycémie).

Chapitre 1 : La synthèse bibliographique
Chapitre 1 : La synthèse bibliographique

1-Le microbiote intestinal :

1-1-Définition :

Le microbiote intestinal désigne l'ensemble des micro-organismes résidents tout le long du tractus gastro-intestinal. Composé de 10^{12} à 10^{14} bactéries, soit 10 à 20 fois le nombre de cellules de l'organisme, il est appelé également flore commensale. **(Corthier G : 2007)** dominé par la présence de bactéries anaérobies strictes dont la quantité est de 100 à 1000 fois plus importante que celle des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, il se met en place dès la naissance et s'acquiert pendant les deux premières années de vie ,peut changer d'un individu à un autre le nombre est stable à l'âge adulte **(Corthier G : 2007)**

Ces bactéries représentent un écosystème très complexe, constitué de 500 à 1000 espèces différentes contribuent à une relation symbiotique menant à l'homéostasie L'hôte fournit un environnement riche en nutriments tandis que les bactéries commensales occupent des fonctions indispensables que les humains ne peuvent exercer eux-mêmes, telles que la production de certaines vitamines, la digestion de polysaccharides complexes et la mise en place d'un système immunitaire efficace **(Cibik , 2004)**.

1-2-Mise en place et composition :

Le tractus gastro-intestinal avant la naissance est dépourvu de bactéries. La colonisation du tractus débute dès la naissance le fœtus est un organisme complètement axénique .Les enfants nés par césarienne présentent principalement des staphylocoques, des corynebactéries ou encore des propionibactéries provenant de la peau de la mère. Lors d'un accouchement par voie naturelle, le tractus est colonisé par des micro-organismes environnementaux vaginaux et possède ainsi un microbiote comprenant majoritairement des lactobacilles, des Prevotella ou encore des Sneathiales chercheurs ont montré que la complexité de la flore d'un nourrisson dix jours après une naissance par voie vaginale peut être atteinte un mois plus tard dans le cas de naissance par césarienne ainsi les enfants prématurés connaissent un retard de la colonisation par les bifidobactéries, notamment en lien avec un séjour dans un environnement aseptisé et donc ne sont pas tout de suite en contact avec leurs mères mais plutôt avec le personnel soignant, de plus ils ont souvent une antibiothérapie prophylactique à cause de la perméabilité trop importante de leur intestin. **(Clemente et al., 2012)**.

La colonisation bactérienne du tractus du nouveau-né se poursuit lors de son alimentation avec le lait maternel (**Dominguez-Bello et al., 2010**) et évolue ensuite avec l'introduction d'une alimentation solide (**Clemente et al., 2012**). L'environnement du tractus gastro-intestinal du nouveau-né étant riche en oxygène, les premières bactéries colonisatrices de cet environnement sont les bactéries aérobies ou anaérobies facultatives comme les protéobactéries. En effet, ces bactéries sont capables de diminuer la concentration en oxygène du tractus afin de permettre l'implantation des membres du genre *Bacteroides* et des membres des phyla *Actinobacteria* et *Firmicutes*. Durant la première année de vie, le microbiote intestinal est simple et très variable en composition selon les individus et dans le temps. Il commence à se stabiliser vers l'âge de 1 à 2 ans (**Sekirov et al., 2010**).

La colonisation se fait dans un ordre établi, indépendamment de l'alimentation dans les premières 48 heures les premières bactéries qui s'installent sont des germes de type aérobie facultative, notamment des streptocoques, des entérobactéries et des staphylocoques, puis viennent les bactéries de type aérobie stricte puis au troisième jour il y a installation des bactéries de type anaérobie stricte : Bifidobactéries, Lactobacilles, et dans des proportions moindres : Bactéroïdes, Clostridia. Le groupe des staphylocoques diminue parallèlement. L'installation des bactéries de type anaérobie stricte est clairement influencée par l'alimentation

1-3-La répartition :

Dans la bouche et l'œsophage on retrouve de nombreux germes et en grande quantité. On considère cette flore comme transitoire issue des aliments ingérés même si dans sa partie distale, l'œsophage dispose d'une flore résidente c'est-à-dire qui est toujours la même

Dans l'estomac, on retrouve une flore très pauvre du fait de son acidité ; principalement des streptocoques.

Dans l'intestin grêle, la flore est également pauvre en raison du péristaltisme et de l'abondance des sécrétions. Les germes présents sont essentiellement des streptocoques, des staphylocoques et des lactobacilles.

Le gros intestin, on retrouve des bactéries type aérobie : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus faecalis*,

Staphylococcus aureus. Et des bactéries type anaérobies : *Fusobacterium*, *clostridia* et des streptocoques de type anaérobie

Dans le colon, on retrouve une prédominance des bactéries de type anaérobie car en progressant dans le tractus digestif, la quantité d'oxygène présente diminue. On peut retrouver des bactéries de type bactéroïdes, bifidobactéries et clostridium. Il y a aussi des entérobactéries, des entérocoques et des staphylocoques. La flore colique est la plus abondante, elle représente 99% des bactéries de notre organisme. (Goulet O, 2009).

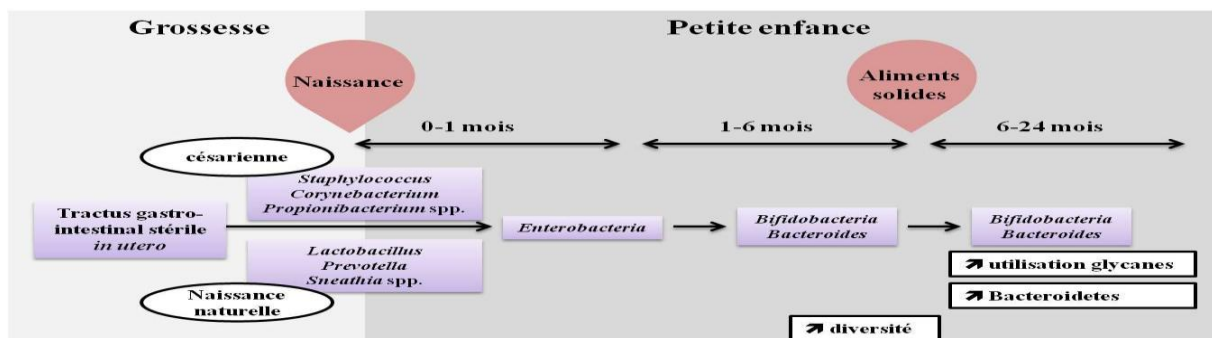


Figure 1 : évolution du microbiote du tractus gastro-intestinal de la naissance jusqu'à la petite enfance. Le tractus gastro-intestinal est stérile jusqu'à la naissance. La primo-colonisation débute lors de la naissance, et est différente selon la méthode d'accouchement. La population bactérienne évolue jusqu'à l'âge de 2 ans et se diversifie au fur et à mesure afin d'atteindre une composition proche de celle de l'adulte : le tractus gastro-intestinal est alors dominé par les phyla Bacteroidetes et Firmicutes. D'après (Clemente et al. 2012).

1-4-Comparaison du microbiote chez des enfants nourris au lait maternel par rapport à des enfants nourris avec des préparations industrielles :

Le mode d'alimentation du bébé joue aussi un rôle important dans l'établissement de la flore digestive. Le lait maternel contient des oligosaccharides bifidogènes qui vont permettre le développement des bifidobactéries. Un enfant allaité plus de 4 mois présente moins de risque d'infections (diarrhées aiguës 70%, otites 30%, infections respiratoires sévères 12%). Les laits industriels vont favoriser l'implantation d'une plus grande diversité de bactéries mais moins protectrices.

L'analyse comparative de composition de la flore fécale des nouveau-nés allaités au sein ou avec une préparation pour nourrisson révèle des taux variables des bifidobactéries, *Escherichia coli* et Bactéroïdes jusqu'à trois jours après la naissance. Au septième jour, chez les bébés recevant le lait maternel, les bactéries type Bactéroïdes, Lactobacilles et

bifidobactéries représentent un grand pourcentage de la flore totale. Chez les bébés nourris avec une préparation pour nourrisson, ce sont plutôt les genres Bactéroides, Clostridies et Entérobactéries qui deviennent dominants. Ces derniers sont des marqueurs prédictifs de l'absence de lait maternel dans l'alimentation du nouveau-né. Apparemment le lait maternel semble retarder l'apparition en dominance d'une flore diversifiée et composée des genres Clostridies et apparentés. (Cibik, 2004).

Tableau 1 : différence entre la composition de la flore bactérienne chez l'enfant nourri au lait maternel et au lait commercialisé

Lait maternel	Lait industriel
Bifidobactéries	Bactéroides
Lactobacilles	Clostridies
Bactéroides	Entérobactéries

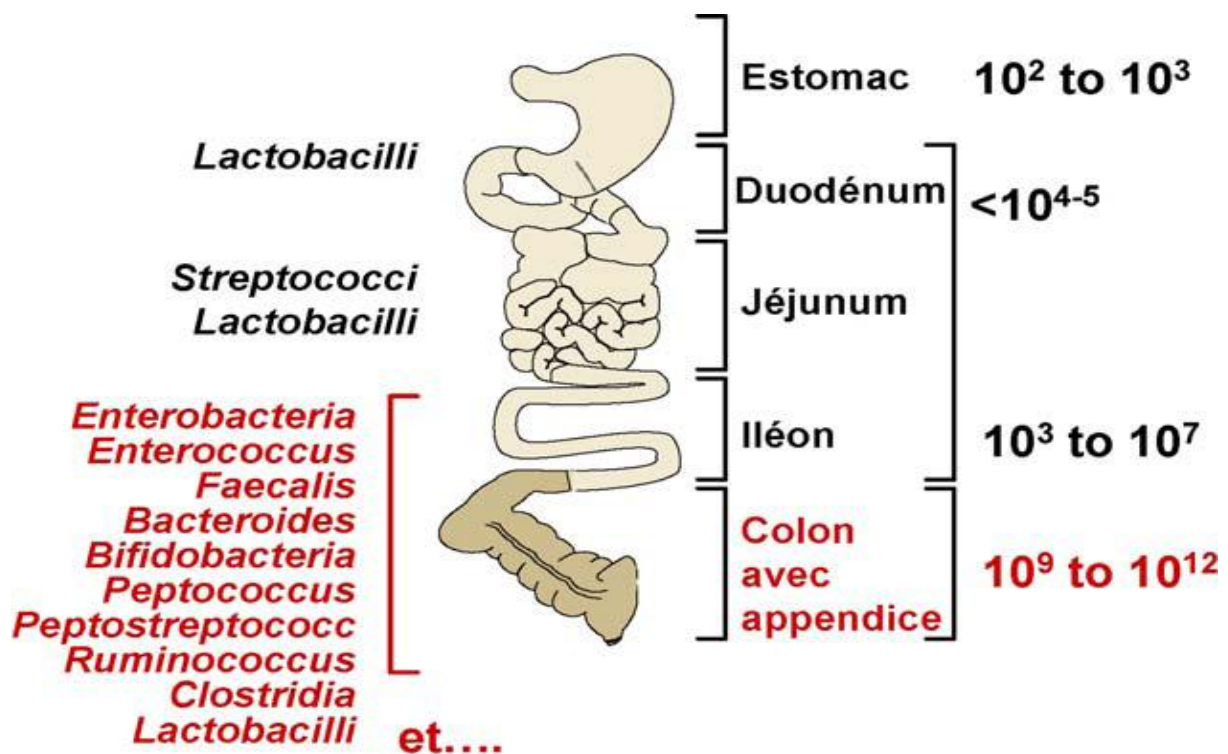


Figure2:le microbiote intestinal humain. (Fallani M., et al ; 2010)

1-5-Fonction du microbiote intestinal:

La présence permanente d'une importante biomasse bactérienne exerce des effets physiologiques dont les répercussions pour l'hôte sont, pour la plupart, bénéfiques. Parmi les grandes fonctions du microbiote,

- La fermentation des substrats disponibles au niveau du côlon,
- Le rôle de barrière à la colonisation par les micro-organismes pathogènes,
- Le développement et la maturation du système immunitaire intestinal
- les interactions avec les cellules épithéliales ont des rôles essentiels pour le maintien de la santé de l'hôte.

La flore digestive semble avoir des fonctions nutritionnelles, métaboliques ,immunologiques et protectrices (Lee, 2002; Herich et Levkut, 2002; Lam *et al.*, 2005).

1-6-Les fonctions métaboliques du microbiote intestinal :

1-6-1-Métabolisme des glucides :

Les glucides complexes composant les fibres alimentaires, principalement rencontrés dans les céréales, les fruits et les légumes, sont majoritairement représentés par l'amidon résistant aux α -amylases de l'hôte, les polyosides composant la paroi des végétaux (cellulose, hémicelluloses, pectines) ainsi que des glucides de réserves, des composés algaux, des oligosides ou des sucre-alcools non assimilés par l'organisme. La quantité totale de glucides fermentescibles parvenant au côlon varie de 10 g à 60 g par jour en fonction du régime alimentaire (Cummings J.H., Macfarlane G.T, 1991)

1-6-2-Digestion des protéines :

L'effet de la microflore sur la digestibilité des protéines conduit selon les études à des résultats variables, probablement dus aux différences des compositions des régimes alimentaires. La microflore aurait un effet positif sur la digestion des protéines dans le cas de protéines de mauvaise qualité qui sont mal hydrolysées par l'hôte et pourraient être hydrolysées par la microflore. Dans le cas des protéines sévèrement modifiées par la chaleur, même la microflore ne pourrait les hydrolyser. Par ailleurs la microflore pourrait avoir un rôle sur la digestibilité dans la mesure où elle augmente la production de protéines endogènes

(mucus, débris cellulaire, biomasse microbienne). D'une manière générale, la flore digestive semble jouer un rôle de conservation de l'azote : libération et recyclage de NH (Gabriel et al., 2003).

1-6-3-Digestion des lipides :

Comme chez tous les animaux, la flore digestive des oiseaux modifie largement les sels biliaires: déconjugaison, désulfatation et déhydroxylation. En outre elle participe à la saturation des acides gras polyinsaturés par hydrogénation comme les sels biliaires servent à la formation des micelles, leur faible concentration réduit la solubilisation des lipides et donc leur absorption, en particulier ceux contenant des acides gras saturés à longue chaîne. (Larbier et Leclercq, 1994).

1-6-4-Minéraux et vitamines :

La microflore intervient également sur le métabolisme minéral et vitaminique. Elle a un effet négatif sur l'absorption du calcium et entraîne une augmentation des besoins en magnésium et en phosphore, les vitamines hydrosolubles, surtout de groupe B, sont synthétisées en quantités appréciables par la flore bactérienne au niveau des cæcums du poulet. Ainsi que la vitamine K, mais en quantité insuffisante pour répondre aux besoins. Mais elles seraient utilisées par elles-mêmes, sauf l'acide folique qui pourrait servir à l'animal. En présence de flore les besoins en vitamines seraient augmentés pour détoxifier les produits bactériens et répondre au stress physiologique. (Souilem et Gogny, 1994).

1-7-Impact sur la physiologie digestive :

La microflore et la muqueuse digestive ont des relations à la fois symbiotiques et compétitives qui entraînent des modifications de la structure et du fonctionnement du tube digestif.

- Les effets de la microflore sur l'anatomie et la physiologie du tractus digestif :

Par rapport à des animaux axéniques, les animaux conventionnels, ont un intestin plus lourd et plus long, ainsi qu'une paroi plus épaisse (Denis et al., 2004). Cet épaississement est dû principalement aux tissus connectifs en particulier la lamina propria, et au tissu lymphoïde (augmentation de la taille des plaques de Peyer). Les villosités sont plus hautes et de formes irrégulières, et les cryptes plus profondes.

1-8-Rôle sur la santé :

1-8-1-Stimulation du système immunitaire :

La flore intestinale participe au développement et au maintien d'un système immunitaire intestinal (SII) efficace. D'une part, elle est une source d'antigènes capables de déclencher la réponse immunitaire spécifique systémique et locale (**Salminen et al., 1998**), d'autre part, elle influence le nombre et la distribution des populations cellulaires du SII et joue un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire (**Cebra, 1999 ; Gauthier, 2002**). Où elle serait responsable de l'évolution de la production d'IgM en IgG, ces derniers étant les anticorps les plus importants quantitativement.

Elle agit sur le développement et la maturation des plasmocytes producteurs d'IgA sécrétoires, (**Cebra, 1999 ; Corpet, 2000 ; Herich et Levkut, 2002**). Certaines bactéries stimulent l'immunité non spécifique en activant la fonction des macrophages (phagocytose, synthèse de cytokines) (**Lee et al., 2002 ; Lu et al., 2003**).

1-8-2-Protection contre les microorganismes néfastes :

La flore autochtone empêche l'implantation de la flore pathogène (**Gabriel et al, 2003 ; Denis et al., 2004; FAO/WHO, 2004**).

Les interactions microbiennes sont les principales responsables du maintien et de la régulation de la microflore gastro-intestinale de l'hôte ; elles sont à la base des mécanismes par lesquels la microflore, s'oppose à l'établissement des microorganismes que l'organisme hôte ingère quotidiennement. Les divers mécanismes formant la première ligne de défense de l'hôte sont nommés résistance à la colonisation, exclusion compétitive, ou effet barrière en empêchant leur translocation dans la circulation sanguine. L'effet barrière de la microflore intestinale est dit préventif ou curatif selon qu'il se manifeste avant ou après l'introduction du germe pathogène.

Cet effet est dit drastique si la bactérie indésirable est totalement éliminée. Il est dit perméabilisant si le germe pathogène nouvellement se range dans la population sous dominante. Les mécanismes à la base de cet effet barrière sont variés :

La flore naturelle du jabot, en particulier les lactobacilles, sont fixés sur l'épithélium squameux non sécrétoire du jabot des volailles. Cette faculté d'adhésion leur permet de se maintenir en place en quantité importante pendant toute la vie de l'animal. Ils sont également présents dans la lumière et diminuent le pH de cet organe autour de 4.5 conduisant à un effet bactéricide limitant la croissance des bactéries néfastes. La flore produit aussi des acides organiques volatils, dont le type et la quantité dépendent de la nature des bactéries et des substrats disponibles. Dans le jabot, on trouve principalement de l'acide lactique, et dans les caeca, principalement de l'acide acétique, en moins grande quantité de l'acide propionique et butyrique, et des traces d'autres acides. Ces acides organiques ont un effet bactéricide.

L'effet barrière peut être dû à la production de substances antimicrobiennes par la flore autochtone. Ces composants peuvent soit inhiber, soit tuer les pathogènes. Ainsi, les lactobacilles homofermentaires dont *L. acidophilus* produisent différents types de bactériocines qui ont un large spectre d'activité, ainsi que du peroxyde d'hydrogène (Prioult, 2003 ; Kralik et al., 2004).

1-8-3-Production des substances et métabolites :

Les bactéries produisent des vitamines B, K et E (Coates 1980 cité par Gabriel et al., 2005) et différentes substances antimicrobiennes. La flore bactérienne produit des acides volatils qui ont un effet barrière. En plus les bactéries produisent de l'ammoniac qui pourrait être utilisé par l'hôte pour la synthèse d'acides aminés non essentiels, mais qui est aussi néfaste pour la cellule et doit être détoxifié en acide urique. Les bactéries décarboxylent certains acides aminés conduisant à la formation d'amines. Ces amines qui stimulent la croissance de la muqueuse intestinale pourraient également avoir un effet négatif. Ainsi, l'histamine, bien qu'étant beaucoup moins efficace que les cytokines, est impliquée dans la réaction inflammatoire (Gabriel et al., 2005).

2-Les bactéries lactiques :

2-1-Généralités :

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophe et chimiorganotrophes, tirent leur appellation du fait qu'elles produisent de l'acide lactique en grande quantités à partir de sources hydrocarbonés assez complexes comme les sucres, les alcools et les acides organiques, formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilles (**Badis et al., 2005**). Ce sont des bactéries à Gram positif, asporulantes, aéro-anaérobies facultatives ou micro-aérophiles, généralement immobiles, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C (**Brahimi, 2015**).

Elles rassemblent 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 :

1. Homolactique si l'acide lactique produit constitue plus de 90 % des produits de fermentation,
2. Hétérolactique facultative si elles produisent de l'acide lactique et de l'acide acétique,
3. Hétérolactique stricte si elles produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂ (**Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2005 ; Vandamme et al., 1996**).

La division des BL se déroule sur un seul plan à l'exception des genres : *Pediococcus*, *Aerococcus*, et *Tetragenococcus*. (**Salminen et al., 2004; König et Fröhlich, 2009 ; Pringsulaka et al., 2011**).

En général ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (**Dellaglio et al., 1994; Salminen et al., 2004 ; Zhang et Cai, 2014**).

En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutéline, le dioxyde de carbone et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles ; C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait (**Dellaglio et al., 1994; Hogg, 2005; Novel, 1993**).

Elles sont toutes considérées comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe), excepté certaines espèces d'entérocoques et certains ont obtenu le statut QPS (Quality Presumption of Safety) (**Streit, 2008**).

2-2-Habitat :

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

Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et on peut les trouver aussi dans les cavités buccales, vaginales et dans les fèces (**Leveau et Bouix, 1993; Hassan et Frank, 2001**).

Certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (**Bekouche, 2006**).

Des bactéries lactiques ont souvent été isolées de poissons vivants, en général dans le tractus intestinal. Des bactéries du genre *Lactobacillus* ont été retrouvées dans du saumon (*Salmo salar*) et de l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus* L.).

Des bactéries du genre *Carnobacterium* ont été isolées elles aussi du saumon et d'omble chevalier, ainsi que de la truite, de la morue et du loup. Les espèces de *Carnobacterium* les plus fréquemment retrouvées sont *Cb. divergens* et *Cb. maltaromaticum* (anciennement *Cb. piscicola*). La présence d'autres genres et espèces tels que *Lactococcus piscium*, *Streptococcus* et *Leuconostoc* a également été rapportée. Récemment, l'identification bactérienne par le séquençage des régions variables V1 et V2 du gène de l'ARN 16S ont permis de mettre en évidence la biodiversité de la flore lactique présente dans

le tractus digestif de différents salmonidés (truites et saumons). Si *Cb.maltaromaticum* est encore révélée être l'espèce majoritaire de cet écosystème, les genres *Lactococcus* (représenté par l'espèce *Lc. lactis*), *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. sakei* et *Lb. curvatus*) ainsi que *Leuconostoc* (*Leuc. mesenteroides*) étaient aussi présents.

Conventionnellement, l'identification des bactéries lactiques utilise des techniques simples de morphologies, de coloration, des tests biochimiques ou .Chaque espèce doit être présentée par une souche type (**Staly et Krieg 1886 ; Novel, 1993**). En absence d'une identité parfaite avec la souche de référence, on tend à décrire des souches atypiques ou indéterminées. L'existence d'un haut degré de similitude phénotypique permet de définir l'espèce phénotypique (**Stackebrandt et good fellow, 1992**) mais la variabilité oblige à recourir à d'autres critères d'identification. Ainsi le genre *Lactococcus* comprend des espèces précédemment classées dans le genre *lactobacillus* sur le critère de la morphologie cellulaire (**Schleifer et al., 1986**) .

La composition d'ADN mesurée par le pourcentage en bases guanine et cytosine (GC%) est le premier critère de parenté qui permet de connaître l'homogénéité des espèces constitutives.

Enfin des bactéries lactiques des espèces *Lc. lactis* et *Lc. raffinolactis* ont été retrouvées en temps qu'espèces dominantes de la flore intestinale de poissons d'eau douce (carpes) (**Matamoros, 2008**).

2-3-Taxonomie :

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle (1919), les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique (**Lahtinen et al., 2012**).

La monographie d'**Orla- Jensen (1919)** a constitué la base de la classification actuelle des BL.

Les critères utilisés (morphologie cellulaire, types fermentaire, les températures de croissance et l'utilisation des sucres) sont toujours très importants pour la classification des BL, bien que l'avènement d'outils taxonomiques plus modernes, les méthodes biologiques en particulier moléculaires, ont considérablement augmenté le nombre de genres de BL à partir

des quatre initialement reconnue par Orla-Jensen (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*) (Lahtinem et al., 2012).

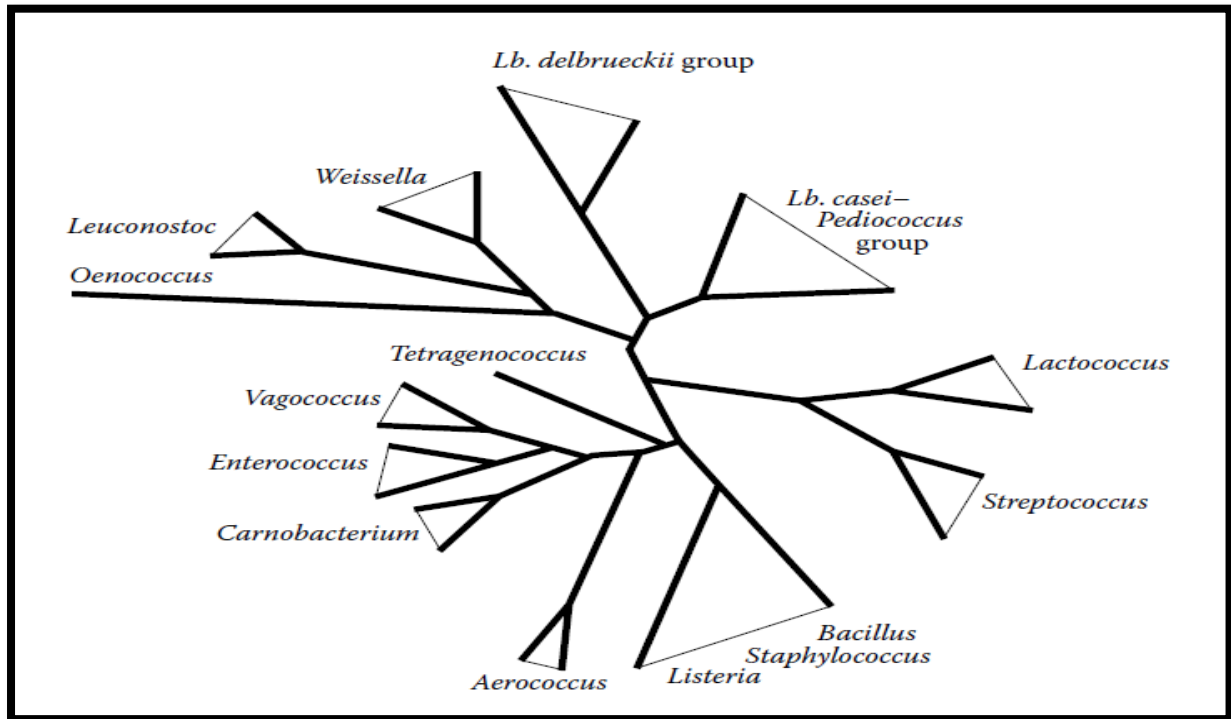


Figure 3 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques, incluant quelques genres aérobies et anaérobies facultatifs de Firmicutes (Lahtinem et al., 2012).
Note : Les distances évolutives sont approximatives.

2-4-Applications industrielles des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (Streit et al., 2007).

2-4-1-Domaine alimentaire :

2-4-1-1- Rôle sur la structure, la texture et les caractéristiques organoleptiques:

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières conduisant ainsi à de nombreux produits : saucissons, les laits fermentés et les fromages représentent des produits fabriqués à partir de matières

premières d'origine animale, tandis que la choucroute, les olives et certains vins (fermentation malolactique) sont des exemples de transformation de matières premières d'origine végétale. Ils sont aussi utilisés en boulangerie traditionnelle. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand consommateur de ferments lactiques commerciaux, pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres (**Daly et al., 1998 ; Hugenholtz et al., 2002 ; Axelsson, 2004 ; Streit et al., 2007**).

Selon **Mäyrä-Mäkinen et Bigret (1998)**, la fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de plus de mille produits différents, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité.

En plus de l'industrie fromagère, les lactobacilles sont utilisés dans d'autres produits laitiers. Parmi ces produits, on trouve le Kuelenaoto et le Kwerioonik qui sont des produits ethniques du lait fermenté (**Vizoso Pinto et al, 2006**), le **Laban zeer**, le **M'Bannick**, le **Koumiss** et le **Zincica (Codex alimentarius, 2003)**.

Pour les laits fermentés, l'acidification provoque la coagulation du lait (en facilitant l'action de la présure) et l'augmentation de la formation du caillé. Selon les produits, la texture recherchée est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé ; kéfir). Pour obtenir une consistance déterminée ; l'utilisation des souches plus ou moins acidifiantes peut être couplée à celle des souches productrices de polysaccharides et de mannitol (**Satura et Federighi, 1998**).

La production en dehors de l'acide lactique, d'autres produits tels que l'acétoïne, le diacétyl et l'acétaldéhyde ou l'éthanol sont responsables des saveurs caractéristiques (**Boudjemaa, 2008**).

Le lait ne pouvant pas être conservé longtemps, ses valeurs nutritionnelles sont gardées sous la forme d'un fromage. L'immense variété des fromages est en partie relative à une grande variété de souches employées dans leurs fabrications, modifiant ainsi le goût et la texture de ces produits. En effet les bactéries lactiques sont responsables de l'apparition de qualités organoleptiques souhaitables de ce produit transformé, en plus de sa protection et sa conservation (**Van de Gudite et al., 2002**).

En fromagerie, les lactobacilles sont généralement utilisés pour la préparation de pâtes dures ou semi-dures typique des fromages suisses et italiens (**Alice et Sanchez-Rivas, 1997**).

Ces espèces participent dans l'affinage des fromages par leur activité protéolytique, et la formation d'arômes qui en résulte (**Lane et al., 1996 ; Lynch et al., 1996**).

La production de CO₂ par les bactéries lactiques provient de l'hétérofermentation du lactose et l'utilisation du citrate. Dans la technologie des fromages à pâtes persillées, notamment le Roquefort, le CO₂ produit est à l'origine de la formation des cavités dans le caillé, qui seront ensuite peuplées par *Penicillium roqueforti* (**Bourel et al., 2001**).

Le CO₂ produit donne aussi l'aspect légèrement effervescent et onctueux du beurre (**Kihal, 1996**).

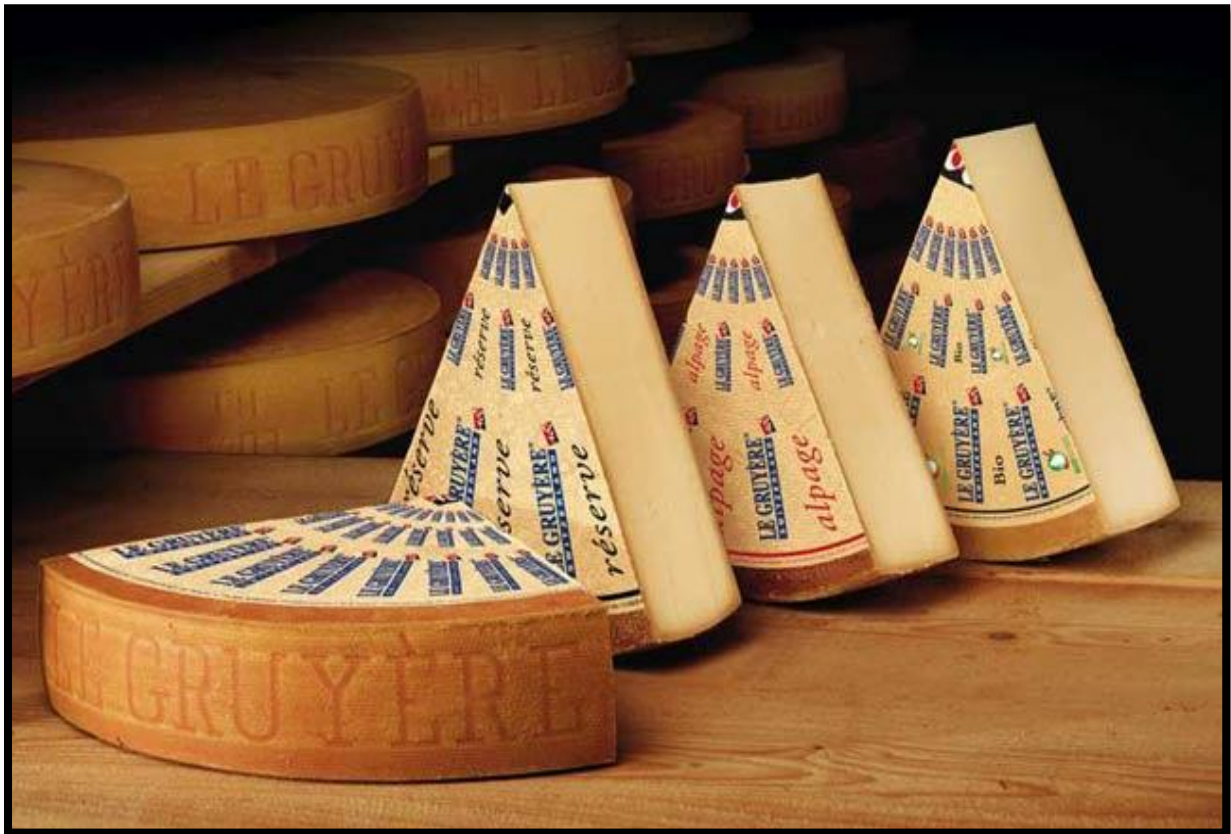
Dans le cas de l'Emmental « fromage à pâte pressée cuite », une fois les meules formées, après caillage du lait et pressage, ils les immergent dans l'eau salée pour permettre la fabrication d'une croûte. Ensuite débute un affinage de 45 jours, dans les caves tempérées. Les meules sont ensuite transférées dans des caves plus chaudes. Une fermentation hétérofermentaire débute alors. Les BL libèrent à l'intérieur de la pâte du CO₂. Ne pouvant s'échapper des meules dont la croûte est imperméable, ces bulles de gaz créent des trous (dits aussi « ouvertures » ou « yeux ») dans la pâte. C'est également ce qui explique que les meules plates deviennent peu à peu bombées, sous l'effet de la pression.

Ces trous sont l'identité de l'Emmental et permettent de savoir si le fromage est correctement affiner. L'affineur sonne régulièrement le fromage avec un petit marteau pour vérifier l'évolution de la meule. Les trous font caisse de résonance, il peut ensuite sonder la meule en prélevant un cylindre pour confirmer si l'affinage est fini ou pas encore.

Le gruyère et l'emmental sont tous deux des fromages à pâte pressée cuite. Leur principale différence réside dans l'aspect de leur pâte : parsemée de larges trous pour l'emmental mais le gruyère (le vrai gruyère donc « suisse ») n'en contient pas (**Figure 4**).



A



B

Figure4: comparaison entre L'emmental et le (Fromages à pâtes pressées cuites).

A : Emmental (les trous d'air causés par le CO₂) **B** : Gruyère (pas de trous d'air)

Tableau 2: Les principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (**Penaud, 2006**)

Genre	Substrat	Exemples de produits
<i>Bifidobacterium</i>	lait	laits fermentés
<i>Lactobacillus</i>	lait	yaourts, laits fermentés, kéfirs, fromages
	viande	saucissons secs, jambons secs
	végétaux	choucroute, olives, "yaourts" au lait de soja
	céréales	pain au levain, bières
<i>Lactococcus</i>	lait	fromages, kéfirs
<i>Leuconostoc</i>	Végétaux	choucroute, olives, vin
	lait	fromages, kéfirs
<i>Pediococcus</i>	végétaux	choucroute
	viande	saucisses semi-séchées
<i>Oenococcus</i>	végétaux	vin
<i>Streptococcus</i>	lait	yaourts, laits fermentés, fromages

2-4-1-2- Rôle dans la conservation :

*production d'acide lactique : Les bactéries lactiques ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.

*production de bactériocines : Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactique, elles sont généralement thermorésistantes.

2-4-2-Domaine de santé :

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du XXème siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les lactobacilles pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant sa flore. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques (**Langella et al., 2001 ; Calvez et al., 2009**).

Les bienfaits des bactéries lactiques sont de plus en plus étudiés, certains sont bien établis d'autres restent encore controversés (Voir les bienfaits des probiotiques) (**Langella et al., 2001 ; Calvez et al., 2009**).

L'extraordinaire diversité de structures des EPS en fait une classe de molécules dont les applications directes ou indirectes dans le domaine médical sont en plein essor. Le dextrane et ses dérivés sont utilisés en laboratoire pour la purification de composés d'intérêt médical comme certaines enzymes, mais aussi comme outil thérapeutique en tant que « plasma artificiel ». Ils peuvent servir pour l'encapsulation de médicaments dans le but d'un relargage contrôlé ou en exploitation des propriétés biologiques de ces polymères.

La préparation de vaccins à partir d'EPS évite l'utilisation d'extrait cellulaires et donc les effets secondaires provoqués par les métabolites tels que les lipopolysaccharides et les protéines (Benasla, 2012).

Il a été montré qu'un certain nombre d'exopolysaccharides possédaient des activités biologiques innovantes comparables à celles des héparinomimétiques, propriétés anti tumorales ou antivirales par exemple.

L'extrême diversité des EPS a rendu possible l'identification d'homologies de structures avec des polysaccharides provenant de cellules eucaryotes. Ces analogues structuraux pourront être utilisés en substitut ou en complément des produits naturels (Benasla, 2012).

2-4-3-En chimie :

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique.

3-Les bifidobactéries et les lactobacilles :

3-1-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*) (Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007).

Les bifidobactéries ont été découverts pour la première fois dans les fèces de bébés nourris au lait maternel par **Henri Tissier (1900)**, qui a isolé une bactérie avec une forme étrange et caractéristique en « Y » (**Zhang et Cai, 2014**).

Ce sont des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage en G +C (46-67%). Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière en forme de V, X ou Y ressemblant à des branches mais pouvant être coccoïdes (**Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007**).

3-1-1-Morphologie :

Leur morphologie est généralement appelée bifide. La raison réelle pour la forme irrégulière de bifidobactéries n'est pas encore clairement comprise. Cependant, quelques études ont révélé que l'absence ou la faible concentration du N-acétylamino « impliqué dans la synthèse des peptidoglycanes », les ions Ca^{2+} ou des acides aminés dans les milieux de croissance peut induire à la forme bifide (**Zhang et Cai, 2014**).

3-1-2-Physiologie :

3-1-2-1-Température :

La majorité des espèces sont anaérobies strictes, mais certaines espèces, telles que *B. psychraerophilum*, *B. scardovii* et *B. tsurumiense*, peuvent tolérer l'oxygène et croître dans des conditions aérobies. La température optimale de croissance est de 37 à 41° C pour la plupart des espèces avec une température minimale de croissance de 25°C et maximale de 45°C. Il est à noter que *B. psychraerophilum* peut croître à 8° C et *B. thermacidophilum* à 49,5°C. Le pH optimal de croissance est de 6,5 à 7,0 (**Zhang et Cai, 2014**).

3-1-2-2-L'oxygène :

Les bifidobactéries sont des microorganismes anaérobies strictes (**Scardovi, 1984**) mais la sensibilité à l'oxygène varie entre les espèces (**De Vries et Stouthamer, 1967**) les espèces qui tolèrent l'oxygène ex (*B. lactis*, *B. aerophilum*, *B. psychroaerophilum*) présente une faible activité catalytique qui élimine les traces du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou le fait que NADH oxydase de ces souches ne forme pas de H_2O_2 alors l'accumulation de H_2O_2 inhibe l'activité de F6PPK pour les souches extrêmement sensibles à l'oxygène n'accumulent pas

H₂O₂ et l'oxygène bloque la multiplication bactérienne par l'intermédiaire d'un potentiel d'oxydoréduction trop élevé (Scardovi, 1986 ; Romond, 1988).

3-1-2-3Le pH :

Les bifidobactéries sont considérées comme des microorganismes acidophiles, mais elles ne supportent pas des Ph trop bas et les ph basiques (Biaviti, et al 1992) à l'exception l'espèce *B.animalis* *supp lactis* résiste à un Ph 3.7 (Meile et al., 1997). La production maximale d'acide lactique et acétique chez les bifidobactéries exige un pH optimal initial proche de la neutralité qui varie entre 6-7 (Collins et al., 1984 ; Scardovi , 1986).

A l'exception de *B. thermacidophilum* subsp. *Thermacidophilum* quia une croissance retardée à pH 4 (Dong et al, 2000) et *B. animalis* subsp. *animalis* et *B. animalis* subsp. *lactis* qui peuvent survivre exposer au pH 3.5 pendant 3 heures (Matsumoto et al., 2004), les autres espèces du genre ne peuvent pas croître à un pH de 4,5 à 5,0 ou de pH 8,0-8,5 (Zhang et Cai, 2014).

Traditionnellement, les espèces de *Bifidobacterium* ont été identifiées sur la base de l'hôte à partir duquel elles ont été isolées, leur morphologie cellulaire, le type fermentaire ou par leur capacité à utiliser divers sucre. Malheureusement, toutes ces méthodes phénotypiques manquent de reproductibilité car les Bifidobactéries varient en fonction de la culture et des conditions utilisées dans les différents laboratoires et même entre les isolats de la même espèce (Zhang et Cai, 2014).

Au cours de la dernière décennie, le développement des outils de biologie moléculaire a conduit à des modifications profondes dans les méthodes d'identification de ces bactéries et a donné lieu à divers ajustements dans leur classification. L'identification génotypique, méthodes utilisant les gènes 16S et 23S de l'ARNr sont plus précises, même si elles ne peuvent pas distinguer clairement entre toutes les espèces de *Bifidobacterium*, par exemple, *B. Catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. adolescentis*, *B. stercoris*, *B. coryneforme* et *B.indicum*, ont montré plus de 99% d'homologie (Zhang et Cai, 2014).

Une analyse phylogénétique basée sur le séquençage des gènes de l'ARNr 16S des 46 espèces et sous-espèces actuellement reconnues du genre *Bifidobacterium* a abouti à un arbre phylogénétique (Figure 5) qui est en accord avec les analyses taxonomiques décrites précédemment. Selon leur relations phylogénétiques, les 46 espèces et sous-espèces du genre

Bifidobacterium pourrait être divisées en 8 groupes phylogénétiques et 11 espèces simples (Zhang et Cai, 2014).

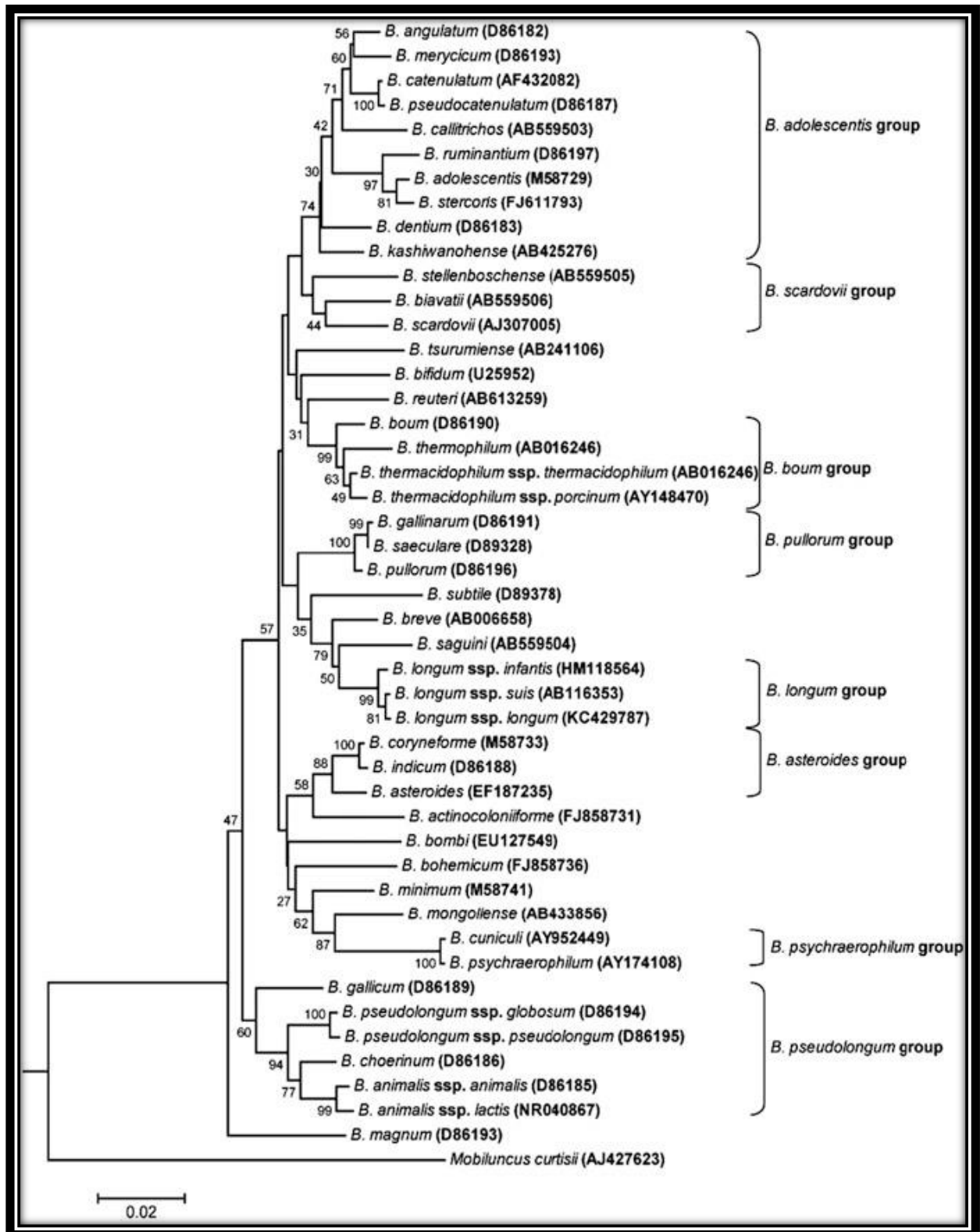


Figure 5: Les relations phylogénétiques entre les espèces du genre *Bifidobacterium* basé sur le séquençage des ARNr 16S (Zhang et Cai, 2014).

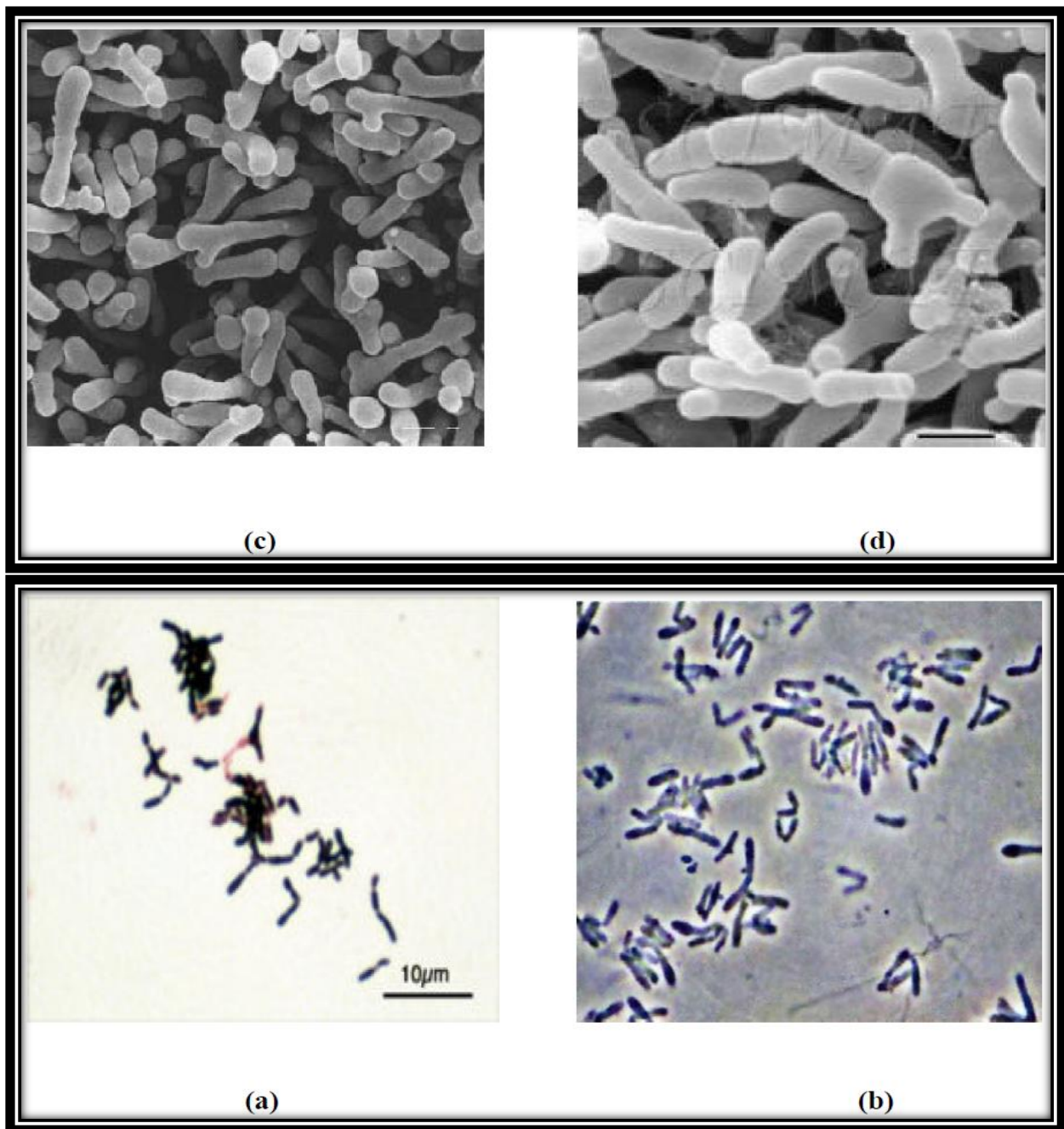


Figure 6: Observation microscopique des cellules de *Bifidobacterium* sp.

Observation au microscope optique :

(a): *Bifidobacterium adolescentis* (Bar: 10µm) (Anonyme, 2008).

(b): *Bifidobacterium animalis* (x500) (Trojauova et al., 2006).

Observation au microscope électronique:

(c): *Bifidobacterium* sp. (Bar: 1 µm) (Biavati et al., 2000).

(d): *Bifidobacterium breve* (Bar: 1µm) (Anonyme, 2006).

3-1-3-Profil fermentaire :

La présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique (Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007).

Tableau 3 : profil fermentaire des différentes espèces de *Bifidobacterium* (Scardovi,1986)

Sucres Espèces	Xyl	Man	Fruc	Gal	Sucr	Treh	Mlb	Matol	Inul	Sali
<i>B.bifidum</i>	-	-	+	D	-	-	D	-	-	-
<i>B.longum</i>	D	D	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B.longum</i> , <i>B.Infantis</i>		D	+	+	+	-	+	-	D	-
<i>B.breve</i>	D	+	+	+	+	D	+	D	D	+
<i>B.adolescentis</i>	-	D	+	+	+	D	+	D	D	+
<i>B.angulatum</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>B.catenulatum</i>	+	-	+	+	+	D	+	D	D	+
<i>B.pseudocatenulatum</i>	+	+	+	+	+	D	+	-	-	+
<i>B.Dentium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>B.pseudolongum</i> ,subsp . <i>Globosum</i>	D	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B.pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B.cuniculli</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>B.choerinum</i>	D	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>B.animalis</i>	+	D	+	+	+	D	+	-	-	+
<i>B.thermophilum</i>	+	-	+	+	+	D	+	-	D	D
<i>B.boum</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>B.magnum</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>B.pullorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

<i>B.longumbiotype suis</i>	+	D	D	+	+	-	+	-	-	-
<i>B.minimum</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>B.subtile</i>	-	-	+	+	+	D	+	-	D	D
<i>B.coryneforme</i>	+	+	+	+	+	-	+	-		+
<i>B.asteroides</i>	+	-	+	+	D	-	+	-	-	+
<i>B.indicum</i>	-	D	+	+	D	-	+	-	-	+

Xyl : Xylose **Man :**Manitol **Fruc :**fructose **Gal :** galactose **Sucr:** sucrose **Treh:** trehalose **Mlb:** Melobiose **Malt:** Maltose **Inul:** Inulin **Sali:**Salicin

3-2-Le genre *lactobacilles*:

Les lactobacilles font partie du phylum des Firmicutes, de la classe des Bacilli, de l'ordre des Lactobacillales et de la famille des Lactobacillaceae.

En 1896, le genre *Lactobacillus* a été décrit pour la première fois par Beijerinck, et l'espèce type était *Lactobacillus delbrueckii*.

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal et de loin le plus grand et le plus diversifié de la famille des Lactobacillaceae, il comprend actuellement 158 espèces, sept de ces espèces sont constituées de 18 sous-espèces (**Zhang et Cai, 2014**).

Il est également très hétérogène, englobant les espèces avec une grande variété phénotypique, biochimiques et physiologiques. L'hétérogénéité se traduit par la gamme du pourcentage GC de l'ADN des espèces incluses dans ce genre. Cette gamme est de 32 à 55% (**Zhang et Cai, 2014**).

Nombreuses d'entre elles sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants (**Dworkin et al., 2006**). Ils sont immobiles, asporulés et catalase négative. On rencontre chez les lactobacilles une variabilité de forme et de longueur (fins, incurvés, coccobacilles,...).

La longueur des bacilles et le degré de courbure dépend de l'âge de la culture, la composition du milieu (par exemple, la disponibilité des esters d'acide oléique) et le taux d'oxygène.

Cependant, les principales différences morphologiques entre les espèces restent habituellement clairement reconnaissables. Certaines espèces de lactobacilles produisant du gaz (Par exemple, *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus brevis*) présentent toujours un mélange de bacilles longs et courts (**Figure - 7**)(**De Vos et al., 2009**).

La division cellulaire se produit seulement sur un seul plan. La tendance à former des chaînettes varie selon les espèces et même des souches, ceci dépend de la phase de croissance et le pH du milieu (**Zhang et Cai, 2014 ; De Vos et al., 2009**).

Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, vitamines, acides gras, nucléotides, glucides et en sels minéraux. La température de croissance est comprise entre 2 et 53 ° C, avec un optimum entre 30 et 40 ° C (**De Vos et al., 2009**).

Le pH de croissance est compris entre 3 et 8 avec un optimum habituellement allant de 5.5 à 6.2 (**Zhang et Cai, 2014**).

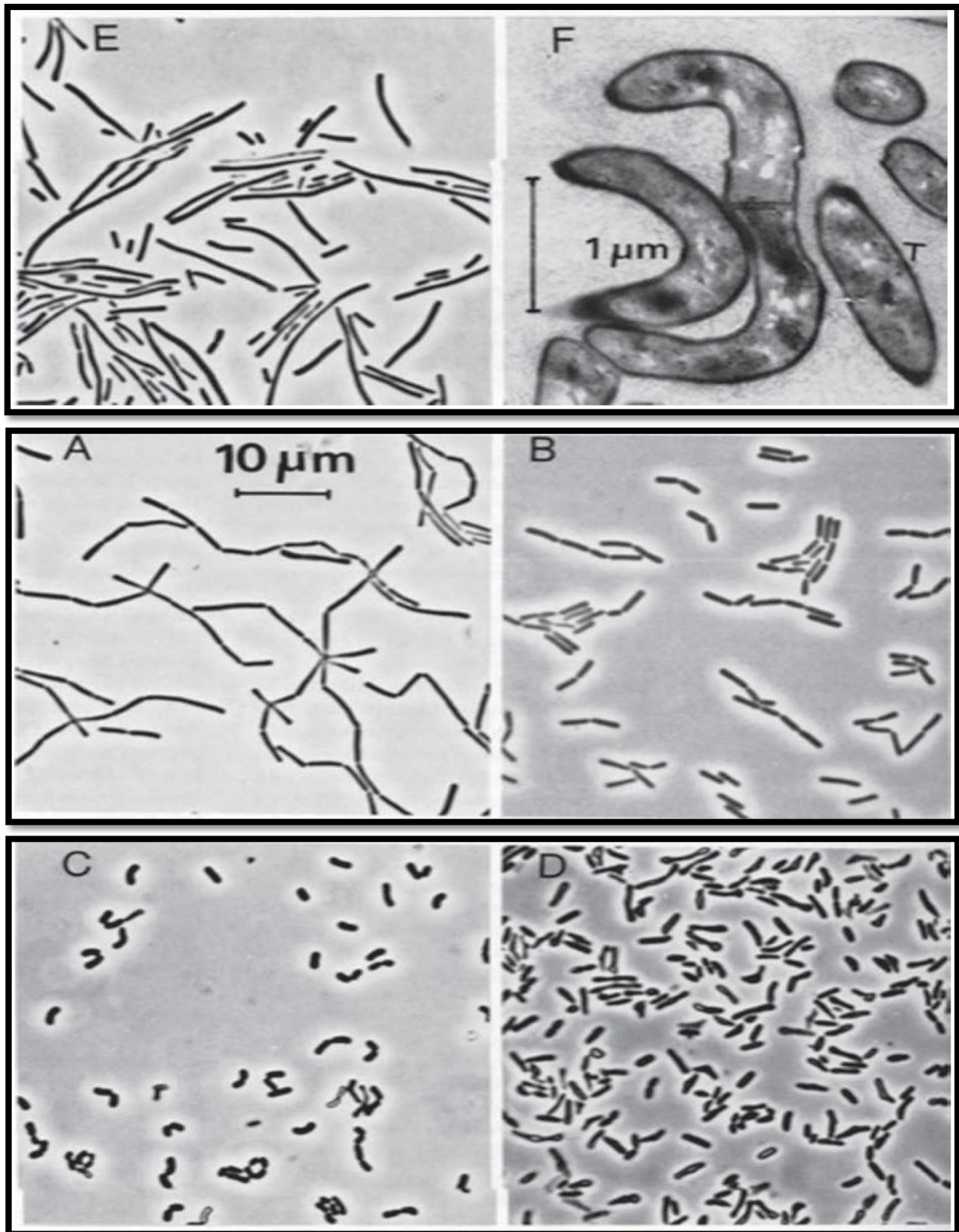


Figure7: Contraste de phase (A-E) et d'électrons (F) des micrographies montrant la différence de morphologie des cellules de Lactobacilles(De Vos et al., 2009) :

A : *Lactobacillus gasseri*; B : *Lactobacillus agilis*; C : *Lactobacillus curvatus*; D, *Lactobacillus mineur*; E : *Lactobacillus fermentum*; et F, la forme de l'involution de lactobacilles dans une lame mince d'un grain de kéfir

3-2-1-Habitat :

Les lactobacilles ont un habitat vaste et ils sont présents dans de nombreux biotopes : eau, sol, lait et produits laitiers, végétaux, produits carnés, poissons, bière, vin, fruits et jus de fruits (Fredereghi, 2005).

Les lactobacilles constituent, entre autres, une part importante du microbiote humain et animal. Chez l'Homme sain, ils se retrouvent tout au long du système digestif : de la bouche au côlon. Les espèces les plus rencontrées sont : *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. brevis*, le groupe *L. casei*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. vaginalis* et *L. ruminis* (Reuter, 2001; Eckburg et al., 2005 ; Walter, 2008; Ozgun et Vural, 2011).

À l'origine, les espèces du genre *Lactobacillus* ont été regroupés en fonction de leur température de croissance et leurs capacité à fermenter les hexoses, et par la suite en fonction de leur potentiel homo ou hétérofermentaire.

Orla-Jensen (1919) a subdivisé ce groupe d'une manière similaire à celle des coques lactiques. Ainsi, les sous-genres de *Lactobacillus* ont été créés: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium*. Remarquablement, cette division est toujours valide à un degré considérable, bien que les désignations aient été abandonnées et quelques modifications dans les définitions des sous-groupes ont été faites (Zhang et Cai, 2014 ; Salminen et al., 2004).

la définition acceptée est celle donnée par Hammes et Vogel en 1995 et qui divise le genre en 3 sous-genres sur la base du type des sucres fermentés et le processus de fermentation utilisé (Zhang et Cai, 2014 ; Salminen et al., 2004).

- **Groupe I** : formé des lactobacilles homofermentaires stricts qui regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Thermobacterium* ne produisant presque exclusivement que de l'acide lactique à partir de la fermentation des hexoses par glycolyse. Ils ne peuvent fermenter ni les pentoses ni les gluconates.

- **Groupe II** : formé de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs qui regroupent les espèces de l'ancien sous genre *Streptobacterium* et qui fermentent les hexoses en acide lactique par glycolyse, et peuvent fermenter les pentoses en acide lactique et en acide acétique grâce à une phosphocetolase inductible.

Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la Fermentation du gluconate.

- **Groupe III** : formé de lactobacilles heterofermentaires stricts qui regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Bêtabacterium*, qui fermentent les hexoses en acide lactique, acide acétique (ou éthanol) et CO₂ (voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase), et qui fermentent les pentoses en acide lactique et acide acétique (voie hétérofermentative de la glycéraldéhyde-3- phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase) (Zhang et Cai, 2014 ; Salminen et al., 2004 ; Bakhouché, 2006).

Tableau 4: Classification des lactobacilles selon les paramètres métaboliques et du type fermentaire (Haydersah, 2010).

	I Homofermentative	II Heterofermentative	
Glucose fermented to lactic acid	≥ 85%	50%	
Formation of CO ₂ , acetic acid and ethanol	—	+	
CO ₂ formed from glucose	—	+	
Thiamine required for growth	—	+	
Fructose di-phosphate aldolase present	+	—	
Orla-Jensen, 1919	"<i>Thermobacterium</i>" Obligate homofermentative	"<i>Streptobacterium</i>" Facultative Obligate heterofermentative	"<i>Betabacterium</i>" heterofermentative
Rogosa, 1970	IA	IB	II
Growth at 45°C	+	d	
Growth at 15°C	—	d	
Ribose fermented	—	+	+
CO ₂ from gluconate	—	+	+
Rogosa, 1974		II	III
Acidophilic		—	+
Ethanol tolerant		—	+
Most carbohydrates fermented		+	—
Sharpe, 1979		IIA	IIB
Aerobic species	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. jensenii</i> <i>L. salivarius</i>	<i>L. casei</i> <i>L. coryniformis</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. homohiochii</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. yamanshiensis</i>	<i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. confusus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. viridescens</i>
			<i>L. fructivorans</i> <i>L. hilgardii</i>
Anaerobic species	<i>L. ruminis</i> <i>L. vitulinus</i>		
Kandler and Weiss, 1986	Group I	Group II	Group III
Hexose almost exclusively to lactic acid	+	+	—
Hexose fermented to lactic-, acetic acid, ethanol, CO ₂	—	—	+
Lactic-, acetic-, formic acid, ethanol under glucose limitation	—	d	+
Pentose phosphoketolase	—	+	+
Gluconate fermented	—	+	+

Cette classification est la seule reconnue, bien qu'elle soit imparfaite car le séquençage de l'ARNr 16S a montré que des bactéries lactiques classées selon des caractères phénotypiques sont en réalité de parente phylogénique très éloignée. De plus, le contenu en GC% qui varie énormément d'une espèce à une autre (32 à 53%) et l'absence d'homologie ADN-ADN significative entre beaucoup d'espèces, sont aussi le reflet d'une parente phylogénique éloignée (**Haydersah, 2010**).

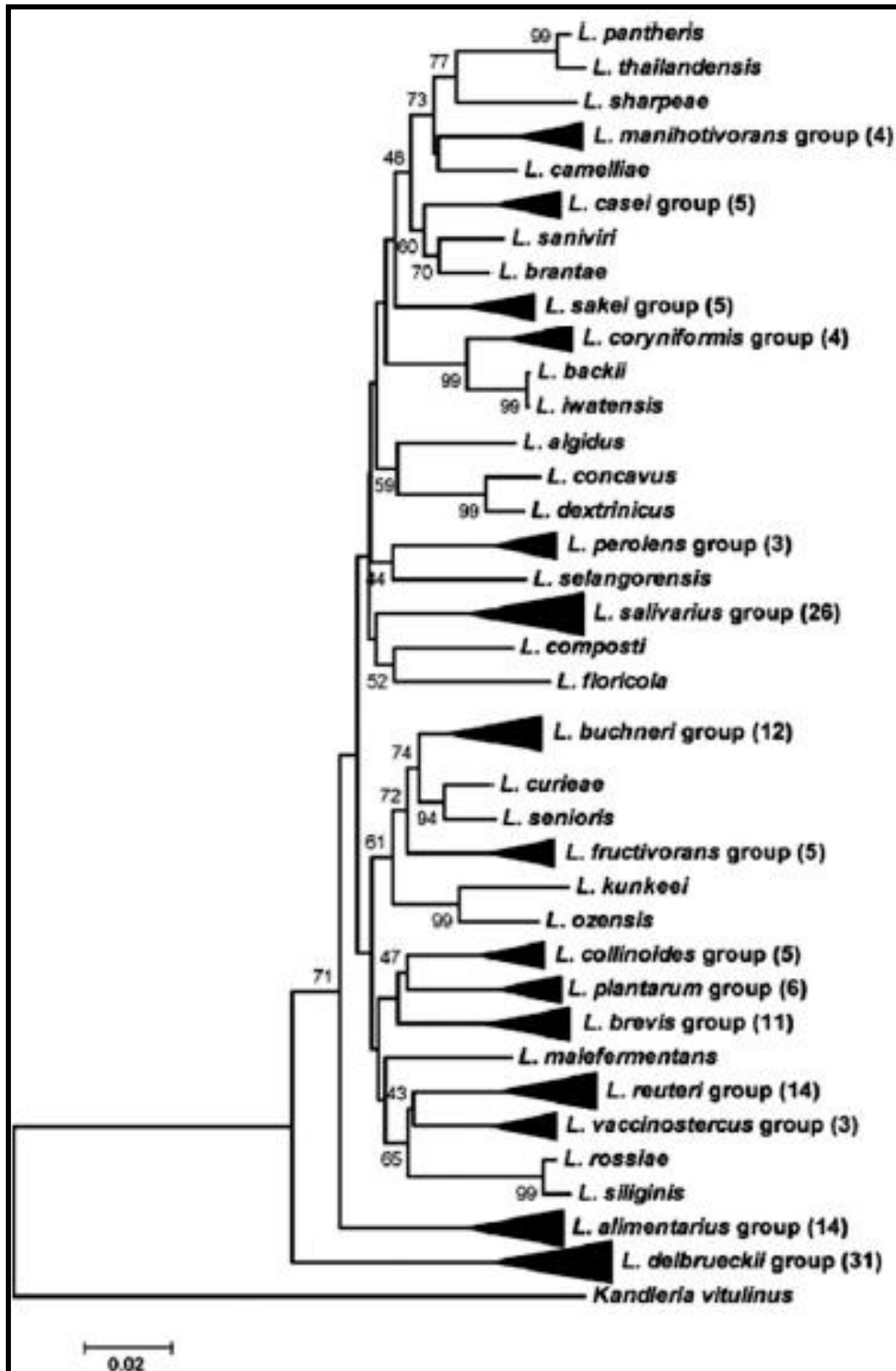


Figure 8 : Arbre phylogénétique représentant les relations entre les espèces de *Lactobacillus* basée sur les séquences des gènes ARNr 16S(Zhang et Cai, 2014).

3-2-2-Caractères culturels:

La plupart des lactobacilles se multiplie dans une gamme de température comprise entre 15°C et 42°C. Certaines souches de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55°C (**Adams et Moss, 2000 ; Tailliez, 2004**). Les lactobacilles se développent au mieux dans des conditions acides, quand le pH avoisine les 4,5 à 6,4, mais leur croissance s'arrête lorsque le pH avoisine 3,5 (**De Vos et al., 2009**). Le milieu le plus adapté à leur culture est celui De Man, Rogosa et Sharpe (MRS). Sur MRS gélosé, les colonies se développent en 24 à 48 heures. Elles sont généralement petites, incolores, blanchâtres ou jaunâtres, lisses ou rugueuses, arrondies ou lenticulaires (**De Vos et al., 2009**).

3-2-3-Identification :

L'identification d'espèces de lactobacilles peut être difficile à réaliser par les méthodes biochimiques en raison du très grand nombre d'espèces existantes. Elle repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres. La galerie API 50 CH avec l'utilisation du milieu pour lactobacilles, est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (**Roissart et Luquet, 1994 ; Ozgan et Vural, 2011**). L'utilisation des outils de taxonomie moléculaire comme l'hybridation quantitative ADN/ADN et le séquençage des gènes d'ADNr 16S ont permis de lever des ambiguïtés et de nommer précisément les espèces de lactobacilles d'intérêt en santé et en alimentation humaine parmi plus d'une centaine d'espèces de lactobacilles actuellement décrites (**Dellaglio et Felis, 2005**).

3-2-3-1-Identification par l'ADNr 16S :

L'ADNr 16S possède l'ensemble des propriétés requises pour servir d'outil couvrant tous les niveaux taxonomiques, du règne à l'espèce. De par l'existence de zones ayant des contraintes différentes, l'ARN 16S ressemble à une horloge à plusieurs aiguilles, celles correspondant aux zones les plus conservées se déplaçant lentement et permettent de suivre l'évolution sur de longues périodes et celles correspondant aux zones plus variables permettent de différencier des groupes d'organismes plus voisins (**Woese, 1985**). De plus, des études minutieuses de régions conservées ont montré qu'il existait des séquences 9 caractéristiques de grands groupes de bactéries. Ces séquences sont appelées « séquences signatures » et permettent d'établir des relations entre des organismes phylogéniquement

distants (**Woese et al., 1985**). Des catalogues d'oligo nucléotides ont été obtenus pour de nombreuses souches bactériennes. Il existe une base de données sur Internet qui contient des séquences des ARNr. On peut, à ce propos consulter le projet RDP (Ribosomal Database Project) qui propose une collection d'au moins 100 000 séquences, en plus des informations phylogénétiques, de références bibliographiques et des séquences nouvellement établies (**Madigan et Martinko, 2007**).

La nécessité d'étendre ces études préliminaires à l'ARNr 23S et d'obtenir plus d'information sur l'ARNr 16S ont conduit à développer des méthodes de séquençage rapide de l'ARN. Deux d'entre elles prédominent actuellement. La technique de la transcriptase reverse (reverse transcriptase) mis au point par (**Lane et al., 1985**) et la méthode PCR (Polymerase Chain Reaction) de (**Saiki et al., 1988**).

3-2-3-2-Séquençage par la méthode PCR :

La PCR permet d'obtenir en très grande quantité une région d'ADN dans laquelle ont été définies des séquences bordantes. Ces séquences vont servir d'amorces à une polymérase qui va synthétiser le brin correspondant à l'ADN présent entre les amorces.

L'utilisation des amorces définies par **Lane et al. (1985)** a permis d'obtenir, à partir de très faible quantités d'ADN de la souche à étudier, des fragments d'ADN séquençables par la méthode de (**Sanger et al., 1977**). La PCR est de plus en plus utilisée en taxonomie bactérienne, du fait de l'existence de souches difficiles à cultiver ou des espèces très proches dont l'identification par les méthodes phénotypiques est délicate.

4-Les probiotiques :

De nos jours, les probiotiques font l'objet de recherches intensives et on trouve de plus en plus, dans le commerce, des préparations renfermant divers micro-organismes bénéfique. On ajoute parfois à ces produits des fibres destinées à favoriser la production de micro-organismes (des fructo-oligosaccharides, par exemple, comme l'inuline, extraite de la racine de chicorée). On donne à de telles fibres le nom de prébiotique parce qu'elles favorisent la multiplication des colonies de probiotique.

4-1-Définition :

Le terme probiotique provient de deux mots grecs, pro et bios, qui signifient littéralement, « en faveur de la vie ». La première définition spécifiait qu'un probiotique était simplement un organisme ou une substance qui influence la balance de la microflore intestinale (**Parker, 1974**). C'est avec la définition de **Fuller (1989)** que se précise le concept de probiotique. Ce dernier a défini les probiotiques comme : «un supplément alimentaire composé de microorganismes vivants ayant des effets bénéfiques sur l'hôte par l'amélioration de la balance de sa flore intestinale ...». Cette définition supprime le terme « substance » de la définition proposée par Parker et soulève l'importance de la viabilité des microorganismes qui composent la préparation dite probiotique. Les bases amenées par Parker et Fuller ont conduit à une nouvelle définition: « Un supplément alimentaire composé de microorganismes vivants ayant un effet bénéfique sur la santé et l'hôte » (**Salminen et al., 1998**). Cette définition conserve la nécessité de la viabilité des microorganismes, comme proposé par Fuller, mais modifie la cible des effets du probiotique. Au départ, la définition de probiotique mentionnait son activité sur l'équilibre de la flore intestinale. Cependant, **Salminen et al., 1998** porte l'effet des probiotiques à l'amélioration de la santé générale de l'hôte, ajustant ainsi la définition aux découvertes des effets des probiotiques sur d'autres cibles que la flore intestinale comme son impact sur le système immunitaire ou sur la prévention du cancer du côlon. Finalement, les probiotiques sont aujourd'hui définis comme : « Microorganismes vivants qui, lorsque sont administrés en quantités adéquates, procurent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte... » (**FAO/WHO, 2003**), (**Food and Agriculture Organization**).

La dose généralement recommandée pour obtenir des effets bénéfiques se situe aux environs de 10^9 à 10^{10} bactéries par jour afin d'obtenir environ 10^8 cellules bactériennes vivantes au duodénum (**Sanders et Huis in't Veld, 1999**). L'apport doit également être régulier puisque ces dernières ne colonisent pas l'intestin de façon permanente (**Ouwehand et al., 2002**). Ceci peut être dû au fait que la composition du microbiote résident est spécifique à chaque individu et que les bactéries exogènes ne s'établissent pas facilement (**Heyman et Ménard, 2002**).

D'autres produits alimentaires incorporant des probiotiques sont également sur le marché tels que les préparations infantiles, des boissons lactées, des jus de fruits, des fromages et d'autres actuellement en cours de développement comme la gomme à mâcher.

Ces produits contiennent une ou plusieurs souches probiotiques de genres et d'espèces différents (**Fooks et Gibson, 2002**).

Les probiotiques peuvent aussi être considérés comme un moyen de véhiculer des principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, peptides immunomodulateurs, substances antibactériennes...) jusqu'à leur cibles d'action dans le tractus digestif (**Marteau, 2001**).

Les principales espèces des bactéries lactiques à potentiel probiotique Les espèces les plus fréquentes et les plus rapportées dans la littérature sont du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, mais il faut aussi mentionner des souches du genre *Enterococcus* et *Streptococcus* (**Gbassi et al., 2011 ; Rokka et Rantamaki, 2010**).

Les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique (**Shah, 2007**).

- **Espèces de *Lactobacillus***

Lb. acidophilus, *Lb. amylovorus*, *Lb. crispatus*, *Lb. gasseri*, *Lb. johnsonii*, *Lb. Casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*.

- **Espèces de *Bifidobacterium***

Bf. lactis, *Bf. longum*, *Bf. adolescentis*, *Bf. animalis*, *Bf. Bifidum*, *Bf. infantis*, *Bf. Breve*.

- **Autres bactéries lactiques**

Lc. lactis, *Ln. Mesenteroides*, *P. acidilactici*, *St. Diacetylactis*, *St. Intermedius*, *St. Thermophilus*, *En. faecalis*, *En. Faecium*.

4-2-Applications des probiotiques :

Grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques utilisées par les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, les probiotiques sont parfois utilisés comme compléments dans des produits comme les yaourts ou bien dans des préparations pharmaceutiques sous forme de gélules. De nombreuses souches bactériennes ont montré leurs bénéfices sur la santé humaine et sont déjà commercialisées par des firmes telles que Danone avec *Bifidobacterium lactis*. Parmi leurs applications on a :

4-2-1-Inhibition des bactéries indésirables :

La répression du développement de germes indésirables ou pathogènes peut se faire de plusieurs façons :

La production d'acides organiques (acide lactique ou acide acétique) à partir de glucides ingérées lors de la prise alimentaire, limite, en abaissant le pH, le développement des *Escherichia coli* et des *Salmonella*. La diminution de la concentration des bactéries coliformes dans le tube digestif serait due au pH très bas, obtenu grâce à l'apport de lait acidifié par l'acide lactique. Certaines souches probiotiques, en particulier les *Lactobacillus*, ne possèdent pas de complexes cytochromes pour réaliser les phosphorylations oxydatives mais utilisent les flavoprotéines pour l'oxydation terminale et forment du peroxyde d'hydrogène qui est un composé inhibiteur pour ces bactéries. Il existe probablement des concentrations suffisantes en oxygène dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal des animaux pour que des quantités significatives de peroxyde d'hydrogène soient produites. Ceci pourrait être une des explications de l'effet antagoniste des *Lactobacillus* contre des souches de *Salmonella* dans le jabot des volailles. Le peroxyde d'hydrogène produit par *Lactobacillus* inhibe des bactéries comme : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium butyricum*, *Pseudomonas ssp*, *Salmonella*, des virus comme : le virus de la fièvre aphteuse, le virus de la poliomyélite, certains champignons comme le *Candida albicans*.(Adams & Hallk, 1988).

Mais bien que ce système antagoniste possède un large spectre d'action, in-vitro, il existe peu de preuves sur son efficacité. Les souches probiotiques pourraient également réprimer la croissance des bactéries pathogènes par production de substances antimicrobiennes de type bactériocine capables d'inhiber les germes fréquemment responsables d'infections ou élevage (Bael ,1977). Certaines souches utilisées comme probiotique possèdent la capacité de déconjuguer les sels biliaires : les formes déconjuguées ont un pouvoir inhibiteur plus important sur le développement des bactéries que les formes conjuguées. La 7 α -déshydroxylase bactérienne est l'enzyme clé de la transformation des acides biliaires primaires en secondaires. Le pH module son activité et un milieu acide l'inactive.

Certaines souches probiotiques pourraient aussi agir en inhibant l'implantation des germes pathogènes par compétition pour la colonisation, l'adhésion des bactéries

probiotiques aux cellules intestinales permettraient une colonisation rapide est dirigée du tube digestif, par exemple chez le porc l'adhésion des souches probiotiques de *Lactobacillus* aux villosités de l'intestin grêle inhiberait la fixation d'*E.coli* entéropathogène. Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence au tube digestif. Deux études récentes ont montré que des souches adhérentes de *L.plantarum* et *L.rhamnosus* pouvaient coloniser de manière prolongée une partie du tube digestif.

L'implantation des germes indésirables pourrait également être empêchée par une inhibition compétitive des souches probiotiques par consommation des nutriments à la place des souches pathogènes (Daeschl,1989).

4-2-2-L'amélioration de la digestion du lactose :

L'un des effets des BL qui a été le plus mis en avant et démontré chez l'homme est celui qui concerne l'amélioration de l'intolérance au lactose. Ce disaccharide, présent exclusivement dans le lait et ses dérivés, est formé de glucose et de galactose reliés entre eux par une liaison β . Sa digestion nécessite une lactase, ou β -galactosidase, qui hydrolyse cette liaison et permet alors l'absorption des sucres simples libérés. Chez les personnes souffrant d'intolérance au lactose, un déclin de la production de cette enzyme est observé au-delà de la petite enfance. La deuxième cause d'intolérance (intolérance secondaire) est représentée par les maladies dont la conséquence est une réduction de la surface de digestion-absorption intestinale ou une accélération du transit jéjunal, comme les résections intestinales, les gastro-entérites, la maladie céliaque ou les gastrectomies.

Plusieurs études ont montré que la β -galactosidase des BL participait à la digestion du lactose dans l'intestin. En principe, le remplacement du lait par du yaourt conduit à une meilleure absorption et une meilleure tolérance chez les sujets présentant une intolérance au lactose (primaire et secondaire). Il a été démontré que les bactéries qui survivaient dans l'intestin gardaient une activité métabolique suffisante pour hydrolyser le lactose et que celles dont la membrane est facilement lysée par les acides biliaires libéraient leur lactase dans l'intestin (Izquierdo Alegre, 2009).

4-2-3-Réduction du taux de cholestérol sanguin :

Il a été observé que, par rapport à des témoins, les animaux élevés en environnement stérile, et donc exempts de microorganismes, excrètent des niveaux de cholestérol dans les selles plus faibles, ce qui a suggéré que la flore intestinale aurait une influence sur les niveaux

de cholestérol sanguin. Des tests *in vitro* ont montré une réduction du taux de cholestérol dans un milieu de culture avec certains *Lactobacillus*. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce fait, comme l'assimilation du cholestérol par les bactéries (Figure 9) ou l'hydrolyse des sels biliaires conjugués (**Izquierdo Alegre, 2009**).

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. 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. En effet, il a été suggéré que les sels biliaires secondaires qui en découlent (acide désoxycholique et lithocholique) endommagent l'ADN, augmentent les risques de cancer du côlon et de calculs biliaires et peuvent causer des altérations de muqueuses digestives provoquant de l'inflammation et de la diarrhée. 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 (**Izquierdo Alegre, 2009**).

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 par les BL. 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.

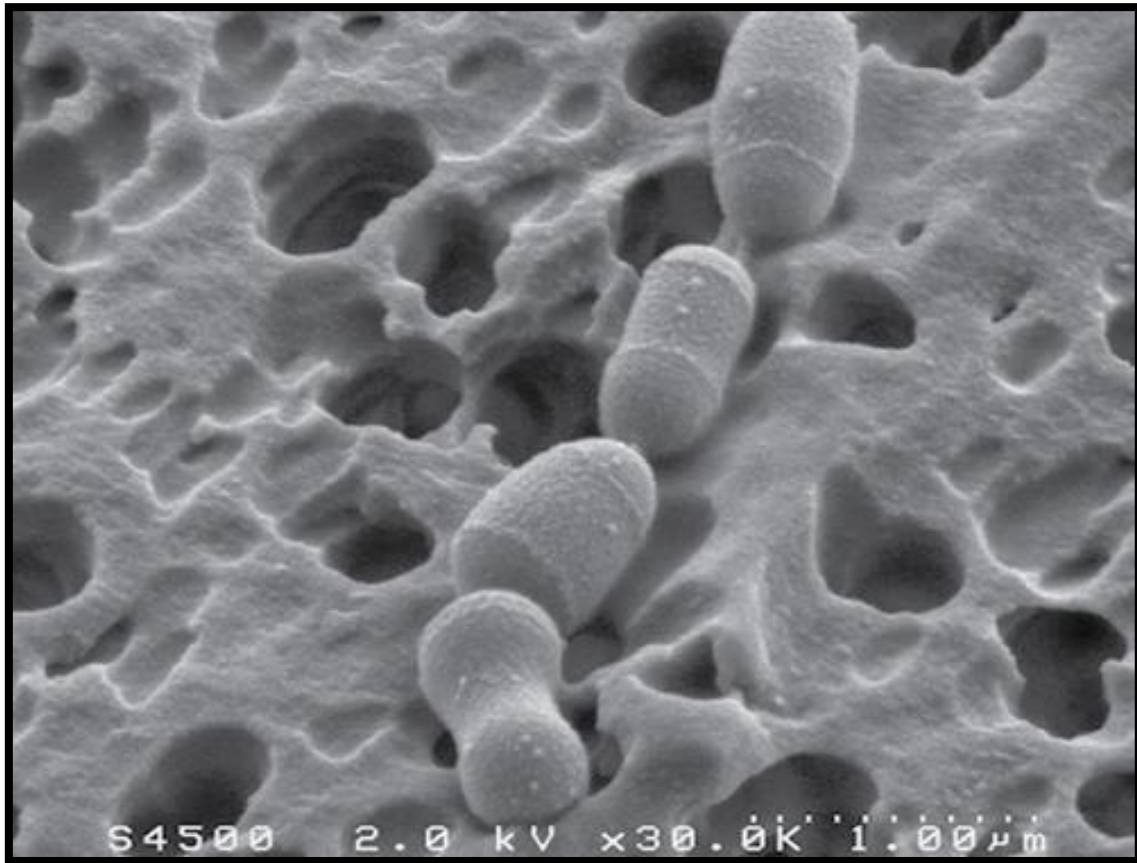


Figure9 : Bactérie intestinale dégradant le cholestérol vue par microscope électronique (Gérard, 2011)

4-2-4-Diminution des allergies alimentaires :

L'incidence au cours des dernières décennies des maladies allergiques est en constante augmentation dans les pays industrialisés, pouvant toucher plus de 20 % de la population (Grangette, 2011 ; Waligora et al., 2011).

Cette théorie est à l'origine de l'utilisation des probiotiques, modulateurs du microbiote, dans la prévention et le traitement de l'allergie, stratégie qui suscite beaucoup d'intérêt (Waligora et al., 2011).

L'augmentation dans les pays industrialisés d'incidence d'un certain nombre de désordres immunitaires a coïncidé avec l'amélioration des conditions de vie. Cette augmentation est actuellement reliée, entre autres facteurs, à un défaut de maturation du système immunitaire par les bactéries commensales (le manque d'exposition aux agents microbiens en bas âge), à une hygiène accrue, à la vaccination et à l'utilisation fréquente d'antibiotiques, responsables d'une modification d'établissement du microbiote intestinal au

cours des premiers mois de vie ; ce qui serait responsable de l'augmentation de fréquence des allergies, suite à un défaut de réponse précoce (**Grangette, 2011 ; Waligora et al., 2011**).

La réaction allergique inflammatoire intervient dans un certain nombre de pathologies telles que la rhinite allergique, la dermatite atopique, les allergies alimentaires et l'asthme. Ces réactions allergiques sont dues à des réponses immunes exagérées, initiées par le contact avec des molécules allergènes. Elles sont caractérisées par une production accrue d'immunoglobulines IgE spécifiques de ces allergènes, associée au développement d'une réaction inflammatoire.

L'allergie alimentaire du nourrisson se traduit souvent par de l'eczéma atopique. Les traitements curatif et préventif de cette pathologie par des BL ont été évalués lors d'une étude clinique sur 27 enfants nourris au sein et souffrant d'eczéma atopique par Isolauri et al(2000). Il a été notamment observé qu'après deux mois de traitement avec une formule supplémentée en *Lb.rhamnosus* GG et *B.lactis* Bbl2, il y a eu une amélioration plus rapide de l'état atopique en comparaison avec le groupe placebo. Un effet préventif de *Lb. rhamnosus* GG a aussi été observé chez des enfants à risque nés de parents atopiques (**Izquierdo Alegre, 2009**).

Les mécanismes ainsi que les processus régulateurs de l'allergie sont loin d'être tous connus. Plusieurs mécanismes touchant à l'immunité ou à l'état de la muqueuse ont été suggérés pour expliquer l'effet protecteur des BL. Celles-ci pourraient, en diminuant la perméabilité intestinale très augmentée en période de réactivité allergique, participer aux mécanismes du passage des protéines alimentaires. Elles pourraient également influencer directement les mécanismes régulateurs de la tolérance orale. Les premières données cliniques sont prometteuses, cependant, d'autres études sont nécessaires pour apporter des preuves supplémentaires quant aux effets protecteurs des BL dans les processus allergiques et quant aux mécanismes impliqués (**Izquierdo Alegre, 2009**).

4-2-5-Réduction du risque de diarrhée :

Plusieurs types de diarrhées sont dus à des infections microbiennes. Des effets protecteurs de souches probiotiques contre certaines infections intestinales ont été observés sur des animaux. Les mécanismes potentiellement impliqués incluent la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène, d'autres substances antimicrobiennes telles que les bactériocines, la compétition pour des nutriments ou des récepteurs d'adhésion, des actions anti-toxines et la stimulation du système immunitaire. Plusieurs études randomisées

contrôlées sur l'homme ont montré l'efficacité des souches probiotiques pour prévenir ou atténuer les perturbations digestives liées à la prise d'antibiotiques et les diarrhées nosocomiales infantiles dues surtout à des rotavirus. Cependant, ces effets ne sont pas universels et les probiotiques ne semblent pas efficaces en toutes circonstances (**Izquierdo Alegre, 2009**).

Les souches probiotiques *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*, qu'on retrouve entre autre dans le lait fermenté, ont fait l'objet d'études montrant leur efficacité contre la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques en milieu hospitalier (**Penner et al., 2005**).

L'une des affections les plus fréquentes, la diarrhée du voyageur, est une situation clinique le plus souvent due à un mécanisme infectieux. De nombreux produits pharmaceutiques destinés à prévenir cette pathologie existent sur le marché. Cependant, les études randomisées et contrôlées ayant été menées n'ont pas permis de démontrer un effet indiscutable d'un probiotique sur la diarrhée du voyageur, soit du fait d'une méthodologie statistique critiquable, soit du fait d'un trop grand nombre de sujets ayant abandonné l'étude (**Izquierdo Alegre, 2009**).

4-2-6-Les traitements gastriques:

L'infection à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) touche plus de 50% de la population mondiale et 80% de la population dans les pays en développement. Elle est la principale cause de l'ulcère gastroduodénal (70-90% des cas), le lymphome et dans 1% des cas, ça conduit au développement de cancer de l'estomac (**Malago et al., 2011**).

En médecine classique le traitement, une trithérapie de sept jours associant un inhibiteur de la pompe à protons à deux antibiotiques, permet de s'en débarrasser dans 70 % des cas. Pour les malades résistants, un second traitement, quadrithérapie, plus puissant et plus long, fait disparaître la bactérie dans 63 % des cas, soit au total, un taux d'éradication de 90 %. L'inflammation persiste pendant 6 à 24 mois et la muqueuse redevient normale. Si celle-ci était déjà atteinte, les lésions persistent, mais leur extension et leur aggravation sont définitivement stoppées.

Plusieurs souches de lactobacilles et bifidobactéries semblent réduire les effets secondaires des traitements antibiotiques et améliorer la complaisance des patients. Une méta-analyse récente de 14 essais randomisés suggère que l'adjonction de certains probiotiques aux traitements antibiotiques anti-*H. pylori* peut augmenter les taux d'éradication et pourrait se révéler utile chez les patients chez lesquels l'éradication de *H. pylori* a échoué. Actuellement l'évidence est insuffisante pour supporter le concept qu'un probiotique seul, sans antibiothérapie associée est efficace (**WGO, 2011**).

Plusieurs études ont montré que les patients traités avec des probiotiques associés à l'antibiothérapie ont eu un taux d'éradication supérieur avec moins d'effets secondaires.

Une étude pilote effectuée par **Saggiaro et al. en 2005** sur 30 adultes infectés par *H.pylori* traités avec l'oméprazole+ Placebo ou oméprazole + *Lb. reuteri* pendant 30 jours, a montré que 60% des patients ont été éradiquée, tandis qu'aucun dans le groupe placebo. Lionetti et ses collègues en 2006 ont montré une réduction des symptômes gastro-intestinaux par *Lb. Reuteri* supplémentation pendant et après la thérapie d'éradication dans un groupe d'enfants infectés. Enfin, Francavilla et ses collègues en 2008 dans une étude pilote récente menée sur 40 adultes *H. pylori* positifs, subissant le traitement d'éradication standard, ont montré que la pré-administration de *Lb. reuteri* dans les quatre semaines avant le traitement réduit significativement la charge bactérienne, et diminue les symptômes gastro-intestinaux associés.

D'excellents résultats sont également signalés par l'administration de lait fermenté enrichi avec des probiotiques (**Tong et al., 2007; Sachdeva et Nagpal, 2009**).

4-2-7-La prévention du cancer du côlon et autres cancers :

La flore intestinale et le système immunitaire jouent un rôle dans la cancérogenèse colique, ces deux paramètres pouvant être eux-mêmes modulés par des probiotiques. Plusieurs études ont montré que certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité d'enzymes, la concentration de mutagènes ou d'acides biliaires secondaires dans les selles, qui pourraient être impliqués dans la cancérogenèse colique. Les probiotiques pourraient empêcher la croissance d'autres souches qui transforment les pro cancérogènes en cancérogènes, réduisant ainsi la quantité de cancérogènes dans l'intestin (**Moroni, 2007 ; Izquierdo Alegre, 2009**).

Des études épidémiologiques ont montré une relation inverse entre la consommation de produits laitiers fermentés contenant des lactobacilles ou des bifidobactéries et l'incidence des cancers du côlon et du poumon. Des études sur l'animal ont montré que la supplémentation de l'alimentation avec des souches spécifiques pouvait prévenir l'établissement, la croissance et la métastase des tumeurs induites chimiquement. Deux études randomisées et contrôlées au Japon ont montré que l'administration orale de *Lb. casei* souche *biolactis* diminuait de manière significative le risque de récurrence de tumeurs superficielles de la vessie chez l'homme.

D'un autre côté, bien qu'il n'y ait pas de preuves expérimentales directes de la suppression des cancers par la consommation de cultures probiotiques : il existe de nombreuses preuves indirectes basées sur des études de laboratoire, ce qui ouvre des perspectives pour l'application des probiotiques dans la prévention de certains types de cancer et encouragent la recherche dans ce domaine (**Izquierdo Alegre, 2009**).

Le Tableau 5 récapitule les effets sur la santé le plus couramment attribués aux bactéries probiotiques.

Tableau5 : effets positifs des probiotiques sur la santé humaine (Izquierdo Alegre, 2009).

Amélioration de la digestion du lactose	- Action de la β -galactosidase bactérienne dans l'intestin grêle
Diminution des allergies alimentaires	- Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale - Stimulation du système immunitaire
Réduction du risque des diarrhées	- Résistance à la colonisation par des pathogènes - Stimulation du système immunitaire
Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin	- Modulation de la flore intestinale - Stimulation du système immunitaire
Réduction du cholestérol	- Assimilation du cholestérol - Déconjugaison des sels biliaires
Prévention du cancer du côlon	- Stimulation du système immunitaire - Production de composés antimutagéniques - Modulation des enzymes fécales carcinogéniques - Dégradation de carcinogènes - Elimination des bactéries impliquées dans la production de cancérrogènes

4-2-8-Production de bactériocines :

Les bactériocines sont des substances antimicrobiennes de nature protéique dont l'activité inhibitrice est dirigée contre des espèces taxonomiquement proches du microorganisme producteur (Tagg et al., 1976). La détection des bactériocines remonte à 1925 par AndreGratia qui a observé que la croissance de certaines souches d'*Escherichia coli* a été inhibée en présence d'un composé antibactérien, dont il a donné le nom de colicin V. La colicin V a été caractérisée comme composé peptidique thermostable (Gratia,1925).Tagg et al.,(1976) suggéraient qu'un composé antimicrobien ne doit pas être considéré comme une bactériocine que lorsqu'il satisfait aux critères suivants :

- L'activité des bactériocines doit disparaître sous l'action des protéases.
- Un spectre d'inhibition étroit dirigé contre les espèces apparentées à la souche productrice.
- La présence d'une fraction protéique biologiquement active.
- Un mode d'action bactéricide.

- Un site d'attachement (récepteurs) spécifique sur les cellules sensibles.
- La bactérie productrice synthétise une molécule qui la protège contre sa propre bactériocine.
- Certains gènes de bactériocines sont portés par des plasmides.

Les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif doivent être au moins des protéines biologiquement actives ayant une action bactéricide contre les micro-organismes qui leurs sont sensibles. Les bactériocines sont produites par une vaste gamme d'espèces bactériennes et forment un groupe hétérogène de souches productrices, à leurs spectres d'action antimicrobiens, leurs modes d'action et leurs propriétés physico-chimiques (**Kim et al., 2003; Stevens et al., 1991**).

4-2-9-Application des probiotiques à la santé buccodentaire :

En raison de l'incidence très répandue de la résistance bactérienne aux antibiotiques, le concept de la thérapie aux probiotiques a été considéré pour application en médecine buccale. Parmi les problèmes buccodentaires cibles, notons la carie dentaire, les maladies parodontales et l'halitose. Une condition essentielle pour qu'un microorganisme représente un probiotique d'intérêt pour la santé buccodentaire est sa capacité d'adhérer et de coloniser les diverses surfaces de la cavité buccale (**Meurmanet al., 2007 ; Comelli et al., 2002**).

Les lactobacilles constituent environ 1% de la microflore buccale cultivable chez l'humain. Les espèces les plus souvent retrouvées dans la salive sont *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus salivarius*¹¹. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* et *L. rhamnosus* se trouvent dans les produits laitiers (**Meurmanet al., 2007. Näsé et al., 2001**).

4-2-10-Probiotiques et carie dentaire :

La carie dentaire est une maladie multifactorielle d'origine bactérienne caractérisée par une déminéralisation acide de l'email de la dent (**Selwitz et al., 2007**) Elle apparaît à la suite de changement dans l'homéostasie de l'écosystème buccal menant à une prolifération du biofilm bactérien composé notamment de streptocoques du groupe mutans. Une étude récente a rapporté que parmi 23 souches bactériennes utilisées dans l'industrie laitière, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* avaient seuls la capacité de

s'intégrer à un biofilm présent sur une surface d'hydroxylapatite et d'interférer avec le développement de l'espèce cariogène *Streptococcus sobrinus*. Récemment, il a été démontré que des isolats de *W. cibaria* avaient la capacité d'inhiber, tant *in vitro* qu'*in vivo*, la formation du biofilm par *S. mutans* et d'empêcher sa prolifération. (Kang et al.,2006).

4-2-11-Probiotiques et halitose :

L'halitose a plusieurs causes (y compris l'alimentation, les désordres métaboliques, les infections de l'appareil respiratoire), mais dans la majorité des cas, elle est associée à un déséquilibre de la microflore commensale de la cavité buccale (Scully et al.,2008).

L'halitose résulte de l'action des bactéries anaérobies qui dégradent les protéines salivaires et alimentaires pour générer des acides aminés qui sont transformés en composés sulfures volatils incluant le sulfure d'hydrogène et le méthyle mercaptan.

Une étude récente (Kazor et al.,2003) a montré que certaines espèces bactériennes incluant, *Atopobium parvulum*, *Eubacterium sulci* et *Solobacterium moorei* prédominent sur la surface dorsale de la langue chez des patients souffrant d'halitose. En revanche, *Streptococcus salivarius* a été plus fréquemment détecté chez les personnes sans problème d'halitose et est de ce fait considéré comme un probiotique commensal de la cavité buccale. Il a été démontré que *S. salivarius* produit 2 bactériocines, lesquelles pourraient contribuer à réduire le nombre de bactéries productrices de composés sulfures volatils. L'utilisation de gommes ou de pastilles contenant *S. salivarius* K12 (BLIS Technologies Ltd., Dunedin, Nouvelle-Zélande) a permis de réduire les taux de composés sulfures volatils chez des patients ayant reçu un diagnostic d'halitose (Burton et al.,2005, 2006).

4-2-12-Protection contre les infections uro-génitales :

Les infections uro-génitales touchent plus de 300 millions de femmes annuellement à travers le monde (Reid, 2001). Par infection urogénitale, on entend toute infection de la vessie, des reins, du vagin et de l'urètre. Elles sont principalement dues à une invasion microbienne ou à un déséquilibre de la flore indigène (Reid, 2001). Les probiotiques sont de plus en plus envisagés pour prévenir et traiter ce type d'infection et montrent déjà un avenir prometteur dans cette application (De Vrese & Schrezenmeir, 2002). En effet, les *Lactobacillus* représentent le genre dominant de la flore uro-génitale normale et l'utilisation de souches comme *L. rhamnosus* GR-1 et *L. fermentum* RC-14 pour prévenir ou traiter les

infections uro-génitales a permis de confirmer cette utilisation possible des probiotiques (**Reid et al., 2001; Servin, 2004**).

4-3-La sélection des probiotiques :

Une grande variété de produits probiotiques a été développée et mise sur le marché ces dernières années ; cependant, les effets attribués à bon nombre de ces produits ne sont pas soutenus par une justification scientifique adéquate. Les produits de qualité médiocre doivent être dénoncés car ils discréditent les autres aux yeux des non spécialistes. Par conséquent, il est nécessaire d'établir des critères rationnels pour le criblage et la sélection des microorganismes candidats, sans oublier d'évaluer l'efficacité des souches sélectionnées sur l'homme avec des essais cliniques contrôlés. L'élucidation des mécanismes à la base des effets santé et nutritionnels attribués aux probiotiques peut aider à associer de façon plus rationnelle ces effets aux bactéries probiotiques, et à choisir les souches ou les mélanges de souches les plus prometteurs à cet égard (**Izquierdo Alegre, 2009**).

Dans un premier temps, les tests *in vitro* sont critiques pour s'assurer de l'innocuité des microorganismes utilisés comme probiotiques. Dans ce sens, le comité recommande, même pour les groupes de bactéries ayant une longue histoire en terme de sécurité d'utilisation (GRAS), une certaine caractérisation des souches pour éliminer la possibilité de résistance aux antibiotiques, d'activités métaboliques nocives (production de D-lactate, déshydroxylation des sels biliaires, etc.), de production de toxines d'activité hémolytique, ou d'effets secondaires particuliers(**Izquierdo Alegre, 2009**).

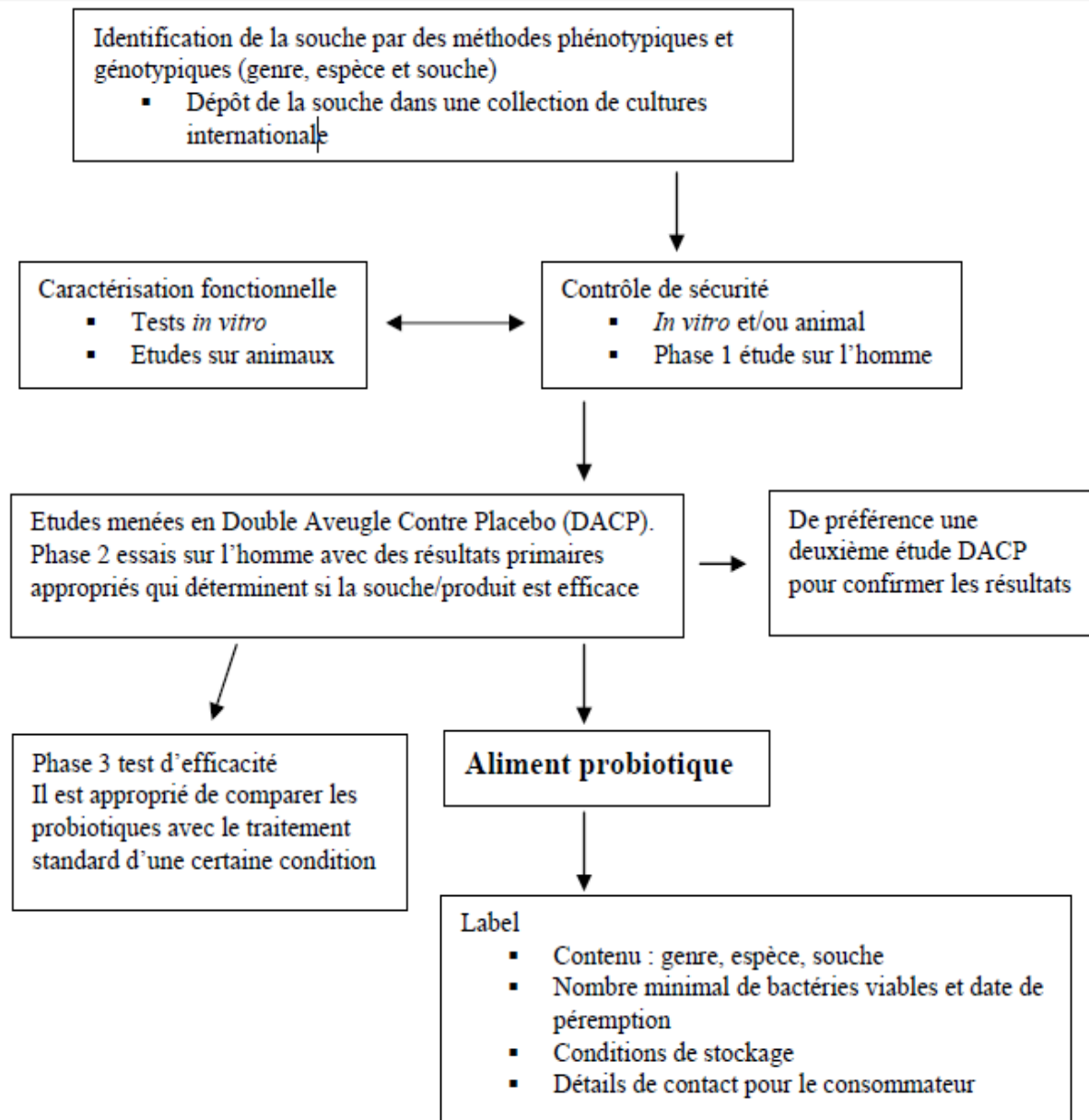


Figure 10: Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques en vue d'une utilisation alimentaire (Izquierdo Alegre, 2009).

En plus d'assurer l'absence totale de toxicité ou de pathogénicité de la souche, et afin de satisfaire la définition des probiotiques, les microorganismes doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs pour l'hôte. Les microorganismes potentiellement probiotiques doivent donc être sélectionnés selon différents critères qui sont décrits dans le Tableau.6. Ces critères de sélection, ainsi que le test *in vitro* utilisés se réfèrent souvent à des propriétés bactériennes, telles que l'adhésion aux cellules épithéliales, la résistance aux conditions gastriques et la production de bactériocines, et plus rarement à des effets probiotiques proprement dits. Ces

derniers sont en effet plus difficiles à mesurer et il n'existe pas de tests *in vitro* établis capables de les déterminer de manière fiable (**Izquierdo Alegre, 2009**).

Tableau 6: Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques (**Izquierdo Alegre, 2009**).

Critères de sécurité	▪ Historique de non pathogénicité (GRAS) ▪ Souche d'origine humaine ou alimentaire ▪ Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques ▪ Souche déposée dans une collection de cultures internationale ▪ Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques ▪ Pas de déshydroxylation des sels biliaires
Critères fonctionnels	▪ Tolérance à l'acidité gastrique ▪ Tolérance à la bile ▪ Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes (bactériocines) ▪ Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus ▪ Stimulation du système immunitaire
Critères technologiques	▪ Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini ▪ Conservation des propriétés probiotiques après production.

5-Les prébiotiques :

Un prébiotique a été défini il y a 5 ans comme un additif ou ingrédient alimentaire non digestible qui dans les flores coliques, stimule sélectivement une ou un nombre limité de bactéries reconnues pour leur effet bénéfique sur la santé de l'hôte. Il est en effet reconnu que la composition de cette flore joue un rôle déterminant pour la santé et la protection contre certaines pathologies. Les prébiotiques les mieux connus à ce jour sont les fructo et les galactooligosaccharides. Les effets confirmés par des études nutritionnelles humaines sont la stimulation sélective de la prolifération des bactéries, la régulation de la production fécale et l'augmentation de l'absorption intestinale du Ca^{++} . D'autres effets étudiés expérimentalement justifient des hypothèses qui sont présentement ou seront dans le futur testées chez l'homme. Ces hypothèses concernent la restauration d'une homéostasie lipidique, de la stimulation immunitaire ou la réduction du développement tumoral (**Gibson et al., 1995; Buttington et al., 1996**).

5-1-Rôle des composés prébiotiques :

Une approche récemment apparue, consiste à favoriser l'activité ou le développement de certaines bactéries bénéfiques naturellement présentes dans l'intestin, en utilisant des prébiotiques dans l'alimentation. En effet les bactéries intestinales fermentent des composés présents dans leur environnement naturel, tels que certains constituent du mucus intestinal et des substances non digérées dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinale. De plus certains de ces composés peuvent être spécifiquement utilisés par les bactéries bénéfiques. Le lait contient des composés de ce type, tels que des oligosaccharides et des aminosucres, qui sont des facteurs spécifiques de croissance des bifidobactéries cultivées *in vitro*. D'autres parts il a été constaté que la flore intestinale des nouveau-nés nourris au lait maternel est constituée presque uniquement de bifidobactéries alors que d'autres espèces apparaissent rapidement chez les nourrissons alimentés au biberon. Ceci peut être mis en relation avec le fait que le lait humain contient des oligosaccharides non hydrolysés par les enzymes de l'intestin grêle supérieur et servant donc de substrat préférentiel à certaines bactéries (**Roberfroid, 1995**).

Certains oligosaccharides de végétaux ne sont pas non plus dans les parties supérieures du tube digestif ; c'est le cas des fructooligosaccharides (FOS) ajoutés à diverses préparations alimentaires, entre autres dans le lait et les aliments lactés. Ces fibres solubles sont obtenues par dégradation d'inulines de racines ou par synthèse enzymatique à partir de saccharose et de fructose ; elles sont constituées de molécules de fructose reliées entre elles et se terminent par une unité de glucose. Les FOS utilisés sont composés principalement de molécules à faible degré de polymérisation, qui sont en général fermentées préférentiellement par les bactéries cibles.

Des études, en fermentateurs, ont montré par exemple que ces composés stimulaient d'avantage la croissance des bifidobactéries par rapport à d'autres espèces de la flore colique, ou leur conféraient une meilleure survie. Des études *in vivo* ont permis également de mettre en évidence une augmentation de la population de bifidobactéries dans les fèces, quelques fois simultanément à la diminution d'autres groupes bactériens, après l'ingestion de FOS. D'autres effets ont pu être observés suite à l'absorption d'oligosaccharides non digestibles : augmentation de la biodisponibilité de certains minéraux (calcium, magnésium), baisse du taux de lipides sanguins (cholestérol), prévention du cancer du côlon (**Park & Kroll, 1993**).

6-Les symbiotiques :

Une troisième approche intéressante pour la modulation de la microflore intestinale est l'utilisation de symbiotique. Un symbiotique consiste en un mélange de probiotique et de prébiotique qui exerce une action bénéfique sur l'hôte en favorisant la survie et l'implantation de compléments alimentaires microbiens dans le tractus gastro-intestinal, en stimulant sélectivement la croissance ou en activant le métabolisme d'une ou d'un nombre limité de bactéries. En effet l'ajout de microorganismes vivants peut être utilisé conjointement à des substrats spécifiques pour leur croissance, par exemple des FOS avec une souche de bifidobactéries dans un lait fermenté. Cette combinaison peut stimuler la survie du microorganisme probiotique, puisque son substrat spécifique est facilement disponible pour sa fermentation, et résulte pour l'hôte en des avantages qu'offrent le microorganisme vivant et le prébiotique (**Gibson & Roberfroid, 1995**).

7-Les rats de laboratoire:

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

7-1-Rat Wistar :

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



Figure 11 : Rat de la souche Wistar

7-2-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.



Figure12 : Présentation du rat Wistar.

7-3-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.

7-4-L'appareil digestif du rat:

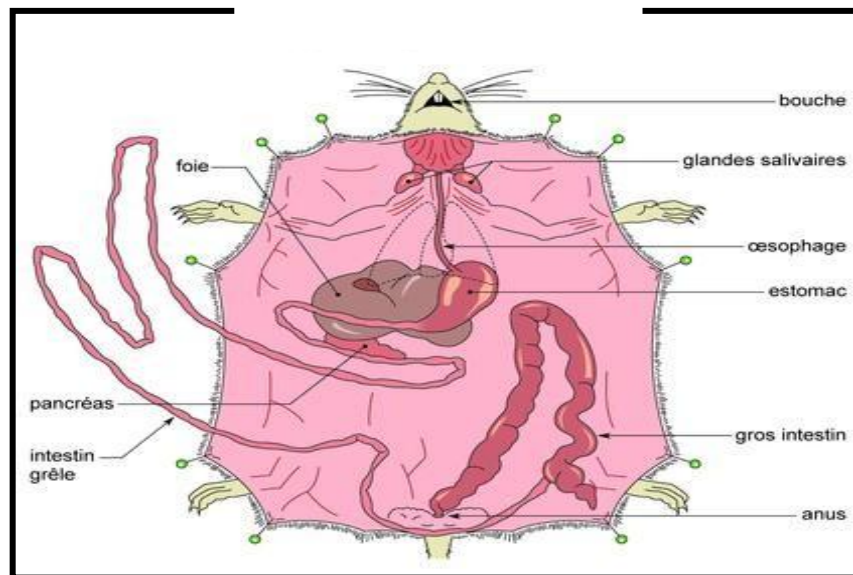


Figure 13 :L'appareil digestif du rat

- L'appareil digestif du rat comprend, de l'avant vers l'arrière (**Figure 13**):
- Une bouche comportant des dents qui permettent de couper et de broyer les aliments ingérés (mastication);
- Un œsophage, ou conduit, situé sous la trachée, qui relie la bouche à l'estomac;
- Un estomac ou poche à paroi musculaire et sécrétrice;
- Un intestin grêle relativement long, à petit diamètre et à paroi musculaire et sécrétrice;
- Un gros intestin, plus court et de plus gros diamètre que l'intestin grêle, menant à l'anus (par lequel sont éliminées les matières fécales ou selles).

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

7-5-La flore du rat:

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

Chapitre 2 : Matériel et Méthode

Chapitre 2 : Matériel et Méthode

II.1. Lieu de l'étude:

L'ensemble de ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie de la Faculté des Sciences et technologies de l'Université de Saïda, dans la période comprise entre le mois de février 2017 jusqu'au mois de juin 2017.

II.2. Matériel:

Lors de la réalisation des différentes parties expérimentales, nous avons utilisé le matériel biologique suivant :

2.1-Les souches de bactéries lactiques:

Notre étude porte sur un ensemble de souches de bactéries lactiques qui sont essentiellement des *Lactobacilles* de différentes origines provenant du laboratoire de biologie des microorganismes et de biotechnologie (**LBMB**) de l'université d'Oran.

Les souches étudiées et leurs sources d'isolement sont présentées dans le tableau ci dessous

Tableau7 : Genres, espèces et sources d'isolement des bactéries lactiques utilisées.

Souches	Genres et espèces	Origine
NSC10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de chamelle de Naama (Amara, 2014)
CTDH27	<i>Lactobacillus brevis</i>	Lait de chamelle, Tindouf (Belkheir, 2004)
BH14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de chamelle d'Illizi (Bounoua, 2005)
NSC5c (46)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de chamelle de Naama (Amara, 2014)
JumIII4 (8)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de jument de Saida (Amara, 2014)

2.2-Les souches indicatrices pathogènes

Tableau 8 : Souches des bactéries pathogènes utilisées et leurs origines.

Souches	Origine
<i>Proteus mirabilis</i>	Laboratoire de biologie des microorganismes et de biotechnologie (Oran,Es-Sénia).
<i>Salmonella thyphimurium</i>	
<i>Klebsiella pneumonia</i>	
<i>Citobacterssp</i>	
<i>Enterobactercloacae</i>	
<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	
<i>Acenitobacterbaumannii</i>	
<i>pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</i>	
<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	
<i>Staphylococcus aureus (II2) ATCC 433005</i>	
<i>Klebsiellapneumaniesupsspneumanie(ES4)</i>	Selles de bébé Saida (Amara,2012)
<i>Enterobacterssp(ES8)</i>	Selles de bébé Saida(Amara, 2012)
<i>Hafniaalveei (LB1)</i>	Lait cru de Saida (Amara, 2012)
<i>Salmonella galinarum (EL8)</i>	Lait cru de Saida (Amara, 2012)
<i>Enterobacteraerogenes (EL4)</i>	Lait cru de Saida (Amara, 2012)

2.3-Les milieux de culture:

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

- Milieu MRS (**de Man et al., 1960**) pour la culture et l'isolement des bactéries lactiques: ce milieu a été aussi modifié en fonction des besoins des différents tests nécessaires à cette étude. Le milieu MRS inclinée, est utilisé en routine pour les cultures et la conservation des souches à court terme.
- Milieu LB (lysogenicbroth) pour la croissance des entérobactéries.
- Milieu Chapman : milieu sélectif des bactéries halophiles dont les staphylocoques.
- Milieu SS (*Salmonella-Shigella*) : pour l'isolement des salmonelles et des shigelles.
- Milieu VRBL : pour la recherche et le dénombrement des coliformes.
- Milieu GN : est un milieu d'isolement non-sélectif pour le dénombrement de la flore mésophile totale.
- 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.

2.4-Expérimentation :

2.4. A. la partie in vitro :

A.1-purification des souches :

- **Revivification des cultures de souches lactiques :**

Les souches étaient conservées dans du MRS-glycérol (cryoprotecteur), à partir duquel elles ont été repiquées une première fois dans du bouillon MRS puis incubées à 30°C pendant 18 heures, après apparition d'un trouble 5 µl de cette suspension a été prélevé à l'aide d'une anse et ensemencé par strie sur une gélose MRS, les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24 h.

Les cultures ont été repiquées 4 fois successivement pour confirmer leur pureté.

A.2-Identification :

L'examen macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies (la forme, la taille, la pigmentation, le contour et la viscosité).

L'observation microscopique nous permet de déterminer la forme, le Gram ainsi que le type d'enchaînement des cellules. L'examen microscopique repose sur la coloration de Gram qui

permet de distinguer deux types de bactéries les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif qui diffèrent dans la composition de la paroi notamment par son épaisseur, par sa teneur en peptidoglycane ou la présence de la membrane externe (**voir annexe**).

A.3-Test de catalase(Marchal et *al.*,1991)

La catalase est une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries en H_2O et $1/2 O_2$

La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif

Technique :

Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame sur laquelle on dépose à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette pasteur bouclée une colonie isolée (ou plusieurs si petites colonies) de la souche à tester, puis observer l'apparition des bulles.

A.3.1. Conservation des souches:

Après avoir isolé et purifié les bactéries lactiques, nous avons entrepris de les préserver afin de garantir une viabilité maximale des cellules pour toute utilisation ultérieure. Les souches sont conservées selon deux différentes méthodes:

✓ Par réfrigération:

La conservation à court terme des souches pures a été réalisée sur gélose inclinée. Après la croissance des souches à leur température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvelées par repiquage toutes les 4 semaines (**Guiraud, 2003**).

✓ Par congélation:

Pour la conservation à long terme les souches bactériennes sont conservées à -20°C sur lait écrémé reconstitué (10 %) additionné de glycérol (40 %), et sur milieu MRS supplémenté de glycérol (40 %) (**Herrero et al., 1996 ; Samelis et al., 1994 ; Djellouli, 2011**).

A.-4-L'antibiogramme :

Tableau 9 : les antibiotiques testés, famille et mode d'action

Antibiotique	Famille	Mode d'action
Ampicilline	Bêta-lactamines	Agit comme un inhibiteur irréversible de la transpeptidase, une enzyme indispensable aux bactéries pour la synthèse de leurs parois cellulaires. Elle inhibe la troisième et dernière étape de la synthèse de la paroi bactérienne et conduit à la lyse cellulaire.
Amoxiciline		
Ceffaxone		
Cefotaxine		
Peniciline		
Ticarcilinclavulanic		
Azteroname		
Cephalexin		
Cephazolin		
Ceflusodin		
Cefixine		
Oxaciline		
Azteroname		
Ticarciline		
Peristamycine Erythromycin Azithromycin	Macrolide	Empêche la croissance des bactéries, par interférence avec la biosynthèse des protéines. Elle se lie avec la sous-unité ribosomique 50S et empêche ainsi la translocation des peptides et la formation de polypeptides.
Streptomycine	Aminosides	Elle se lie à l'ARN ribosomique 16S de la sous-unité ribosomique 30S du ribosome bactérien, en interférant avec la liaison de l'ARNt de la N-Formylméthionine à la sous-unité 30S.
Amikacine		
Tobramycine		
Gentamycine		
Fosfomycin		
Lincomycine		
Vanomycine	Glycopeptides	Une inhibitrice de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne .

Tetracycline	De la classe des cyclines (ou tétracyclines),	Empêche la fixation de l'aminoacyl-ARNt entrant dans le site A du ribosome.
Levofloxacin	Fluoroquinolones	Empêche la réplication bactérienne en bloquant les enzymes ADN gyrases nécessaires à l'ouverture de la double hélice d'ADN bactérienne.
Pefloxacin		
Ciprofloxacine		
Colistine suif	Polymyxines	La colistine est polycationique et à la fois hydrophile et lipophile. Ces sites polycationiques interagissent avec les groupes phosphates des lipopolysaccharides de structure de la membrane bactérienne ce qui augmente la perméabilité membranaire et provoque la fuite du contenu intracellulaire d'où la mort de la bactérie
Linzolide	Oxazolidinones	Agit en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien, près de son centre catalytique ³ . Il peut également limiter la prolifération de certaines cellules eucaryotes en bloquant la réplication de leurs mitochondries. Il se diffuse dans l'ensemble des tissus, y compris les poumons et le système nerveux central.
Ciprofloxacine	Quinolones	Elle neutralise les enzymes bactériennes de réplication empêchant toutes multiplications cellulaires. Elle agit sur les topoisomérases de type II.

Rifampicine	Ansamycines	L'inhibition de la transcription de l'ADN en ARN en raison de la forte affinité des rifamycines pour l'ARN polymérase

L'antibiogramme des souches de lactobacilles est déterminé par la technique standardisée de diffusion sur gélose MRS, une couche de gélose molle (10ml) contenant 1% d'une culture jeune en milieu liquide est déposé dans une boîte de pétri puis laissée sécher pendant 10 minutes, à la surface de ce milieu des disques d'antibiotiques décrits précédemment ont été déposés, le tout est incubé à 30°C pendant 24 heures (**Kirby-Bauer 1966**), la lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition obtenue après incubation. (**Goppola et al., 2005 ; Delgado et al., 2005**).

A.5-La galerie API 50 :

La galerie API 50 (**Biomerieux, Réf 50 300, France**) permettent une identification des bactéries lactiques au niveau de l'espèce et peut aller jusqu'à la sous espèce dans certains cas cette identification est basée sur la fermentation de 49 sucres différents. La galerie API 50 CHL est constituée de 50 microtubes permettent l'étude de la fermentation du substrat appartenant à la fades hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcool, acide uronique).

Préparation de la galerie :

Chaque galerie est composée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés

✓ 10ml d'eau distillée est répartie dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide.

✓ Faire sortir les bandes de leur emballage les disposer dans leur emplacement.

Préparation de l'inoculum :

Environ 15 colonies pures de la souche 46 ont été prises et mises dans le milieu approprié pour la galerie (CHL) bien agiter à l'aide du vortex, jusqu'à obtenir une densité de 4 à l'échelle de McFarland.

La suspension bactérienne a été répartie dans les 50 tubes de la galerie à raison de 100ml par microtube tout en prenant les précautions suivantes :

- ✓ Eviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule.
- ✓ Une quantité d'huile de paraffine stérile est déposée dans chaque cupule pour réaliser l'anaérobiose.
- ✓ La galerie a été incubée à 30°C pendant 48 heures.

Durant la période d'incubation la fermentation des sucres est indiquée par une couleur jaune exceptée pour l'esculine (brun foncé) les résultats sont lus à 24 heures et vérifiés à 48 heures.

A.6-Test de l'antagonisme :

Antagonisme entre les souches lactiques et les bactéries pathogènes :

- ✓ **Méthode des disques imbibés :(Tadesse et *al.*, 2004)**

Des disques de papiers Wattman stériles de 06 mm de diamètre sont imbibés dans les pré cultures des 5 souches lactiques (pures), les souches pathogènes ont été ensemencées dans bouillon LB et incubés à 37 °C pendant 24 heures, après incubation 5ml de chaque tube a été transformé dans 10 ml de LB molle puis homogénéisé au vortex ,la suspension est versée dans les boîtes de pétri, après solidification, les disques imbibés sont déposés délicatement en essayant de ne pas les bouger pour bien visualiser le résultat les boîtes sont ensuite placées à 4°C « *overnight* » pour permettre une bonne diffusion de la suspension dans la gélose molle avant le début de la croissance des pathogènes. Une incubation à 30 °C pendant 24h est nécessaire afin de visualiser les éventuelles zones d'inhibition.

2.4. B. Partie *in vivo* :

Les rats :

L'expérience a été réalisée sur des rats femelles de type "Wistar" âgées de 2 mois élevées à l'animalerie au niveau du département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Saida.

B.1. Conditions d'élevage :

Les rats sont maintenus dans des conditions favorables d'élevage, dans une pièce convenablement aérée ils sont logés dans des cages en plastique à une température de 25 à 30°C et un taux d'humidité entre 60 et 70%. Ces animaux sont nourris par le régime standard à 19 % de protéines, fabriqués par l'ONAB (Office Nationale d'Aliment de Bétail, Wilaya de Sidi BelAbesse et boivent de l'eau stérile, la nourriture et la boisson sont renouvelées quotidiennement.



Figure 14: habitat des rats

Après 2 mois d'élevage les rats ont été répartis en 7 lots constitués de 6 individus comme le montre le tableau suivant :

B.2. Régime alimentaire:

Tableau 10 : le régime alimentaire de chaque lot

Lot	Nature du régime
A	Reçoit uniquement de la nourriture standard 140g+ l'eau bouillie stérile (témoin négatif)
B	Reçoit 20% de graisse animale hachée(28 g) et 80% de nourriture standard (112g)+ l'eau bouillie stérile(0.4l) « témoin positif »
C	Reçoit 20% de graisse animale hachée (28 g) et 80% de nourriture standard (112g)+ 14ml du lait fermenté par des deux souches (BH14+46) dissous dans de l'eau stérile (0.4l) 2.8 g FOS
D	Reçoit 20% de graisse hachée (28 g) et 80% de nourriture standard (112g)+ des cellules des deux souches (BH14+46) préparées et centrifugées à partir d'une culture en milieu MRS dissolues dans de l'eau stérile +2.8g de FOS (prébiotiques)
E	Reçoit 20% de graisse animale hachée (28 g) et 80% de nourriture standard (112g)+ 14ml du lait fermenté par des cellules probiotiques commercialisées dissous dans de l'eau stérile +2.8 g FOS
F	Reçoit 20% de graisse animale hachée (28 g) et 80% de nourriture standard (112g)+14ml du lait fermenté par des deux souches (BH14+46) dissous dans de l'eau stérile sans FOS
G	Reçoit 20% de graisse animale hachée (28 g) et 80% de nourriture standard (112g)+2.8 FOS dissous dans de l'eau stérile.

Les rats sont soumis à ce régime pendant deux mois au cours desquels nous avons relevé leurs poids hebdomadairement.

B.3. Préparation du lait fermenté par nos souches probiotiques :

Des colonies isolées sur le milieu MRS solide ont étéensemencées dans 6 ml de lait reconstitué demi-écrémé à 10% (p/v) stérile (Frank et al., 1993) et incubé à 30°C pendant 24. Après coagulation le contenu du tube est versé dans un flacon de 200ml de lait reconstitué demi-écrémé à 10% stérile, les cultures sont incubées et le coagulât obtenu est ensuite conservé à 4°C jusqu'à ce qu'il soit présenté aux rats.

- **Préparation du lait fermenté avec probiotiques commercialisés :**

Une poudre de souches commercialisées a été ajoutée dans 10ml du bouillon MRS et incubé à 30°C pendant 24 heures, après l'incubation 7 ml de la pré-culture est transféré dans un tube à conique et centrifugée à 4000 tours pendant 20 minutes le surnageant a été jeté et on récupère le culot dont on avait additionné quelques gouttes du lait écrémé le mélange est versé dans un flacon de 200ml contenant de lait écrémé stérile et incubé à 30°C jusqu'à la coagulation du lait, le coagulât obtenu est ensuite conservé à 4°C jusqu'à ce qu'il soit présenté aux rats.

Les probiotiques commercialisés sont sous forme composés de plusieurs souches : *Lactobacillus rhamnosus* et *bifidobacterium lactis* vitamine et fructo-oligosaccharides.



Figure 15: les probiotiques commercialisés (laboratoire nutrisanté 85612, Montaigu)

- **Préparation des cellules à partir des pré-cultures :**

A partir des cultures pure de BH14 et 46 des colonies bien visualisées ont été prélevées et transférées dans deux flacons de 250ml contenant milieu MRS liquide, bien agitées et incubées à 30°C pendant 24 heures, après l'incubation des troubles bien visibles sont apparus 7 ml de chaque flacon a été transféré dans un tube conique, centrifugé à 4000 tours pendant 15 min le surnagent a été jeté et on a conservé le culot. Ce dernier est conservé à 3°C jusqu'à ce qu'il soit présenté aux rats.

- **Prébiotiques :**

Les prébiotiques utilisés sont des fructooligosaccharides (F.O.S) de la firme Lamberts, pures extraits de racines de chicorée, le produit est conditionné sous forme de poudre dans un pot de 500g.



Figure 16 :prébiotiques donnés aux rats (LambertshealthcareLtd, Tunbridgewells)

B.4.Paramètres zootechniques :

Le suivi et le contrôle des performances de croissance et d'assimilation, sont révélés par la pesée du poids des animaux, chaque lot est pesé à jour et heure fixes une fois par semaine à jeun à partir du 17avril 2017 jusqu'au 17 juin 2017

Les rats sont pesés individuellement à l'aide d'une balance électronique en respectant le jour et l'heure de la pesée.

✓ 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.5. Paramètres de croissance

✓ Le 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.6. Paramètres biochimiques :

Les prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins étaient effectués à l'aide d'une pipette pasteur à travers le sinus rétro-orbital au niveau de l'œil, chaque 15 jours à partir du début de l'expérimentation. Le sang total récupéré est ensuite centrifugé à 3000 t/min pendant 15 min. Le sérum est recueilli dans des tubes et conservé à -20°C en vue de l'analyse des paramètres biochimiques (glycémie, triglycéridémie, cholestérolémie).

- **Dosage de la glycémie :**

Ce dosage est basé sur une double réaction enzymatique : la glucose-oxydase (GOD-PAP) oxyde le glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier permet l'oxydation de l'o-dianisidine en un produit coloré grâce à une autre enzyme, la peroxydase. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose. À partir d'une courbe étalon, on peut déterminer graphiquement la teneur en glucose d'une solution inconnue en mesurant son absorbance. ($Abs = f [glucose]$)

- **Dosage du cholestérol total :**

Le cholestérol total est dosé par une méthode colorimétrique enzymatique (Biomaghrab CHOD-PAP). 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 cholestérone 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 505 nm est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol obtenu dans l'échantillon et est exprimée en mg de cholestérol/g.

- **Dosage des triglycérides :**

Le dosage des triglycérides se fait par voie colorimétrique enzymatique (spinreact) Par l'action de lipases. Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et acides gras libres 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 505 nm.

Les 3 paramètres sont mesurés à l'aide d'un semi automate.



Figure 17: semi automate de dosage.

B.7. Paramètres microbiologiques:

La qualité microbiologique des selles de chaque lot d'animaux était examinée à un intervalle de 15 jours à partir du premier jour d'expérimentation jusqu'à la fin de l'étude, afin de déterminer les genres bactériens qui colonisent l'intestin des rats et suivre l'évolution de leur charge.

Pour cela 05g de matières fécales étaient prélevée à partir de plusieurs endroits de chaque cage et broyées dans 45ml d'eau physiologique stérile. Une série de dilutions décimales est effectuée (de 10^{-1} à 10^{-6}) à partir cette préparation puis un volume de 0,1 ml est prélevé de chaque dilution pour ensemencer différents milieux de culture afin de rechercher et dénombrer les genres bactériens selon la méthode de **Zacconi et al., (1999)**, les boîtes retenues sont celles contenant un nombre de colonies compris en 30 et 300 UFC :

✓ Dénombrement des bactéries lactiques dans la matière fécale

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

✓ Dénombrement de la flore totale (FTAM)

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

✓ *Dénombrement des staphylocoques pathogènes*

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

✓ *Dénombrement des salmonelles et shigelles:*

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

✓ *Dénombrement des coliformes fécaux :*

Milieu lactosé biliée au cristal violet et au rouge neutre ce milieu est utilisé pour rechercher les coliformes dans l'eau, le lait, les produits laitiers et les autres produits alimentaires. Les boîtes, ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h.

B.8. Sacrifice et prélèvement des organes :

Au 60ème jour de l'expérience, les animaux sont maintenus à jeun depuis la veille en vue de leur sacrifice le lendemain, les animaux ont été anesthésiés avant leur sacrifice par inhalation de chloroforme.

Les organes du rat tels que : le cœur, le foie, et le tube digestif sont soigneusement prélevés et rincés dans de l'eau physiologique à 9‰ de NaCl, ils sont ensuite pesés puis examinés à l'œil nu pour la détection d'éventuelles anomalies morphologiques.



Figure 18: Anesthésie des rats par inhalation du chloroforme.

B.9. Analyse statistique des résultats:

Les moyennes ont été calculées pour chaque mesure réalisée. Une analyse des moyennes de plusieurs paramètres a été réalisée pour la comparaison des différents lot

chapitre 3: Résultats et Discussions

chapitre 3: Résultats et Discussions

III .1. Expérimentation *in vitro* :

1.1.Vérification de la pureté des souches lactiques :

La purification des bactéries conservées a été établie par la réalisation de cultures fraîches sur bouillon MRS liquide pour garantir la viabilité des souches puis des repiquages successifs sur gélose MRS jusqu'à l'obtention de colonies bien distinctes et d'aspect homogène.

A. Etude macroscopique :

A.1. Sur milieu liquide :

Dans le milieu MRS liquide la croissance bactéries apparait sous forme de troubles alors que pour une souche pure cette trouble est concentrée au fond du tube (anaérobie) (Kihal, 1996 ; Carr *et al.*, 2002).



Figure19 : Aspect des souches pures sur MRS liquide

A.2. Sur milieu solide :

La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect. 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), l'aspect des colonies est arrondi ou lenticulaire ; de couleur blanchâtre de taille de 0.5-1µm de diamètre .



Figure 20 :Aspect macroscopique des colonies de lactobacilles sur gélose MRS

B. L'observation microscopique :

Après la coloration, Les colonies obtenues sont observées au microscope optique (x100)l'observation microscopique indique qu'il s'agit de bacilles bien apparents Gram (+).(Gancel et *al.*, 1997 ; Felten et *al.*, 1998 ; CarmenCollado et Hernandez, 2007 ; Tabasco et *al.*, 2007).

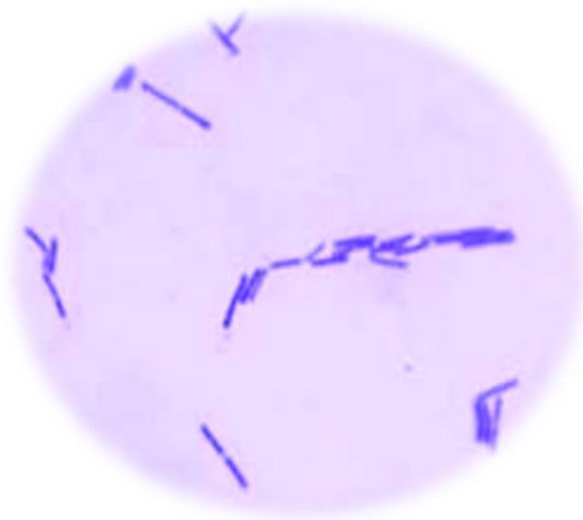


Figure 21:observation microscopique des cellules bactériennes après coloration de GramGx100.

C. Test de catalase :

L'activité de l'enzyme catalase a été recherchée, les résultats nous montrent que toutes nos souches lactiques sont à catalase négative (absence de bulles de gaz), selon le Bergey's Manuel de la systématique bactérienne «les firmicutes», les lactobacilles sont catalase négative (De Vos et *al.*, 2009).

D. Résultat de résistance aux antibiotiques :

La sensibilité des 5 souches de lactobacilles à une gamme d'antibiotiques a été évaluée par la méthode de diffusion en disques. La résistance des souches a été déterminée par la mesure des zones d'inhibition autour des disques (**Charterisetal.,1998**) comme le montrent le tableau suivant :

Tableau 11 : Résistance des différentes souches lactiques aux antibiotiques.

Numéro	ATB	BH14	JumII4	NSC5c	NSC10	CHTD27
01	Peristamycine	S	S	S	S	S
02	Ampiciline	S	S	S	S	S
03	Cephalexine	S	S	S	R	S
04	Cephazoline	S	S	S	R	S
05	Lincomycine	S	R	S	S	S
06	Rifampicine	S	S	S	S	S
07	Erythromycine	S	S	S	S	S
08	Amoxiciline	S	S	S	S	S
09	Ceftriaxone	S	S	S	S	R
10	Tetracycline	S	S	S	R	S
11	Fusidic Acid	R	R	S	R	S
12	Ceftriaxone	R	R	R	S	R
13	Cefotaxime	S	R	S	S	R
14	Azithromycine	S	S	S	R	S
15	Streptomycine	S	S	S	S	S
16	Amikacine	S	R	R	S	R
17	Oxaciline	R	R	S	S	S
18	Peniciline	S	S	R	S	R
19	Ticarcilincloxacilanic	S	R	S	R	S
20	Vancomycine	R	S	R	R	R
21	Fosfomycine	R	S	R	R	R
22	Trinithoprine	R	R	R	R	S
23	Azteroname	S	R	R	R	R
24	Levofloxacin	R	R	R	R	S
25	Pefloxacin	R	R	R	R	R
26	Colistin	R	R	R	R	R
27	Inzolid	S	R	S	S	S
28	Tobramycine	R	R	R	R	R
29	Ciprofloxacine	R	R	R	R	R
30	Gentamycine	S	S	S	S	R
31	Ticarciline	S	S	S	S	S
32	Cefixime	S	S	S	S	R

R : résistante S : sensible

< 15mm résistante

>15mm sensible

D'après les résultats obtenus

La souche BH14 est sensible à tous les antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines (agissant sur la paroi bactérienne) avec une zone d'inhibitrice allant jusqu'à 19 mm à l'exception de ceflusodine.

Sensible aux antibiotiques appartenant à la famille des macrolides (peristamycine, erythromycine) avec une concentration inhibitrice importante de l'ordre de 31 mm pour peristamycine alors qu'elle présente une résistance aux fosfomycine et tobramycine.

La souche NSC10 est également sensible aux antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamine avec des diamètres d'inhibition pouvant atteindre 40mm pour la ceflusodine alors que pour les cephalexine ,cephazoline et azteroname aucune inhibition n'est remarquée. Elle est néanmoins sensible aux antibiotiques appartenant à la famille des macrolides avec une concentration inhibitrice de 46 et 36 mm pour la peristamycine et l'erythromycine respectivement.

On constate que les souches BH14 et NSC10 présente la même résistance pour les antibiotiques appartenant à la famille des aminosides, tandis qu'elle présente une sensibilité pour la gentamycine, la ticarcilin et la cefixine avec des halos d'inhibitions de l'ordre de 15, 25 et 26 mm respectivement.

La NSC5c est de même sensible aux β -lactamines avec des zones d'inhibition de l'ordre de 27mm pour la ticarciline et l'acide clavulanique mais également aux peristamycine, erythromycine, azithromycine avec des halors de 15, 20,13 mm respectivement, contrairement aux ceflusodine, peniciline ,azteronamepour lesquelles elle est résistante

Comme les autres souches d'après les résultats obtenus la souche JumIII4 est sensible à la majorité des antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines avec des diamètres allant de 15- 29 mm alors qu'elle présente une résistance aux antibiotiques appartenant à la famille des fluroquinolones .

La CHTD27 est sensible aux antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines avec des diamètres qui peuvent atteindre jusqu'à 40 mm pour amoxiciline, ainsi elle présente une sensibilité aux antibiotiques appartenant à la famille des macrolides avec une sensibilité au peristamycine qui est de l'ordre de 50mm.

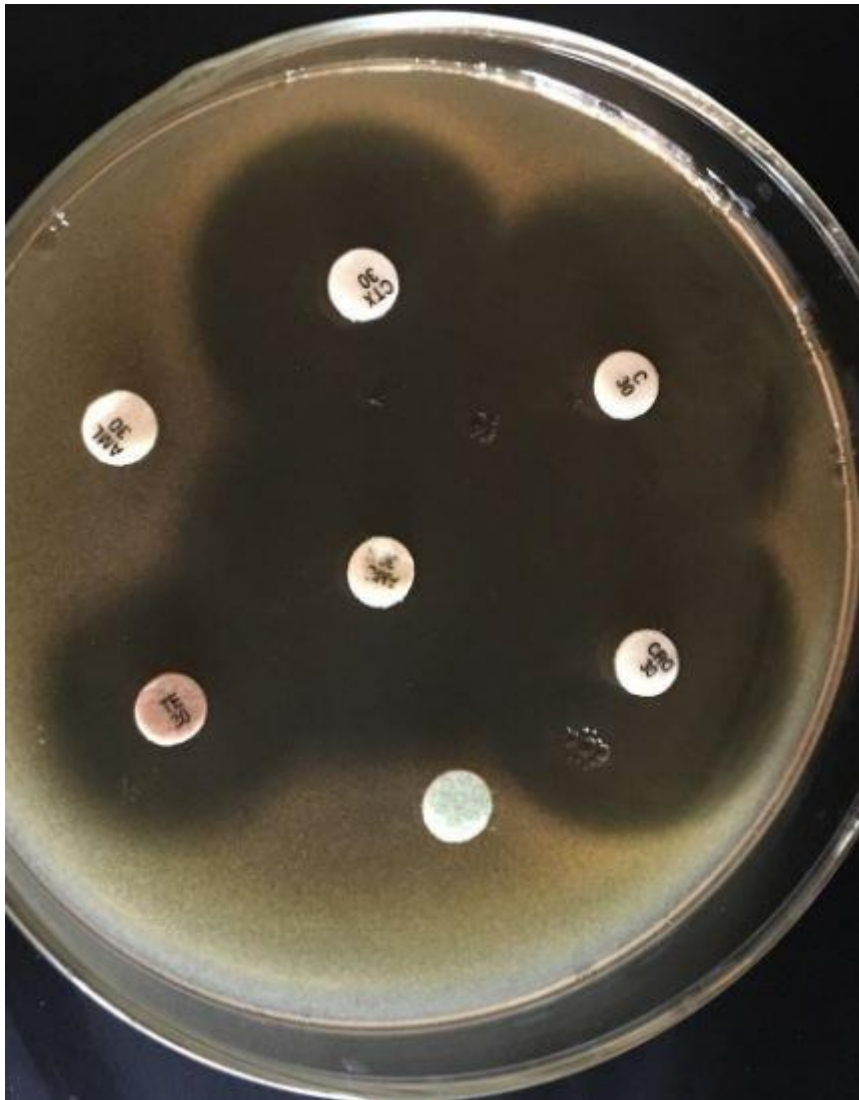


Figure 22:sensibilité de la souche CHTD 27 aux antibiotiques

En accord avec nos résultats, des études ont rapporté que les lactobacilles sont généralement sensibles aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines, comme l'érythromycine, la clindamycine et les tétracyclines (**Temmerman et al., 2002 ; Coppola et al., 2005 ; D'Aimmoet al., 2007**) et sensibles aux antibiotiques inhibiteurs de la paroi bactérienne telles que les bêta-lactamines comme la pénicilline, l'ampicilline, l'oxacilline (**Charteriset al., 1998, Danielsen et Wind, 2003 ; Kacem et Karam, 2006 ; Coppola et al., 2005 ; Ammoret al., 2007 ; Khöllet al.,2008**). Pour la gentamicine et la streptomycine, nos souches étaient sensibles à ces deux antibiotiques.

Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par **Khölletal.,2008**). Contrairement à certains chercheurs qui ont signalé des cas de résistances de *Lactobacillus* à ces deux antibiotiques (**Charteriset al., 1998 ; Sami et al., 1998 ;Coppola et al., 2005**).

Le profil de résistance de nos souches semble être intéressant. Ceci est lié, peut-être, Au fait que ces souches ont été collectées dans des zones rurales où les gens ont généralement une alimentation naturelle et traitent avec des méthodes rationnelles. Ce qui Limite l'utilisation des antibiotiques et par conséquent limite l'émergence des souches à résistance acquise dans cette catégorie de la population. En outre, les résistances observées avec nos souches à la céfoxitine, l'acide nalidixique, la vancomycine et le Semblent être naturelles. La résistance intrinsèque n'est pas horizontalement transférable, et ne pose aucun risque dans des bactéries non pathogènes **(Mathur et Singh, 2005)**.

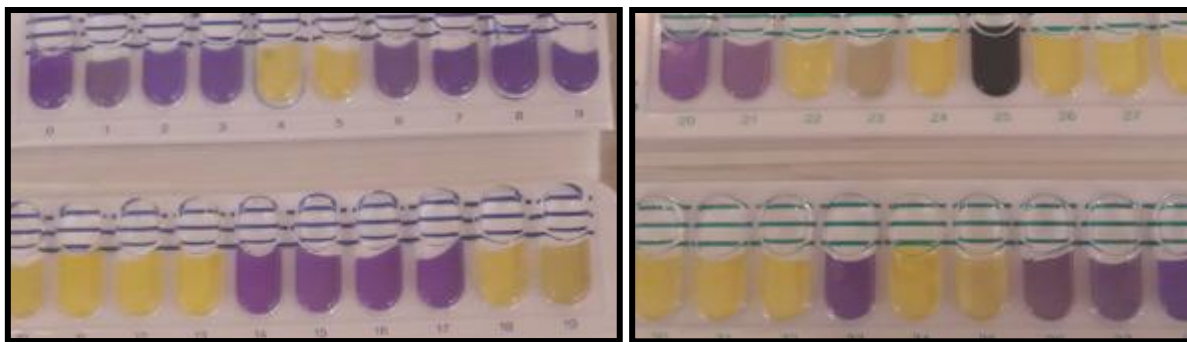
La résistance naturelle des lactobacilles à une gamme d'antibiotiques cliniquement importants

Permet leur utilisation comme probiotiques «surs» ou leur emploi en thérapie de combinaison, antibiotique / probiotique, contre les infections bactériennes.

En effet, de récentes études ont été menées sur les probiotiques, en combinaison avec des antibiotiques, comme une alternative à l'antibiothérapie chez l'homme, en raison de l'émergence et l'augmentation des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques **(Borrielloetal., 2003, Rishi et al., 2011)**. Pour la vancomycine nos résultats sont en accord avec ceux retrouvés par **Elisha et Courvalin, (1995) ; Danielsen et Wind (2003) ; Elkins et Mullis, (2004); Mathur et Singh (2005) ; Ammoret al., (2007)**. Qui ont démontré que les lactobacilles sont naturellement résistants à la vancomycine.

Les lactobacilles sont généralement sensibles aux bêta-lactamines ; mais ils sont naturellement résistant aux céphalosporines de deuxième génération comme la céfoxitine **(Danielsen et Wind, 2003)** dont le mécanisme de résistance n'est pas complètement élucidé, mais l'imperméabilité de la membrane cellulaire a été suggérée **(Elkins et Mullis, 2004 ; Ammoret al., 2007)**. Les lactobacilles ont également une résistance intrinsèque aux quinolones, telle que l'acide nalidixique par un mécanisme de résistance mal connu **(Hummel et al., 2007 ; Ammoret al., 2008)**. La résistance à caractère intrinsèque à des inhibiteurs de synthèse d'acides nucléiques comme le triméthoprim et les sulfamides a été également signalée chez les lactobacilles **(Charteriset al., 1998 ; Katlaet al., 2001 ; Ammoret al., 2008)**.

E. Résultat de la galerie API50 :

Figure 23: galerie API50 de la souche NSC5c *Lactobacillus plantarum*.Tableau 12 : identification de *Lactobacillus plantarum* par la galerie API50

Résultats	Taxons	%Proba	incompatibilité	Identification
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,4%	0	Excellente Identification
2	<i>Lactobacillus Pentosus</i>	0,5%	1	Mauvaise indentification
3	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,1%	0	Mauvaise indentification

Nos résultats révèlent une compatibilité de 99,4 % de souche NSC5c au taxon *Lactobacillus plantarum*, le profil fermentaire de notre souche a été caractérisé par sa capacité à dégrader des sucres fermentescibles (voir annexe), la souche NSC5c hydrolyse le glycérol, le galactose, le fructose, le L-Arabinose, le D-Xylose par le biais des différentes enzymes capables de catalyser ces réactions, tandis qu'elle est dépourvue des enzymes qui dégradent le D-Arabinose, le L-xylose, la présence de ces enzymes traduit le fait que la souche possède les gènes nécessaires à la synthèse de ces protéines, le haut pourcentage de probabilité obtenu lors de l'identification de la souche indique qu'il y a pas d'ambiguïté possible quant à l'appartenance de cette souche au genre *Lactobacillus* et à l'espèce *plantarum*.

F. Résultat des disques imbibés :

Résultat de l'antagonisme :

Tableau13 : les diamètres d'inhibition des souches lactiques vis-à-vis des souches pathogènes

Les souches	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
NSC10	08	00	09	08	03	02	11	06	05	03	05	03	15	03	04	07
JumIII4	04	05	08	15	02	05	12	05	04	02	04	02	15	07	00	04
CHTD27	07	05	10	08	00	00	07	10	06	00	00	07	13	06	02	01
BH14	10	06	10	10	06	00	04	07	03	11	08	06	11	00	05	02
NSC5c	03	04	13	12	04	05	06	04	04	08	07	04	10	04	00	11

+ 06

1 : *Proteus mirabilis*, 2 : *Salmonella thyphimurium*, 3 : *Klebsiella pneumonia*, 4 : *Citobacterssp*, 5 : *Enterobactercloacae*, 6 : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 7 : *Acenitobacterbaumannii* 8 : *Pseudomonasaeruginosa* ATCC 27853, 9 : *Escherichia coli* ATCC 25922, 10 : *Bacillus cereus*, 11 : *Staphylococcus aureus* (II2) ATCC 433005, 12 : *Enterobacteraerogenes*(EL4), 13 : *Klebsiella pneumaniesupss pneumanie* , 14 : *Hafniaalveei* LB1, 15 : *Enterobacter ssp* (ES8), 16 ; *Salmonella galinarum*.

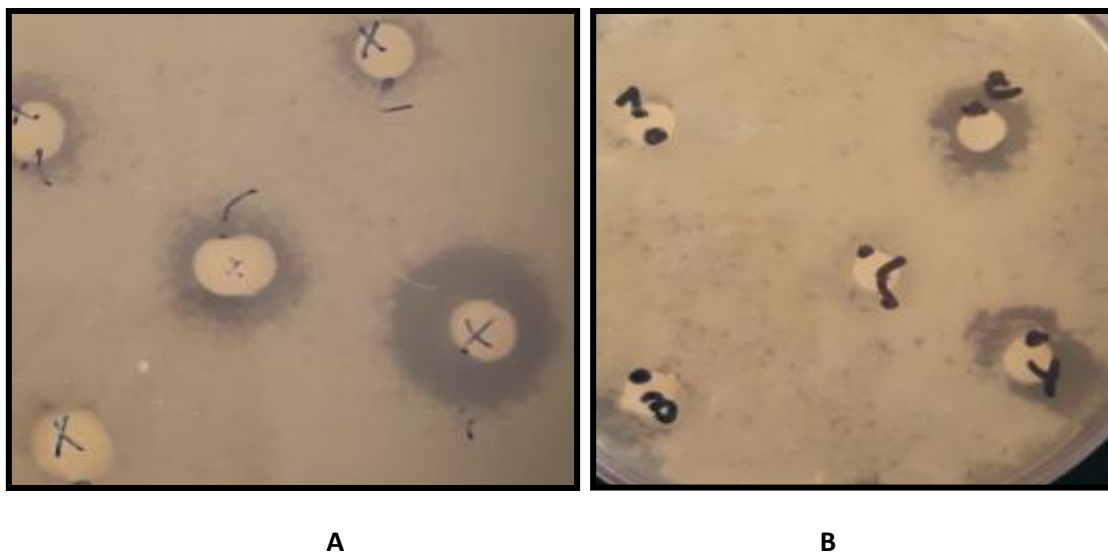


Figure 24: A :activité inhibitrice des souches de lactobacilles sur *Citobacterssp*.

B : activité inhibitrice des souches de lactobacilles sur *Acenitobacterbaumannii*.

Les résultats obtenus de l'antagonisme révèlent l'inhibition des souches pathogènes indicatrices par les cinq souches testées, qui s'est traduit par l'apparition des halos

d'inhibition. Il est clair que nos souches exercent un effet inhibiteur marqué sur les souches indicatrice testées, les halos avaient des diamètres compris entre 03 et 15 mm pour la souche NSC10, entre 02 et 15 mm pour la souche JumIII4, entre 05-13 mm pour la souche CHTD27, entre 04 et 11 mm pour la souche BH14 et entre 03 et 13 mm pour la souche NSC5c.

D'après les différents diamètres trouvés on constate que les souches étudiées n'ont pas le même spectre vis-à-vis des souches indicatrices.

L'effet inhibiteur des souches a été beaucoup plus marqué sur *Citobacter* sp., *Staphylococcus aureus* (II2) avec des zones d'inhibition claires avec des bordures distinctes (figure 23) en revanche nous n'avons remarqué que : *Staphylococcus aureus* 1 était la souche la plus résistante avec des zones d'inhibition de 02,05,05 mm envers les souches NSC10, JumIII4 et NSC5c respectivement alors qu'aucune zone d'inhibition n'est marquée autour des colonies des souches CHTD27 et BH14.

Les microorganismes pathogènes testés dans notre étude sont impliqués dans les toxi-infections ou les intoxications alimentaires appartenant aux espèces suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* et *Klebsiella pneumoniae* ces valeurs coïncident pour certaines souches avec les travaux de **Belyagoubi et Abdeouahid (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.

Les résultats trouvés sont en accord avec ceux trouvés par d'autres auteurs qui ont montré que les bactéries à potentiel probiotiques sont capables d'empêcher la croissance de certaines bactéries pathogènes.

In vivo des études effectuées par **Bernet et al., (1993)** ont démontré que des souches de bactéries lactiques adhérant fortement aux cellules intestinales Caco-2 inhibent l'adhésion de micro-organismes pathogènes comme *E. coli* et *Salmonella typhi* à ces mêmes cellules lorsque elles sont placées en compétition. Parmi les souches ayant fait l'objet d'études préalables sur Caco-2, *L. rhamnosus* GG, *L. casei*, *L. helveticus*. Elles adhèrent fortement au tissu provenant du côlon, une inhibition complète d'*E. coli* est remarquée par l'ajout préalable de ces souches. (**Coconnier et al., 1993; Bernet et al., 1994 ; Mack et al. 1999**).

Ces auteurs ont proposé, que l'adhésion préalable des probiotiques aux cellules intestinales contribuerait à limiter l'accès des pathogènes aux entérocytes en plus d'augmenter la sécrétion du mucus qui pourrait lui aussi empêcher l'adhésion des pathogènes aux cellules intestinales. Ces souches probiotiques étaient capables d'exclure et d'entrer en compétition

avec les pathogènes de façon significative sur le mucus (**Lee et al., 2003**). Le degré de compétition était dépendant de chaque souche et probablement déterminé par l'affinité respective des adhésines présentes sur la surface des bactéries aux glycoprotéines du mucus (**Lee et al., 2003**) ; Le mécanisme d'action des probiotiques concerne l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes grâce à des composés antimicrobiens (**Cotter et al., 2005**).

Les bactéries lactiques exercent une forte activité antagonistique contre plusieurs microorganismes, y compris ceux de la détérioration des aliments et des microbes pathogènes

En outre l'effet antimicrobien de quelques souches lactiques permet de prolonger la durée de conservation des aliments (**Haller, 2001 ; O'Sullivan et al., 2002**). Cette activité inhibitrice est probablement due aux acides organiques (**Barber et Deibel, 1972 ; Delbes et al., 2006 ; Lindqvist, Sylven et Vagsholm, 2002**) au peroxyde d'hydrogène (**Otero et Nader-Macias, 2005**), ou alors à des bactériocines (**Ammore et al., 2006**).

Bekhouche et al., 2005 ont démontré que les bactéries lactiques assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité alimentaire pour empêcher la croissance des flores non lactiques dont certaines sont pathogènes.

III .2. Partie in vivo :

L'étude *in vivo* a été réalisée sur 7 lots, notre expérimentation repose sur l'étude des trois paramètres :

- Paramètres zootechniques.
- Paramètres biochimiques.
- Paramètres microbiologiques.

2.1. Paramètres zootechniques :

Les paramètres zootechniques nous renseignent sur le poids vif moyen hebdomadaire, l'indice de consommation et le gain de poids au niveau des différents lots.

✓ Indice de consommation :

Nous rappelons que l'indice de consommation est le rapport de la quantité de nourriture consommée par les rats en croissance, au gain de poids qu'il a réalisé (**figure 25**)

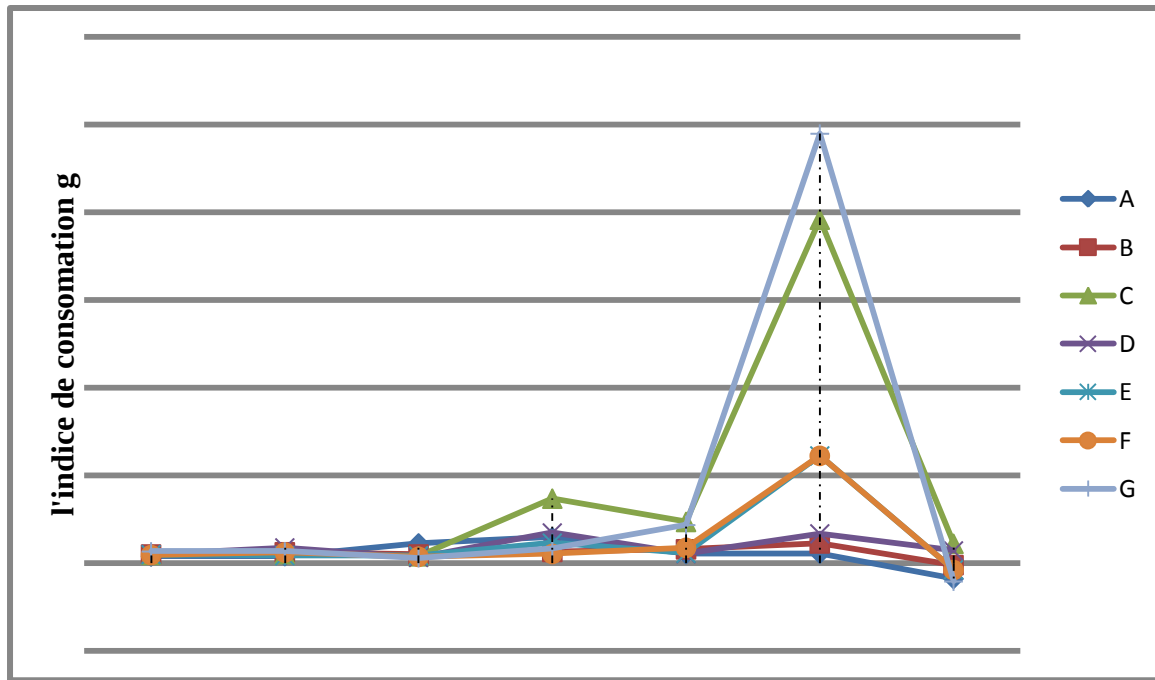


Figure25: Evolution de l'indice de consommation

Les indices de consommation montrent des variations significatives tout au long de la période expérimentale.

On remarque qu'au niveau des lots témoins (positif + négatif) un indice de consommation plus élevés par rapport aux autres lots ainsi une valeur basse au niveau de lot recevant le symbiotique (probiotique+prébiotiques), Il faut noter que les sujets du lot expérimental recevant un régime supplémenté en probiotique, présentent au cours des différentes phases d'élevage des indices de consommation inférieurs au témoin.

On retrouve cet effet, dans le test réalisé par **Dell'Orto (1995)** qui présente des résultats positifs avec ce type de micro-organisme sur la croissance (+8.8%) et l'I.C (-9.1%) des poussins **Pelicano et al. (2004)** ont démontré que la ration alimentaire de poulet de chair supplémentée avec une souche de *Lactobacillus* a entraîné une amélioration de l'indice de consommation après le 21^{ème} jour de traitement.

Par la suite on remarque l'augmentation d'IC au niveau de tous les lots est significative qui s'est traduit par des diarrhées dans cette période et le changement climatique.

On constate que le lot (G) présente un IC élevé par rapports aux autres lots à la fin de l'expérimentation ce qui confirme que l'effet des prébiotiques seuls ne joue pas un rôle primordial pour éliminer les lipides.

Nos résultats 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 la 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 des 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.

✓ **Le gain de poids moyen :**

La croissance relative des rats est illustrée par **(Figure 26)** qui représente le gain pondéral moyen. Le gain de poids exprimé en (g) représente la fluctuation du poids des rats au cours des 8 semaines de l'expérimentation.

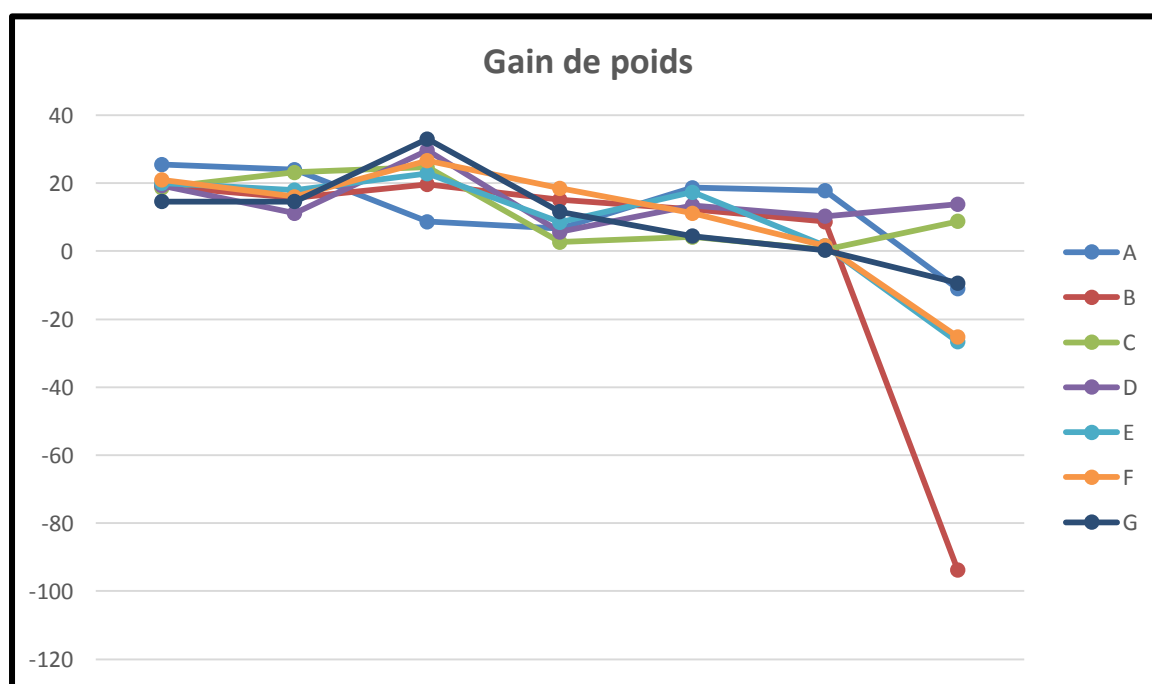


Figure 26: Evolution du gain de poids au cours des semaines

On remarque au cours des deux premières semaines d'élevage une augmentation du poids au niveau de tous les lots notamment au niveau des lots recevant les cultures mixtes+ probiotiques on en a déduit que les rats sous régime probiotiques+ prébiotique sont une nourriture ingérée et un apport énergétique élevés par rapport aux rats sous régime témoin, ce qui confirme les résultats des études précédent (**Bouananetal.,2009 ;Soulimane-Mokhtariet al., 2005**).

A la deuxième semaine les individus de l'ensemble des lots ont un GPM important qui correspond à la croissance de tous les animaux, notamment au niveau du lot (G) 33g En plus, nos résultats suggèrent que la consommation du régime hyper lipidique provoque une augmentation significative du poids de quelques organes notamment le foie et les intestins par rapport aux rats témoins.(voir les paramètres de carcasse)

Une différence significative entre les poids des animaux du lot expérimental et ceux des animaux du lot témoin est observée Ce délai de réponse pourrait s'expliquer par le temps nécessaire aux bactéries lactiques pour coloniser le tube digestif.

A la fin de la 3ème prélèvement une chute de poids remarquable au niveau de tous les lots qui s'est traduit par une forte diarrhée, cette croissance est un indicateur important de détérioration de l'état des animaux.

Dès la 4ème semaine les individus de tous les lots reprennent leur poids progressivement notamment au niveau du lot (C) Du point de vue évolution pondéral, nous pouvons dire que l'addition d'un probiotique + prébiotique a été intéressante. Ce qui correspond à une amélioration du poids de 7.6%. Ceci s'explique par le fait que les 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.

Les travaux de **Savoini et al.(2004)** ont démontré une amélioration de poids à j 35 de 3% alors qu'**Awwad (2001)** a constaté un taux de 7,5% par ailleurs, **Kabir et al. (2004)** avait observé une amélioration du poids avec les *Lactobacilles*.

Ces résultats semblent concorder avec ceux de **Vittorio et al. (2005)** pour les souches bactériennes testées dans notre expérimentation.

Nos résultats rejoignent ceux trouvé par **Amara (2012)** qui a démontré que l'apport de probiotique+prébiotique favorise l'augmentation du gain de poids chez les poulets de chair ISA15 comparé aux témoins.

✓ Le poids vif moyen :

Afin de mieux visualiser l'effet de l'ajout des suppléments (pro/prébiotiques) sur le poids corporel des animaux, nous avons suivi l'évolution de ce poids chez les sept lots de rats durant les 8 semaines de l'étude (**figure 27**)

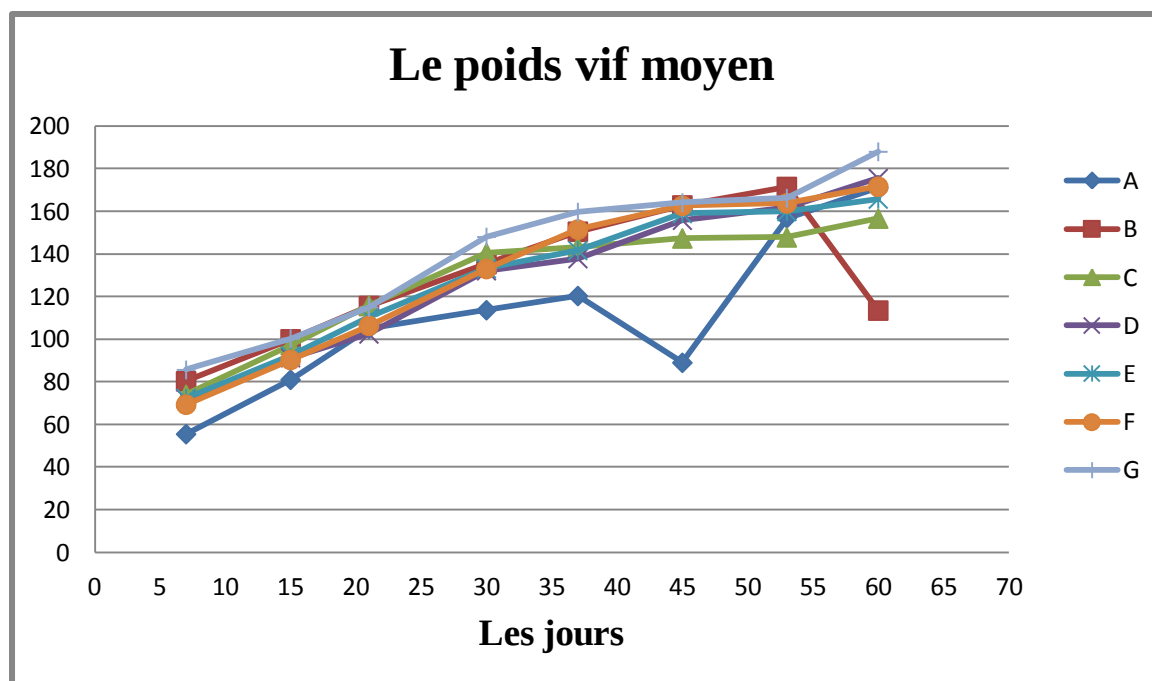


Figure 27: Evolution du gain de poids moyen au cours des semaines

Au début de l'expérimentation le poids vif moyen de tous les individus des lots est quasiment identique avec une différence au niveau du lot témoin (A) jusqu'à la fin de l'expérimentation.

En effet, nos résultats montrent que le poids corporel des rats consommant le régime hyper-lipidique est nettement supérieur par rapport aux rats recevant le régime témoin standard. Ainsi, on a déduit que les rats sous régime hyper-lipidique ont une nourriture ingérée et un apport énergétique élevé par rapport aux rats sous régime témoin ce qui rejoint les résultats des études précédentes (**Bouananet al.,2009 ;Soulimane-Mokhtariet al., 2005**).

Après la période d'adaptation au nouveau régime, le poids vif moyen augmente proportionnellement avec la consommation quotidienne de l'alimentation. Parallèlement, plusieurs études ont montré que chez les rats, un régime à forte teneur en graisses entraîne une prolifération cellulaire accrue dans le tissu adipeux et affecte considérablement la physiologie et l'utilisation intestinales des lipides (**Petit et al.,2007**).

Entre le 35^{ème} et 40^{ème} jours on remarque une chute de poids qui peut atteindre 77 g au niveau du lot témoin qu'on peut le traduire par les fortes chaleurs observées à cette période qui favorise la prolifération des pathogènes, engendrant ainsi des diarrhées.

A partir du 40^{ème} jour, nous avons observé un regain de poids remarquable au niveau du lot témoin (A).

Ainsi les lots recevant les probiotiques n'ont pas eu des chutes de poids on peut conclure que les probiotiques jouent un rôle de régulateur du microbiote intestinal et favorise une bonne répartition de la flore commensale.

Une chute de poids très importante a été marquée au niveau du lot (B) de 177-118 g qu'on peut traduire par une atteinte des animaux au foie suite à leur consommation prolongée du régime hyper-gras sans supplémentation en pro et prébiotiques, cette hypothèse a été confirmée par un bilan hépatique qui a montré un taux de bilirubine élevé de ce lot par rapport aux autres lots de l'expérimentation.

Par ailleurs, **Kabir et al. (2004)** avaient observé une amélioration du poids avec les lactobacilles à partir de la 2^{ème} semaine. Ces résultats semblent concorder avec ceux de **Vittorio et al (2005)** pour la même souche bactérienne testée dans notre expérimentation.

2.2. Paramètres biochimiques :

Le but de cette partie est de suivre l'évolution de quelques paramètres lipidiques (Cholestérol et triglycéride) et glucidique (glucose) chez les rats Wistar, pendant les 8 semaines de l'expérience et de rechercher d'éventuel effet des prébiotiques et probiotiques sur ces paramètres.

✓ La glycémie :

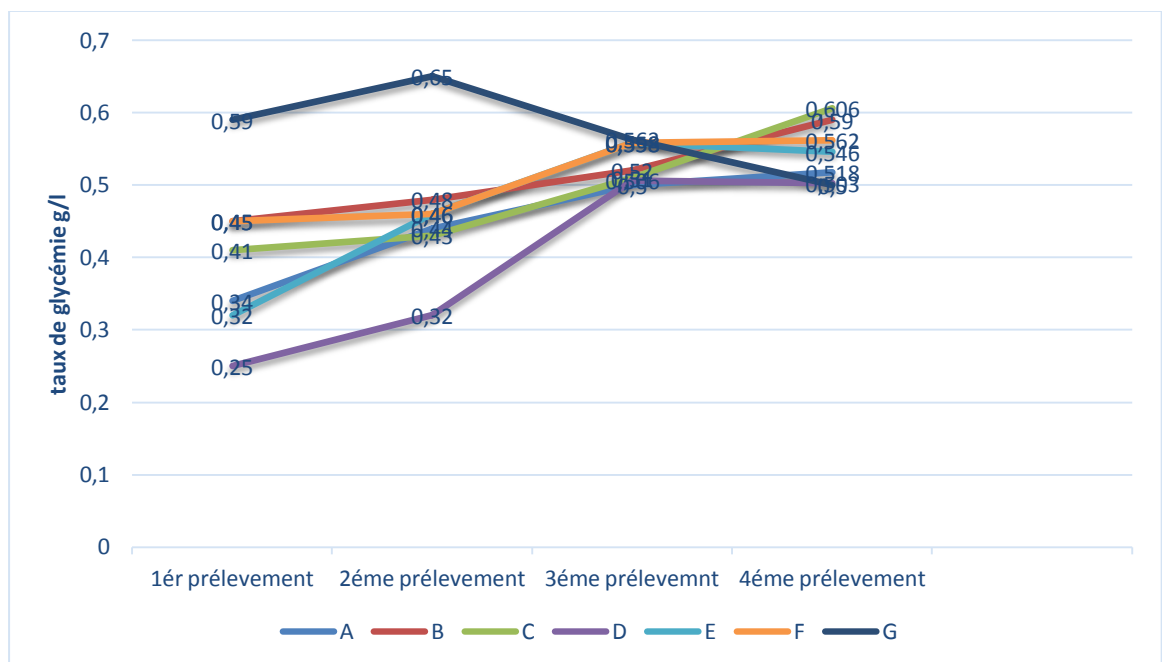


Figure 28: Evolution de la glycémie chez les rats.

D'après les résultats trouvés :

Le premier prélèvement révèle que l'ensemble des lots ne présentent pas la même valeur de glycémie par rapport au lot témoin qui peut se traduire par une différence dans le métabolisme de glucose entre les rats.

Une augmentation du taux de glycémie par rapport au lot témoin (A) remarqué au niveau des lots suivant ; B,F,C,E qui varient entre 0.40-0.54 g/l à l'exception du lot D qui a une valeur de 0.26g/l ,alors que pour le lot G la valeur peut atteindre jusqu'à 0.65 g/l on peut le traduire par la période d'adaptation à leurs nouveaux régime alimentaire.

Dès la 4^{ème} semaine une augmentation significative a été marquée au niveau de tous les lots traduite par une consommation importante du régime et un apport calorique considérable à l'exception du lot G qui a subi une chute du taux de glycémie qui peut atteindre jusqu'à 0.49g/l à la 8^{ème} semaine d'expérimentation qui peut se traduire par l'effet stabilisateur des prébiotiques(FOS)sur le taux de glycémie ce résultat a été confirmé par le lot A témoin négatif qui reçoit un régime standard

Une augmentation considérable au niveau du lot C qui se traduit par la digestion du FOS par les bactéries lactiques (BH14+46) contenues dans le lait fermenté alors que pour le lot G c'est seulement la flore autochtone.

A partir du 45^{ème} jour le taux de glycémie au niveau de tous les lots commencent à se stabiliser jusqu'à la fin de l'expérimentation à l'exception du lot G dont le taux continue à chuter.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Hata et al., 1985, Hidaka et al., 1986 Drevon, Bonet et Amara (1992, 1994 et 2012)** qui ont constaté que les FOS ont un effet régulateur sur le métabolisme glucidique ils ont évalué qu' après une prise de 25 g de FOS chez les diabétique le taux de la glycémie n'augmente pas.

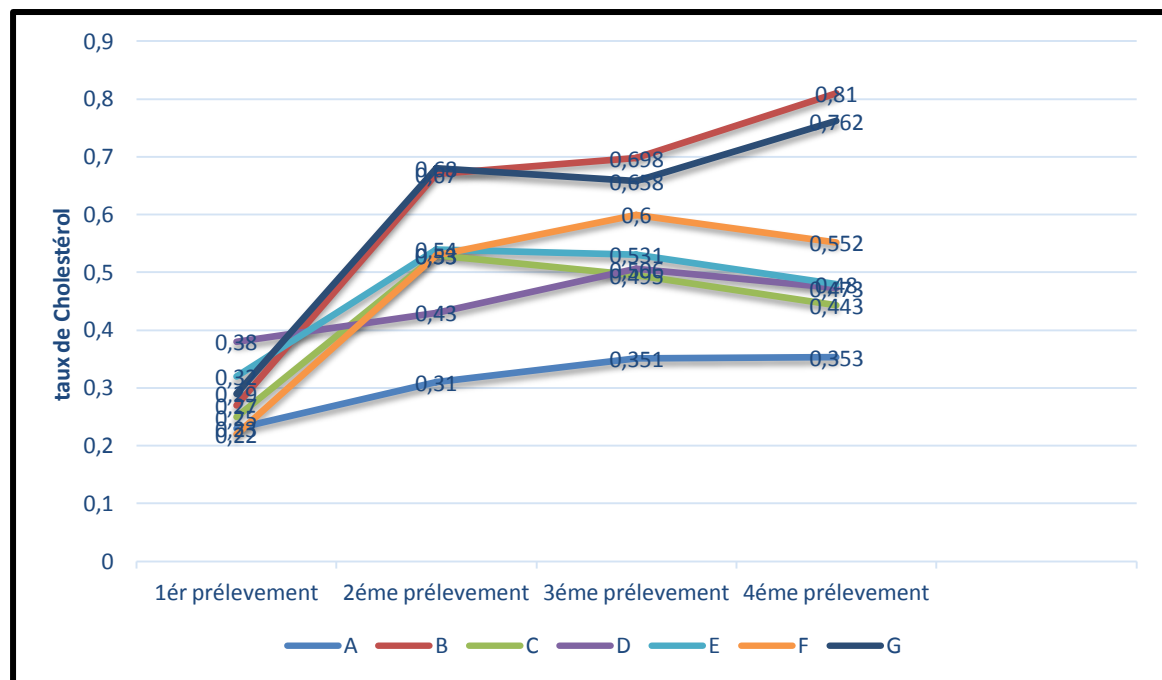
✓ **Cholestérolémie :**

Figure 29 : évolution de la cholestérolémie chez les rats.

Avant d'entamer le nouveau régime on remarque que les lots ont la même valeur de cholestérol 0.20g/l à l'exception du lot G qui a une valeur initiale de 0.39g/l cela est dû à un métabolisme lipidique différent entre les rats.

Une augmentation considérable à partir de la 4^{ème} semaine d'expérimentation au niveau de tous les lots par rapport au lot témoin (A) qui peut se traduire par une consommation importante du gras et une adaptation au nouveau régime.

Des valeurs presque pareilles au niveau du lot (G) et B (témoin positif) peuvent atteindre jusqu'à 0.69g/l expliqué par la consommation du même régime car le lot G ne consomme que FOS sans apport supplémentaire en probiotiques, on constate que les FOS n'ont aucun effet sur le taux de cholestérolémie une stabilisation des deux lots entre 30 et 45^{ème} jours puis une augmentation à partir du 45^{ème} jours a été marquée au niveau des deux lots qui peut atteindre 0.80g/l à la fin de l'expérience.

Pour les lots (C) et (F) on remarque une chute remarquable du taux de cholestérol notamment pour le lot (C) avec des valeurs de 0.42g/l à la fin de l'expérience ceci est probablement dû à l'effet exercé par la combinaison des deux souches lactiques contenues dans le lait fermenté et le prébiotique par rapport au lot (F) qui a subi une augmentation pour

atteindre 0.56g/l du fait qu' il ne reçoit pas du FOS, nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Mohan et *al.*, 2004) qui ont conclu que les *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus casei* abaisse le taux du cholestérol en comparaison aux témoins.

Bien que la réduction du cholestérol a été bien marquée pour les lots consommant les probiotiques mais l'ajout d'un supplément favorise nos souches probiotiques à dégrader le cholestérol. D'après des études effectuées par **Mohan et al (1996), Jin et al (1998), Awaad (2001), Abdollahi et al (2003), Kalavathy et al (2003)** ; la supplémentation de la ration alimentaire avec des prébiotiques des Rats avec des souches bactériennes réduit significativement le taux du cholestérol durant toutes les phases d'expérimentation.

Le lot (E) semble pareil avec les lots (C) et (F) avec une différenciation non négligeable de 0.49g/l à la fin de l'expérience qui peut se traduire par l'effet des souches commercialisées qui reste non efficace par rapport à nos souches cultivées bien que Le prébiotiques FOS été ajouté.

Le lot (D) présente au début de l'expérimentation un taux de cholestérol réduit par rapport aux autres lots 0.42 g/l, pour le lot (E) 0.49 g/l expliqué par l'effet bénéfique exercé par la combinaison des deux souches (BH14+46) avec le supplément FOS.

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 par les BL. 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 à cette période (**Izquierdo Alegre, 2009**). Nos résultats sont en accord avec (**St-Onge, 2000 cité par Jones, 2002**) (**Mercenier et al., 2002**) (**Lim et al., 2004**) (**Leahy et al., 2005**) (**Pereira et al., 2003**) (**Psomas et al., 2003**) (**Hongbao, 2004**) (**Sanders, 2000**): qui ont déduit que les probiotiques possèdent une activité hypocholestérolémiant qui peut être due :

- ✓ A l'inhibition de la synthèse hépatique du cholestérol.
- ✓ A leur capacité à déconjuguer les sels biliaires : les formes déconjugées d'acides biliaires ne sont pas bien absorbées par la muqueuse intestinale.

✓ Triglycéridémie :

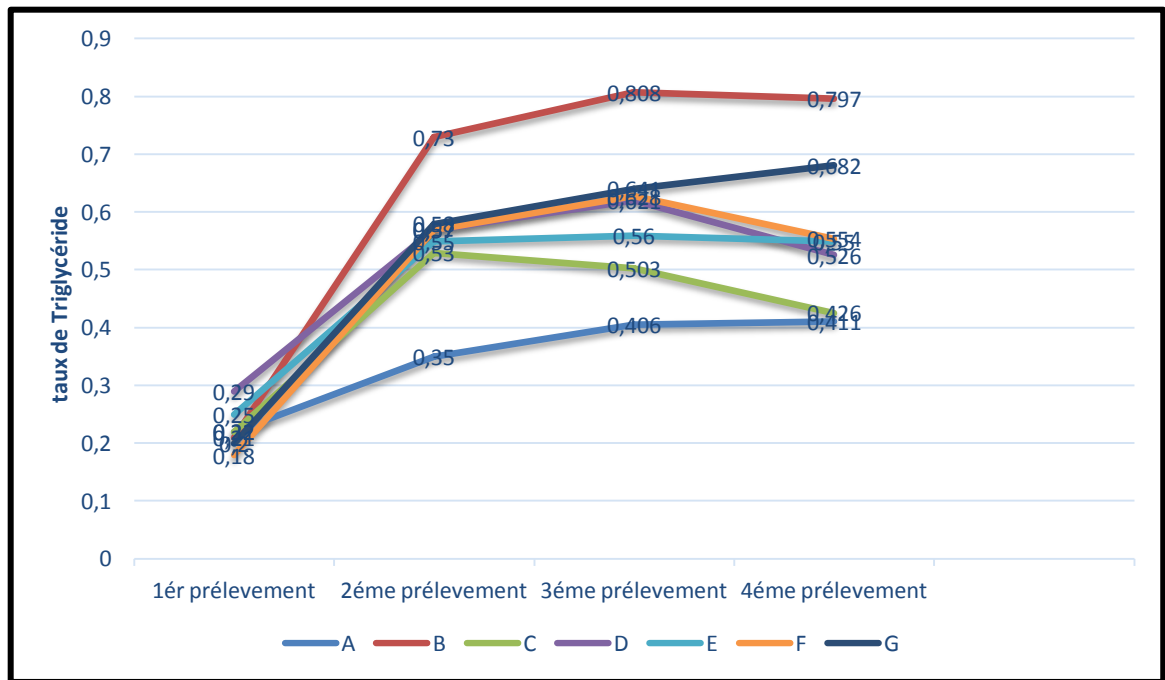


Figure 30: évolution de la triglycéridémie chez les rats.

Lors du 1^{er} prélèvement tous les lots avaient la même valeur initiale du triglycéride 0.20g/l dès la 2^{ème} semaine une augmentation considérable a été marquée au niveau de tous les lots par rapport au témoin négatif qui se traduit par une consommation quotidienne du régime hyper lipidique.

Le lot (B) témoin positif a monté dès le premier mois une augmentation importante de ce paramètre avec des valeurs de 0.72g/l traduite par la consommation du régime hyper gras sans apport de symbiotiques, la flore commensale ne peut dégrader efficacement le gras entraînant une augmentation progressive de leur taux de triglycérides pour atteindre une valeur finale de 0.80g/l contrairement aux autres lots pour lesquelles la triglycéridémie chute.

Le lot (G) présente une valeur aussi élevée qui atteint 0.69 g/l du fait qu'il ne consomme pas de probiotiques on constate que les FOS sont des suppléments alimentaires n'ayant pas la même efficacité que l'apport en probiotiques, ils ont seulement pour rôle d'améliorer les capacités de la flore intestinale préexistante.

Les lots (C), (E), (F) présentent une similarité remarquable entre le 15^{ème} et 30^{ème} jour avec un taux de 0.58 g/l, dès lors une chute considérable au niveau du lot (C) est observée qui atteint 0.40 g/l (la même valeur que le témoin négatif) qui se traduit par l'effet exercé par la combinaison des deux souches probiotiques (BH14+46) la différence est significative ceci montre l'influence des probiotiques sur la triglycéridémie et concorde

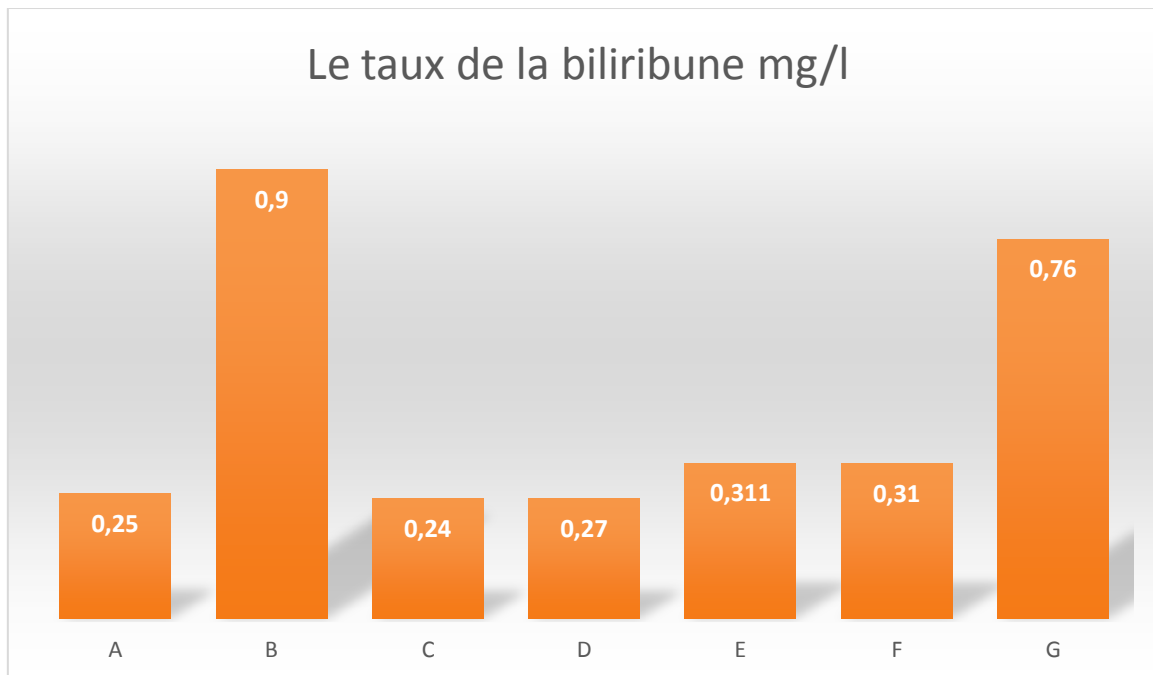
pleinement avec les résultats obtenus par **Kalavathy et al. (2003)** qui ont trouvé que la supplémentation des *Lactobacillus* à un régime alimentaire réduit significativement le taux sanguin des triglycérides, les prébiotiques stimulent la prolifération et multiplication des probiotiques, cela est bien marqué au niveau du lot (F) qui reçoit seulement le mélange des deux souches probiotiques sans FOS.

Le lot (E) présente un taux réduit par rapport au témoin positif (B) et au lot (G) 0.58 g/l qui se traduit par un effet non efficace par les souches commercialisées on constate alors que les souches commercialisées n'exercent pas une activité optimale que celle des souches lactiques isolée du lait de chamelle.

Nos résultats sont en accord avec ceux de St-Onge, 2000 cité par Jones(2002) : **Mercenier et al.(2002), Lim et al.,(2004), Leahy et al.(2005), Pereira et al.(2003), Psomas et al. (2003), Hongbao (2004) et Sanders(2000):** qui ont déduit que les probiotiques possèdent une activité hypotriglycéridémiant.

De façon général, nous remarquons une meilleure réduction du cholestérol et triglycérides par le lait fermenté par nos souches combiné aux FOS, suivi par la combinaison de cellules (sans fermentation du lait uniquement les cellules probiotiques), le lait fermenté par nos souches sans ajout de FOS semble avoir le même effet que les souches commercialisées supplémenté de FOS, avec un avantage pour nos souches, et enfin les FOS consommés seuls sans probiotiques qui favorise uniquement la flore intestinal préexistante des rats.

✓ La bilirubine :

**Figure 31:** le taux de la bilirubine à la 8^{ème} semaine

Un résultat inattendu est survenu une chute de poids considérable ainsi qu'un taux de mortalité a été marqué au niveau du lot (B) un jaunissement au niveau des queues des rats, une odeur intense des urines et une fatigue ce qui nous a mené à effectuer un bilan hépatique.

Le bilan révèle par coïncidence une valeur élevée au niveau du lot (B) 0.90mg/l par rapport à l'ensemble des lots y compris le témoin négatif (A) ainsi une valeur remarquable de 0.76 mg/l pour le lot (G), des résultats presque similaires au niveau des lot (E) et (F) 0.31 et 0.30 mg/l alors qu'au niveau du lot (C) une valeur basse 0.24mg/l, nous avons émis une probabilité que nos cultures mixtes aurait un effet protecteur sur le foie malgré une alimentation malsaine des lots recevant le supplément lipidique dans leur ration alimentaire, cependant ces résultats restent non déterminant du fait de n'avoir pas trouvé de travaux menés sur l'effet protecteur des probiotiques sur la bilirubine comme point de comparaison, d'autre expérimentation devront être réalisés pour confirmer cette hypothèse.

2.3. Paramètres microbiologiques :

La colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal des homéothermes est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes, et qui dépend de multiples facteurs. L'utilisation des rats Wistar (à flore contrôlée) permet une approche expérimentale des facteurs mis en jeu.

Les investigations récentes ont mis en évidence le rôle que joue la microflore intestinale dans le maintien et l'amélioration de la santé. Cette microflore est fortement influencée par l'alimentation.

Dans notre étude les paramètres microbiologiques permettent de faire une estimation des différentes flores qui persistent dans les selles des rats ce qui nous renseigne sur les microorganismes résistant au passage intestinal.

- **La flore fécale :**

Les flores dénombrées ont été les germes totaux (bactéries mésophiles ,psychrotrophes et sporulés) : les coliformes totaux et fécaux : ainsi que les pathogènes comme les staphylocoques et les salmonelles.

Ces différents germes microbiens ont été recherchés sur 5 milieux : MRS, Chapman, SS, VRBL, GN

- **La flore mésophile totale aérobie :**

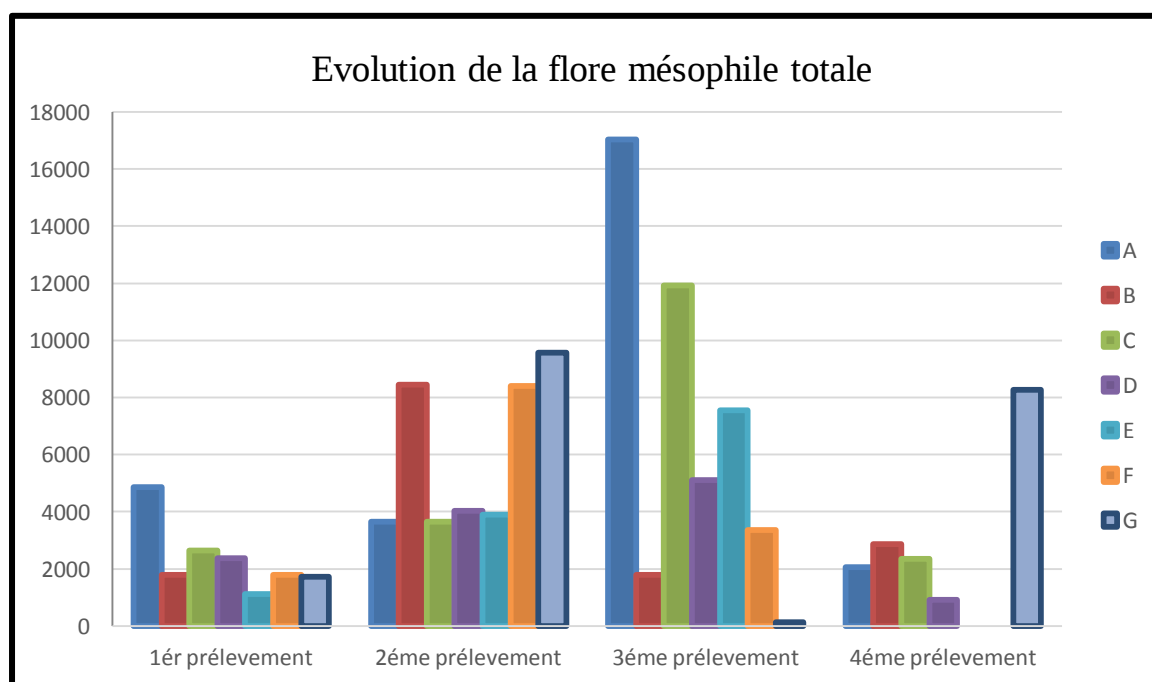


Figure 32: Evolution de la flore mésophile totale

La flore mésophile aérobie totale indique le degré de contamination elle a été dénombrée sur gélose nutritive. On constate une diminution progressive de la flore pour tous les lots expérimentaux et une augmentation au niveau du lot témoin (A), les populations bactériennes à l'intérieur du tractus gastro-intestinal coexistent en ayant chacune leur niche écologique nécessaire à leur croissance (Fooks et Gibson, 2002), pour fonctionner de façon optimale, la balance du microbiote bactérien doit être maintenue de façon équilibrée mais de nombreux facteurs peuvent l'affecter. Le concept des espèces bénéfiques existe depuis longtemps (Liévin et al., 2000). Selon ce concept, certaines bactéries formant le microbiote intestinal seraient associées à des effets positifs sur la santé, alors que d'autres sont considérées comme néfastes. Les bactéries potentiellement bénéfiques pour la santé incluent principalement les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* leur dominance chez les nouveau-nés nourris au sein leur procureraient une protection optimale contre les infections intestinales (Picard et al., 2005).

✓ Les entérobactéries :

Les entérobactéries sont des bactéries aérobies et anaérobies facultatives, à Gram négatif, asporulées en forme de bâtonnet dont la plupart sont mobiles grâce à des flagelles disposés de manière péritriche l'expression « coliformes totaux » regroupe plusieurs espèces bactériennes de la famille des entérobactéries, leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur rapidité de multiplication, leur fréquente résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologie infectieuse, sont capables d'envahir le tractus intestinal pour s'y multiplier principalement et engendrent des symptômes diarrhéiques mais également dans certains cas des nausées, des vomissements et une altération générale de l'état de la santé (Steer et al., 2000).

Elles regroupent plusieurs espèces bactériennes de la famille des entérobactéries, ces dernières ont été dénombrées sur le milieu VRBL.

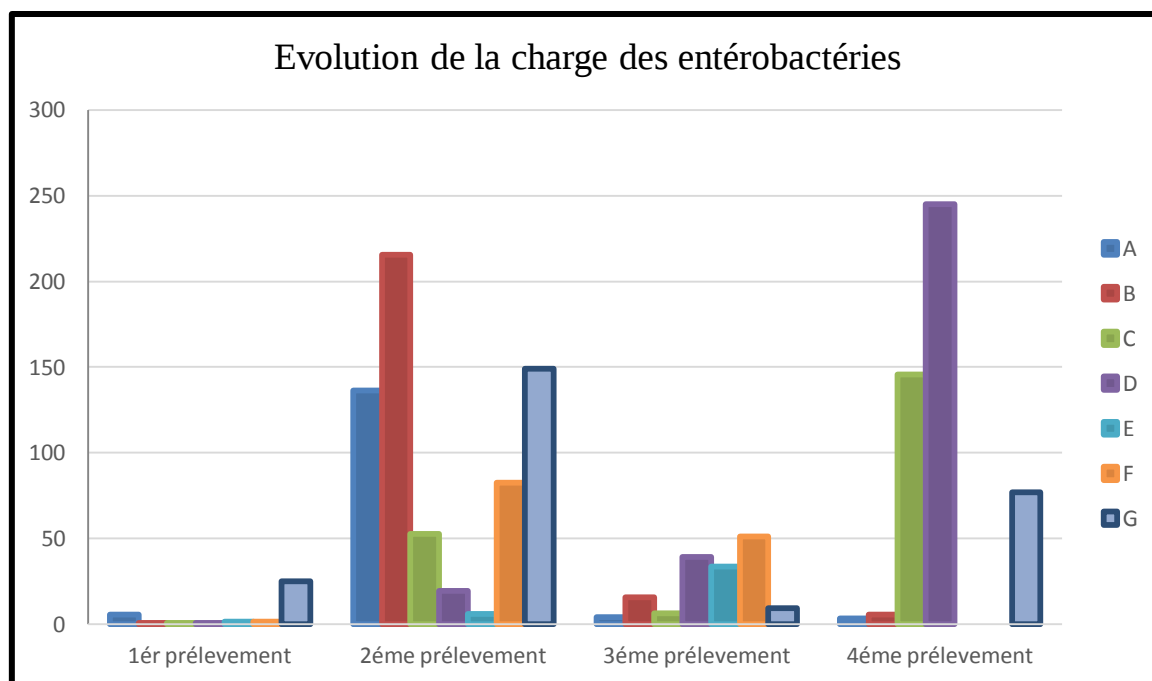


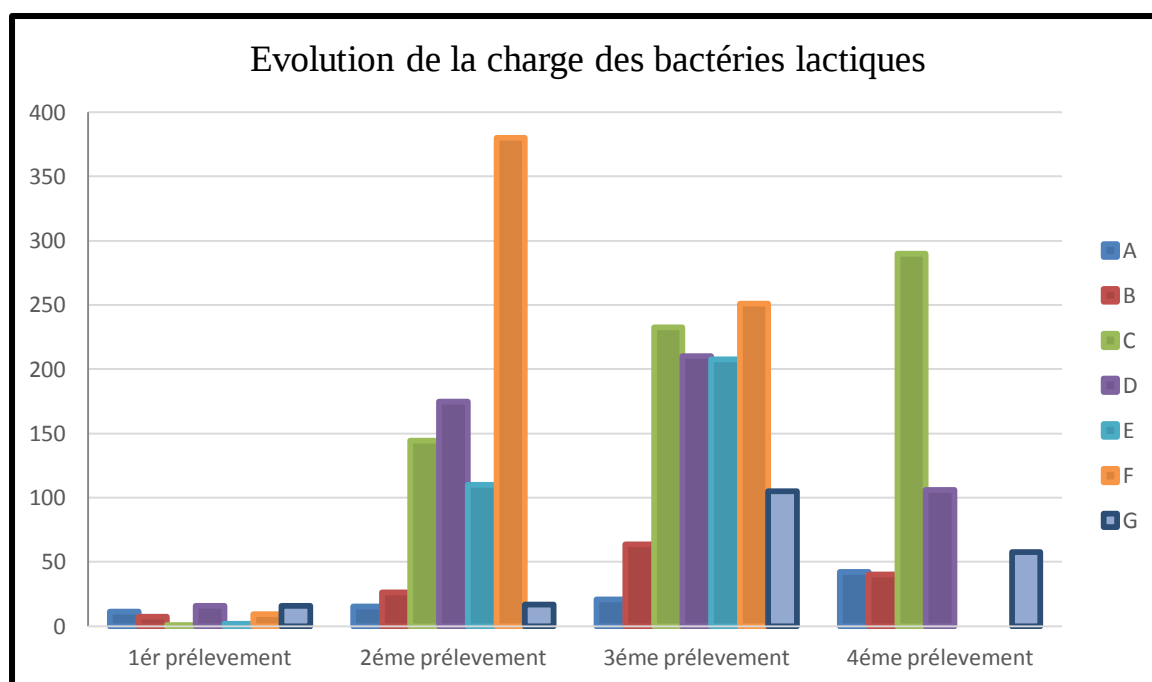
Figure 33: Evolution de la charge des entérobactéries

Le tube digestif est la porte d'entrée de nombreuses infections d'origines diverses (bactéries, virus, parasites) et la flore intestinale joue un rôle important afin de prévenir et de lutter contre ces infections (**Gournier-Château et al., 1994; Hagiage, 1994**).

Au début de l'expérience la charge des entérobactéries est presque nulle au niveau de tous les lots, à partir de la deuxième semaine la charge a évolué pour les lots suivant (A),(B),(G) ce qui nous a fait remarquer que les lots recevant le lait apparaissent avec une charge réduite notamment au niveau du lot recevant probiotiques + prébiotiques au cours du troisième échantillonnage avec une charge de 6.35×10^6 ufc/ml nos résultats sont en accord avec ceux de (**Amara, 2012**) qui a pu évaluer que l'apport probiotique + prébiotiques exerce une régulation bien marquée du taux d'entérobactéries intestinales.

Les probiotiques sont reconnus pour leur rôle dans le maintien de l'équilibre de la flore intestinale (**Bergmark, 1998; Fooks et Gibson, 2002; Gournier-Château et al., 1994**). Et c'est par leur effet de modulation sur cette flore qu'ils permettent de prévenir ou de traiter de nombreuses infections intestinales (**Gournier-Château et al., 1994**). Cette propriété des probiotiques à contrer des infections au niveau de l'intestin demeure l'effet le plus documenté *In vitro* et *in vivo* attribué à ces bactéries.

✓ Evolution de la flore lactique totale :

**Figure34** : Evolution de la charge des bactéries lactiques

Le taux des bactéries lactiques a évolué progressivement avec une valeur importante qui a atteint 380×10^6 ufc/ml on peut dire que la charge en BL est élevée au niveau des lots recevant le lait fermenté tout au long de l'expérience.

A la fin de l'expérience le lot le plus représentatif de la charge en BL c'est bien le lot (C) par rapport aux autres lots qui peut se traduire par l'apport des cultures mixtes + prébiotiques qui a enrichi le tube digestif BL. Nos résultats coïncident avec ceux de **Idoui(2008)**, **Amara (2012)**, **Bechaib et al.,(2015)** qui ont constaté que l'évolution de la charge lactique est inversement proportionnelle au nombre des entérobactéries. La consommation de symbiotiques (probiotiques+FOS) participent à une bonne implantation des lactobacilles et augmentent l'acidité de la lumière intestinale. La capacité d'adhérence des probiotiques à l'épithélium digestif, peut être étudiée, *in vitro*, avec des lignées cellulaires. L'implantation des germes indésirables pourrait être également empêchée, par des probiotiques et par la consommation des nutriments nécessaires au développement des souches pathogènes (**Bergonzelli et al., 2005; Marteau et al., 2002; Sartor, 2004**).

La flore lactique joue le rôle de « barrière » qui se met en place avant la maturité complète du système immunitaire du tube digestif. Ainsi les lactobacilles excluent les coliformes chez les animaux gnotobiotique (**Fuller, 1977**).

✓ La flore pathogène :

Consiste à dénombrer sur milieu SS des salmonelles, des shiegelles et des staphylocoques dans les selles des rats, son évolution au cours de la période d'étude est montrée dans la **figure 33**

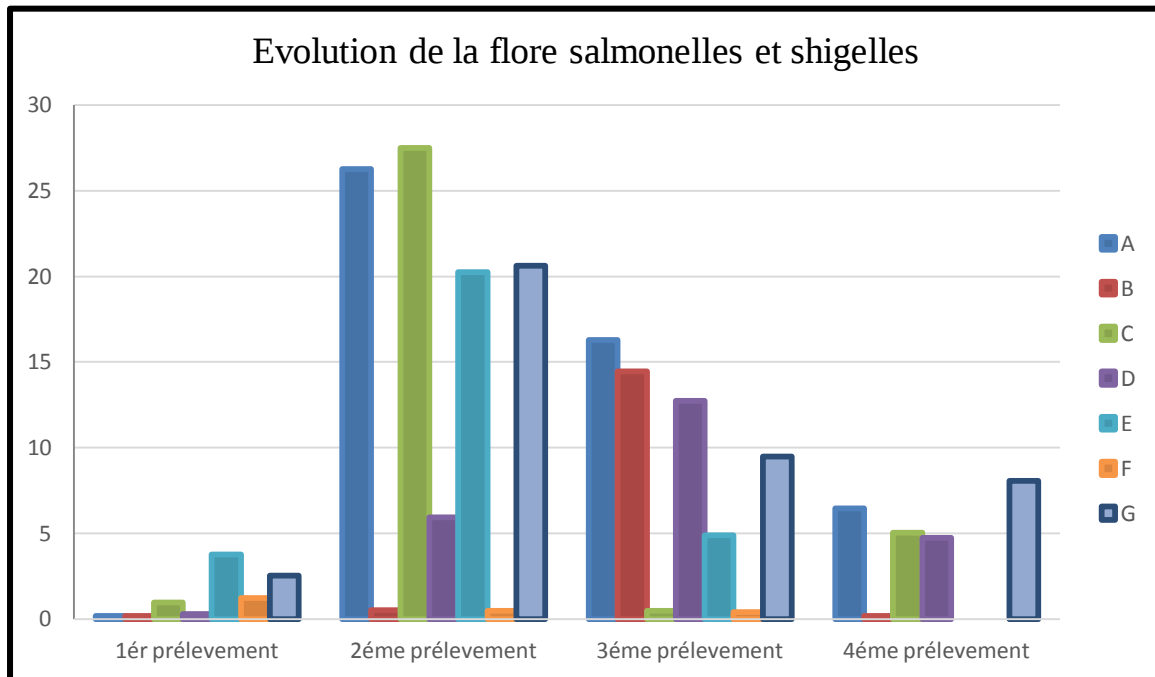


Figure 35: évolution de la charge en salmonelles et Shigelles dans les selles des rats

Au début de l'expérimentation la charge bactérienne en salmonelles et shigelles est presque nulle jusqu'au 2^{ème} prélèvement ou on a remarqué des valeurs considérables au niveau du lot (A) témoin négatif ainsi qu'une valeur élevée au niveau du lot (C) qui peut atteindre 27.50×10^6 ufc/ml qui est traduit par l'apparition des diarrhées intenses pour les individus du lot des lots mentionnés.

Au cours de la 3^{ème} collecte une diminution progressive de la charge des salmonelles et shigelles est due à une prise en charge des soins hygiéniques (nettoyage des cages et des rats, nettoyage quotidien des biberons) ainsi qu'une chute remarquable de cette charge dans les selles du lot (C) le lot infecté on peut l'expliquer par la capacité des cultures mixtes (probiotiques+ prébiotiques) à réduire les diarrhées provoquées par ces deux bactéries, Les souches probiotiques *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*, qu'on retrouve entre autre dans le lait fermenté, ont fait l'objet d'études montrant leur efficacité contre la diarrhée hospitalier (Penner et al., 2005).

La charge bactérienne diminue progressivement jusqu'à la fin de l'expérimentation notamment dans les selles des lots recevant les cultures mixtes + prébiotiques ce qui nous confirme que nos souches ont une activité inhibitrice par l'abaissement du pH au niveau du tube digestif plus précisément au niveau du colon qui est le lieu de fermentation des FOS par les bactéries lactiques résidentes dans le colon.

✓ **Evolution de la charge des staphylocoques :**

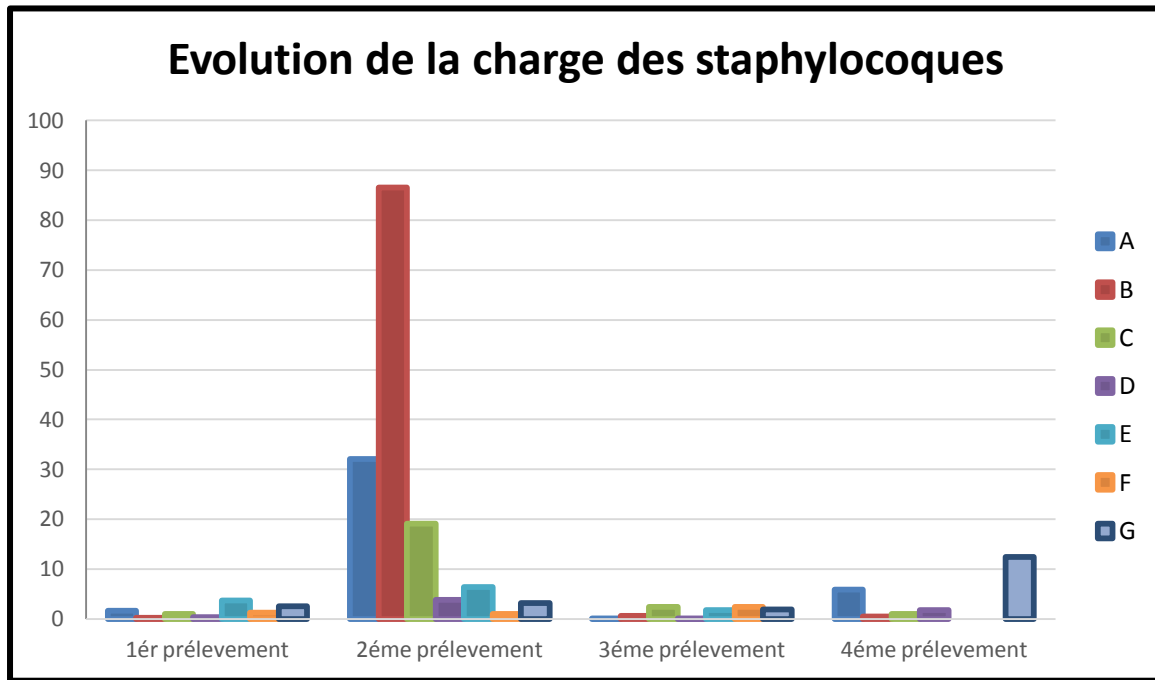


Figure 36: Evolution de la charge des staphylocoques

Lors du 1er échantillonnage on a remarqué une charge faible des staphylocoques dans les selles de l'ensemble des lots.

Au cours de la 2ème collecte la charge bactérienne a augmenté progressivement pour tous les lots avec une charge très importante au niveau du lot (B) 86.50×10^6 ufc/ml cela est causé par l'apparition d'une infection urinaire traduite par des rougeurs au niveau des parties génitales des rats due à une contamination survenue dans l'animalerie. Par un mode de transmission qui s'est fait principalement par la voie oro-fécale, ces entéropathogènes sont capables d'envahir le tractus intestinal pour s'y multiplier et causer principalement des symptômes typiques en causant une altération de l'état de santé (Steer et al., 2000). Y compris le lot (A) témoin négatif qui présente 32.15×10^6 ufc/m.

Le taux des staphylocoques commence à diminuer progressivement aux niveaux des lots recevant les cultures mixtes avec $(19.1, 3.80, 6.35) \times 10^6$ ufc/ml qu'on peut traduire par l'effet des probiotiques pour éliminer les bactéries indésirables après qu'elles atteignent une certaine concentration on remarque une valeur plus basse au niveau du lot (D) par rapport au lot (C) cela est dû à la nature du régime administré (les cellules et non pas le lait fermenté) qui ont un effet plus efficace. Nos résultats coïncident très bien avec les travaux de **(Daeschl, 1989)** qui a pu démontrer que Certaines souches probiotiques pourraient aussi agir en inhibant l'implantation des germes pathogènes par compétition pour la colonisation, l'adhésion des bactéries probiotiques aux cellules intestinales permettrait une colonisation rapide est dirigée du tube digestif, par exemple chez le porc l'adhésion des souches probiotiques de *Lactobacillus* aux villosités de l'intestin grêle inhiberait la fixation de *E.coli* entéro pathogène.

Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence au tube digestif. Deux études récentes ont montré que des souches adhérentes de *L.plantarum* et *L.rhamnosus* pouvaient coloniser de manière prolongée une partie du tube digestif. L'implantation des germes indésirables pourrait également être empêchée par une inhibition compétitive des souches probiotiques par consommation des nutriments à la place des souches pathogènes.

Les valeurs restent constantes tout le long de l'expérimentation avec une chute au niveau du lot (B) qui est due à l'effet de leurs propres flores commensales (autochtone) qui a pu diminuer la charge des staphylocoques ainsi à la fin de l'expérimentation on remarque une évolution bactérienne au niveau du lot (G) qui est atteint d'une infection urinaire comme celle du lot (B) .ainsi, on remarque que pour les lots : (E) et (F) recevant les cultures mixtes commercialisées et les cultures mixtes de notre collection respectivement qu'elles auraient une remarquable efficacité dans la lutte contre les infections.

Tel que souligné par **Servin et al. (2004)**, il apparaît de plus en plus évident que les bactéries appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* possèdent des activités antimicrobiennes qui participent au système de défense gastro intestinal de l'hôte. Il est ainsi intéressant d'améliorer la composition du microbiote intestinal par les aliments en apportant des bactéries transitoires. Le but étant d'augmenter le nombre et l'activité des microorganismes possédant des propriétés bénéfiques à la santé, mais bien que ce système antagoniste possède un large spectre d'action, *in-vitro*, il existe peu de preuves sur son efficacité. Les souches probiotiques pourraient également réprimer la croissance des bactéries pathogènes par la production de substances antimicrobiennes de type bactériocine capables d'inhiber les germes fréquemment responsables d'infections **(Bael, 1977)**. Certaines souches

utilisées comme probiotiques possèdent la capacité de déconjuguer les sels biliaires: les formes déconjuguées ont un pouvoir inhibiteur plus important sur le développement des bactéries que les formes conjuguées. La 7 -déshydroxylase bactérienne est l'enzyme clé de la transformation des acides biliaires primaires en secondaires. Le pH module son activité et un milieu acide l'inactive.

III .3. La dissection des rats :

Tableau 14: la moyenne des différents organes pour chaque lot

Lot	A	B	C	D	E	F	G
Organes							
Cœur	0.37	0.35	0.37	0.33	0.51	0.28	0.39
Foie	5.37	3.75	3.03	3.38	4.09	3.85	4.80
Tube digestif	12.45	12.52	9.52	10.06	12.36	10.01	12.19

D'après les résultats obtenus on a remarqué que les intestins des lots (B) et (G) semblent avoir un poids relativement proche, cela est probablement dû à la consommation du régime hyper lipidique sans supplément symbiotique et à l'incapacité de la flore commensale à réduire les lipides consommés, alors que pour les autres lots notamment le lot (C) la teneur en matière grasse autour des intestins est moindre comme cela est exposé dans la figure ci-dessus :



Figure 37: comparaison de l'intestin des lots B ,G , C



Figure38 : foies des rats.

A : un foie normal

B : un foie atteint.

Conclusion et perspectives
Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Parmi les additifs alimentaires susceptibles de remplacer l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance, en prophylaxie ou pour la prévention des maladies, les probiotiques suscitent beaucoup d'intérêt.

Dans notre travail nous nous sommes intéressés à des souches lactobacilles qui pourraient être, par excellence, de bons Candidats probiotiques du fait qu'ils sont des composants normaux et bénéfiques du microbiote intestinal humain et en vue de leur longue histoire d'utilisation comme Microorganismes « sur » dans l'industrie alimentaire.

Cette approche est effectuée en suivant les étapes suivantes :

- Purifications et identification phénotypique des cinq souches par les tests usuels : Gram, catalase, résistance à une gamme d'antibiotiques ainsi que la recherche d'un pouvoir inhibiteur des souches pathogènes indicatrices en milieu solide et en milieu liquide vis-à-vis de *Candida albicans* et *Listeria monocytogenes*.

L'évaluation des aptitudes probiotiques a conduit donc à une sélection de deux souches de lactobacilles à haut profil probiotique via l'ensemble des critères testés. En outre, leur aspect sécuritaire semble intéressant. L'identification de la souche NSC5c au taxon *Lactobacillus plantarum*, comme recommandé pour les nouvelles souches probiotiques.

Il devait être important de confirmer la capacité de ces souches, pour ce faire des tests *in vivo* ont été réalisés sur un modèle animal bien représentatif (les rats Wistar)

- Il a été mis en évidence, en faveur du lot expérimental une différence pour l'évolution pondérale des rats aussi bien en croissance qu'en finition.
- les rats des lots expérimentaux ont présenté un GPM et un I.C. améliorés par rapport aux témoins.
- L'étude biochimique des paramètres sanguins révèle cependant que les rats sous pro et prébiotiques ont une cholestérolémie et une triglycéridémie nettement plus basse que ceux des autres lots y compris le lot recevant les souches commercialisées françaises additionnées de prébiotiques tout au long de l'expérimentation.
- Le dosage de la bilirubine a également montré des valeurs plus basses chez les animaux supplémentés de probiotiques issus de lait de chamelle combinés aux FOS

Conclusion et perspectives

par rapport aux autres lots traduisant un effet hépato-protecteur des souches autochtones.

L'objectif de ces probiotiques étant de donner un soutien immunitaire, une barrière de défense contre des agents pathogènes, et une aide pour la flore intestinale locale.

Finalement il serait intéressant aussi de réaliser les points suivant afin que notre travail soit valorisé

- ❖ Une étude approfondie sur l'ensemble des caractéristiques probiotiques des souches.
- ❖ Proposer des cultures mixtes de différentes espèces bactériennes comme par exemple une combinaison entre les lactobacilles et les bifidobactéries.
- ❖ Une prolongation de la période d'expérimentation pour de meilleurs résultats afin d'évaluer l'effet des probiotiques à long terme.
- ❖ Tester ces microorganismes sur des sujets humains.

Annexe
Annexe

Annexe 1 : composition des Milieux Culture

Milieu MRS :

Peptone	10g
Extrait de viande	8.0g
Extrait de levure	4.0g
Glucose	20g
Acétate de sodium trihydraté	5.0g
Citrate d'ammonium	2.0g
Tween80	1.0ml
Hydrogénophosphate de potassium	2.0g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0.2g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0.05g
Agar	17g

PH= 6.2 ,autoclavage 120°C/20min,QSP 1L

Milieu LB (lysogeny broth) :

Peptone	10g
Extrait de levure	5.0g
NaCl	10g

Milieu GN :

Extrait de viande	1.0g
Extrait de levure	2.5g
Peptone	5.0g
Chlorure de sodium	5.0g
Agar	15g

PH=7.0

Milieu SS :

Bio-polytone	5.0g
Extrait de viande de bœuf	5.0g
Lactose	10g
Citrate de sodium	8.5g
Thiosulfate de sodium	8.5g
Citrate ferrique	1g
Sels biliaries	8.5g
Vert brillant	0.33mg
Rouge neutre	0.025mg
Agar	13.5g

Milieu chapman :

Peptone	10g
Extrait de viande de bœuf	1.0g
NaCl	75g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	0.025g
Agar	15g
PH=7.4	

Milieu bleu de bromothymol lactose-agar

Peptone	15g
Extrait de viande	3.0g
Extrait de levure	3.0g
Désoxycholate de sodium	1g
Thiosulfate de sodium	1g
Lactose	15g
Cristal violet	0.05g
Bleu de bromothymol	0.8g

Agar	11g
------	-----

Annexe 2 : coloration de Gram

Les colorants :

Violet de gentiane au cristal :

Violet de gentiane	10g
Phénol	20g
Ethanol à 0.95	10cm ³
Eau distillée	1dm ³

Lugol :

Iode	5g
Iodure de potassium	10g
Eau distillée qsp	01g

Fushine de Ziehl :

Fushine bosique	10g
Phénol	50g
Ethanol à 0.5	10cm ³
Eau destilée	01dm

Coloratio de Gram :

Technique :

✓ La première étape consiste une suspension en eau distillée partir d'une culture jeune sur un milieu solide et prélever un aliquote par l'anse de platine puis on étale 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame

✓ La deuxième étape nécessite le séchage et la fixation par la chaleur pour faire adhérer les cellules bactériennes

✓ La troisième étape nécessite l'ajout de quelques gouttes de violet de gentiane sur le frottis fixé on ajoute par la suite le Lugol (mordançage) pendant 30 secondes après avoir entamé un rinçage abondant

✓ La quatrième étape consiste à décolorer le frottis à l'aide de l'alcool puis on effectue un rinçage abondant à l'eau distillée.

Annexe

En fin quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir 30sec la lame est lavée à l'eau distillée, après séchage on passe à l'observation microscopique.

Annexe 3 : Paramètres de croissance

Gain de poids :

Lot	S2-S1	S3-S2	S4-S3	S5-S4	S6-S5	S7-S6	S8-S7
A	25.5	24	8.66	6.66	18.66	17.83	-11
B	19.16	15.66	19.66	15.16	12.33	8.66	-93.75
C	18.66	23.16	24.66	2.66	4.16	0.5	8.83
D	19.33	11.16	29.66	5.66	13.5	10.33	13.83
E	20	18	22.83	8.5	17.33	1.6	-26.6
F	21	16	26.66	18.5	11.16	1.6	-25.2
G	14.66	14.66	33	11.66	4.5	0.33	-9.4

Indice de consommation :

Lots	S2-S1	S3-S2	S4-S3	S5-S4	S6-S5	S7-S6	S8-S7
A	38.43	40.83	113.16	147.14	52.51	54.96	-89.09
B	49.84	62.57	49.84	64.64	79.48	113.16	-10.45
C	48.20	52.97	39.74	368.42	235.57	1960	110.98
D	50.63	87.81	33.04	173.14	54.44	168.09	70.86
E	49	42.92	42.92	115.29	56.54	612.5	-36.84
F	46.66	61.25	36.75	52.97	87.81	612.5	-38.88
G	66.84	66.84	29.69	84.04	217.77	2450	-104.25

Le poids vif moyen ;

Lot	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
A	55.5	81	105	113.66	120.33	89	156.83	171
B	80.33	100	115.66	135.33	150.5	162.83	171.5	113.5
C	74	97.33	115.83	140.5	143.16	147.33	147.83	156.66
D	72	91.33	102.5	132.16	137.83	155.83	161.66	175.5
E	72.33	92.33	110.33	133.16	141.66	159	1599.6	165.8
F	69.33	90.33	106.33	133	151.5	162.66	163.8	171.6
G	85.66	100.33	115	148	159.66	164.16	166.2	188

Annexe 4 : Paramètres biochimiques

Glycémie :

Lot	S1	S3 (1mois)	S4(1 mois et 15 jours)	S5 (2mois)
A	0.34	0.44	0.50	0.518
B	0.45	0.48	0.52	0.59
C	0.41	0.43	0.510	0.606
D	0.25	0.32	0.506	0.503
E	0.32	0.46	0.558	0.546
F	0.45	0.46	0.558	0.562
G	0.59	0.65	0.563	0.50

Cholestérol :

Lots	S1	S4	S6	S8
A	0.23	0.31	0.351	0.353
B	0.27	0.67	0.698	0.810
C	0.25	0.53	0.495	0.443
D	0.38	0.43	0.506	0.473
E	0.32	0.54	0.531	0.480
F	0.22	0.53	0.6	0.552
G	0.29	0.68	0.658	0.762

Triglycéride :

Lots	S1	S4	S6	S8
A	0.22	0.35	0.406	0.411
B	0.21	0.73	0.808	0.797
C	0.22	0.53	0.503	0.426
D	0.29	0.57	0.621	0.526
E	0.25	0.55	0.560	0.550
F	0.18	0.57	0.628	0.554
G	0.20	0.58	0.641	0.682

La bilirubine :

Lots	Moyenne mg/l
A	0.25
B	0.90
C	0.24
D	0.28
E	0.311
F	0.31
G	0.76

Annexe 5 : les tableaux d'antibiotiques des souches

BH14 :

Numéro	R/S	Zone d'inhibition	Numéro	R/S	Zone d'inhibition
01	Sensible	31mm	17	Resistante	/
02	Sensible	8mm	18	Sensible	15mm
03	Sensible	10mm	19	Sensible	10mm
04	Sensible	10mm	20	Resistante	/
05	Sensible	18mm	21	Resistante	/
06	Sensible	32mm	22	Resistante	/
07	Sensible	24mm	23	sensible	12mm
08	Sensible	23mm	24	Resistante	/
09	Sensible	16mm	25	Resistante	/
10	Sensible	24mm	26	Resistante	/
11	Résistante	/	27	Sensible	32mm
12	Résistante	/	28	Résistante	/
13	Sensible	19mm	29	Résistante	/
14	Sensible	27mm	30	Sensible	16mm
15	Sensible	32mm	31	Sensible	25mm
16	sensible	13mm	32	Sensible	13mm

8 :

Numéro	R/S	Zone d'inhibition	Numéro	R/S	Zone d'inhibition
01	Sensible	27mm	17	Résistante	/
02	Sensible	16mm	18	Sensible	17mm
03	Sensible	20mm	19	Résistante	/
04	Sensible	15mm	20	Sensible	26mm
05	Résistante	/	21	Sensible	27mm
06	Sensible	19mm	22	Résistante	/
07	Sensible	18mm	23	Résistante	/
08	Sensible	29mm	24	Résistante	/
09	Sensible	27mm	25	Résistante	/
10	Sensible	15mm	26	Résistante	/
11	Résistante	/	27	Résistante	/
12	Résistante	/	28	Résistante	/
13	Résistante	/	29	Résistante	/
14	Sensible	24mm	30	Sensible	22mm
15	Sensible	28mm	31	Sensible	20mm
16	Résistante	/	32	Sensible	23mm

Annexe

46 :

Numéro	R/S	Zone d'inhibition	Numéro	R/S	Zone d'inhibition
01	Sensible	15mm	17	Sensible	17mm
02	Sensible	26mm	18	Résistante	/
03	Sensible	14mm	19	Sensible	27mm
04	Sensible	12mm	20	Résistante	/
05	Sensible	22mm	21	Résistante	/
06	Sensible	32mm	22	Résistante	/
07	Sensible	20mm	23	Résistante	/
08	Sensible	26mm	24	Résistante	/
09	Sensible	26mm	25	Résistante	/
10	Sensible	15mm	26	Résistante	/
11	Sensible	8mm	27	Sensible	11mm
12	Résistante	/	28	Résistante	/
13	Sensible	27mm	29	Résistante	/
14	Sensible	13mm	30	Sensible	15mm
15	Sensible	15mm	31	Sensible	23mm
16	Résistante	/	32	Sensible	21mm

55 :

Numéro	R/S	Zone d'inhibition	Numéro	R/S	Zone d'inhibition
01	Sensible	46mm	17	Résistante	/
02	Sensible	18mm	18	Sensible	22mm
03	Résistante	/	19	Sensible	18mm
04	Résistante	/	20	Résistante	/
05	Sensible	15mm	21	Résistante	/
06	Sensible	25mm	22	Résistante	/
07	Sensible	36mm	23	Résistante	/
08	Sensible	26mm	24	Résistante	/
09	Sensible	17mm	25	Résistante	/
10	Résistante	/	26	Résistante	/
11	Résistante	/	27	Sensible	32mm
12	Sensible	40mm	28	Résistante	/
13	Sensible	18mm	29	Résistante	/
14	Résistante	/	30	Sensible	15mm
15	Sensible	24mm	31	Sensible	25mm
16	Sensible	15mm	32	Sensible	26mm

Annexe 6 :

- **tableau de dénombrement de la flore fécale**

CHTD27 :

Numéro	R/S	Zone d'inhibition	Numéro	R/S	Zone d'inhibition
01	Sensible	50mm	17	Sensible	14mm
02	Sensible	32mm	18	Resistante	/
03	Sensible	37mm	19	Sensible	42mm
04	Résistante	/	20	Resistante	/
05	Sensible	25mm	21	Resistante	/
06	Sensible	32mm	22	Sensible	13mm
07	Sensible	26mm	23	Résistante	/
08	Sensible	40mm	24	Sensible	12mm
09	Resistante	/	25	Resistante	/
10	Sensible	24mm	26	Resistante	/
11	Sensible	17mm	27	Sensible	18mm
12	Resistante	/	28	Resistante	/
13	Resistante	/	29	Resistante	/
14	Sensible	14mm	30	Resistante	/
15	Sensible	18mm	31	Sensible	27mm
16	Resistante	/	32	Resistante	/

Le dénomremenet de la flore de la matière fécale :

Ufc/ml= nbre de colonies par boitex1/v.1/d (Guiraud,2003)

V :etant le volume d'ensemencement.

D :la dilution prise en compte.

- **la composition de la galerie API50**

La galerie API 50CH :

Tube	Test	Composant actifs	Tube	Test	Composant actifs
0		Témoin	10	GAL	D-Galactose
1	GLY	Glycerol	11	GLU	D-Glucose
2	ERY	Erythritol	12	FRU	D-Fructose
3	DARA	D-arabinose	13	MNE	D-Manose
4	LARA	L-arabinose	14	SBE	L-Sorbose
5	RIB	D-ribose	15	RHA	L-Rhamnose
6	DXYL	D-xylose	16	DUL	Dulcitol
7	LXYL	L-xylose	17	INO	Inositol
8	ADO	Adonitole	18	MAN	D-Manitol
9	MDX	Methyl-BD-Xylopiranoside	19	SOR	D-Sorbitol

Tube	Test	Composant actifs	Tube	Test	Composant actifs
20	MDM	Methyl- α D-Manopyranoside	30	MEL	D-Melibiose
21	MDG	Methyl- α D-Glucopyranoside	31	SAC	D-Saccharose
22	NAG	N-acetylglucosamine	32	TRE	D-Trinalose
23	AMY	Amygdaline	33	INU	Inuline
24	ARB	Arbutine	34	MLZ	D-Melestose
25	ESC	Esculine citrate de fer	35	RAF	D-Rafinose
26	SAL	Salcine	36	AMD	Amidon
27	CEL	D-Celiobiose	37	GLYG	Glycogene
28	MAL	D-Maltose	38	XLT	Xylitone
29	LAC	D-Lactose (origine bovine)	39	GEN	Gentiobiose

Tube	Test	Composant actifs
40	TRU	D-Turanose
41	LYX	D-Luxose
42	TAG	D-Tagatose
43	DFUC	D- Fucose
44	LFUC	L-Fucose
45	DARL	D-Arabitol
46	LARL	L-Arabitol
47	GNT	Potassium Gluconate
48	2KG	Potassium-2 CleGluconate
49	5KG	Potassium-5 CeliGluconate

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Adams et Moss., (2000).** Affecting its composition*.J Pathol Bacteriol 89 : 95-122.
- **Amara .(2012).** effets probiotiques des bactéries lactiques sur le poulet de chair.
- **Ammor M.S., Florez A. B. and Baltasar M. (2007).** Antibiotic resistance in non enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Journal of Food Microbiology24:559–570
- **Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., and Chevallier, I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 2-Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria .Food Control, 17,462-468
- **Anonyme(2008).**www.ebabylone.com/encyclopedia_Image:Bifidobacterium_adolescentis_Gram.jpg.
- **Axelsson L. (2004).** Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.).3eEd.,Marcel Dekker, IncNew York.1-66.

B

- **Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R.. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». Sciences & Technologie N°23. Pp :30-37.
- **Brahimi (2015).** Isolement et caractérisation biotechnologique des bactéries lactiques isolées à partir de margarines d’olive “AMOREDJ” fermentés
- **Bekhouche F. (2006) .** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes (1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d’enzyme polygalacturonase).Thèse de doctorat. Université De Mentouri Constantine.
- **Bekhouche F. et Boulahrouf M. (2005).** Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant a six stations d’élevage de Constantine. Sciences & Technologie C – N°23, 38-45.

Références bibliographiques

- **Belyagoubi1, 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.
- **Bernalier A., Rochet V., Leclerc M., Doré J., Pochart P. (1996).** Diversity of H₂/CO₂-utilizing acetogenic bacteria from feces of non-methane-producing humans. *Curr. Microbiol.*, , 33, 94-9.
- **Bernet MF., Coconnier MH., Kerneis S., Chauviere G., Fourniat J. and Servin AL. (1993).** Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol Lett*. 110: 299 - 305.
- **Bernet MF., Brassart D., Neeser JR. and Servin AL. (1994).** *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cells and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*. 35: 483 -489.
- **Biavati B., Vescovo M., Torriani S. and Bottazzi V. (2000).** Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.*,50: 117–131.
- **Borriello S.P., Hammes W.P., Holzapfel W., Marteau P., Schrezenmeir J., Vaara M. and Valtonen V. (2003).** Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin Infect Dis*. 36: 775 -780.

C

- **Carmen-Collado M. and Hernandez M. (2007).** Identification and differentiation of *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* species in fermented milk products with bifidobacteria. *Microbiol. Res.*, 162: 86-92
- **CARR F.J., HILL D, MAIDA N . (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit.Rev.Microbiol*. 28,281-370
- **-Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. (1998).** Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food. Prot*. 61: 1636–1643.
- **Christl S.U., Murgatroyd P.R., Gibson G.R., Cummings J.H. (1992).** Production, metabolism and excretion of H₂ in the large intestine. *Gastroenterology*, 1992, 102, 1269-1277.

Références bibliographiques

- **Cibik R , F. Marcille, G. Corthier, and J. Dore. (2004).** “La flore intestinale : mise en place, description et influence du mode d’alimentation,” Arch. Pédiatrie, vol. 11, no. 6, pp. 573–575, Jun. 2004
- **Coconnier MH., Bernet MF., Kerneis S., Chauviere G., Fourniat J. and Servin AL. (1993).** Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by Lactobacillus acidophilus strain LB decreases bacterial invasion. FEMS Microbiol Lett. 110: 299 - 305.
- **Collins EB., Hall BJ. (1984).** Growth of bifidobacteria milk and preparation of Bifidobacterium infantis for a dietary adjunct. Journal of Dairy Sciences 67(7):1376– 80.
- **Coppola R., Succi M., Tremonte P., Reale A., Salzano G. and Sorrentino E. (2005).** Antibiotic susceptibility of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. Lait 85, 193 –204.
- **Corthier G. (2007).** Le microbiote : un monde polymorphe aux fonctions multiples. Cah Nutr Diététique. Avr2007;42:21.
- **Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.(2005).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology 3, 777 – 788
- **Cummings J.H., Macfarlane G.T.(1991).** The control and consequence of bacterial fermentation in the human colon. J. Appl. Bacteriol., 1991, 70, 443-59

D

- **Danielsen M. and Wind A. (2003).** Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. Int. J. Food Microbiol. 82, 1–11
- **De Vos P, Garritty GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, 108 Whitmanet WB. (2009).** Genus Lactobacillus, Bacillus and Listeria. In: « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » Vol 3. Springer éd., New York. pp.19-511
- **de Vrese M., Schrezenmeir J. (2001).** Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. American Journal of Clinical Nutrition, 73, 361-364.

Références bibliographiques

- **Delgado, S., Florez, A.B., Mayo, B. (2005).** Antibiotic susceptibility of Lactobacillus and Bifidobacterium species from the human gastrointestinal tract. Curr. Microbiol. 50, 202–207.
- **Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C.et Janssens D. (1994).** Caractéristiques générale des bactéries lactiques in « Bactérielactique », de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.
- **Djellouli, M. (2010).** Caractérisation technologique de souches de lactobacilles isolées de lait camelin. Etude de leur activité protéolytique dans le lait. Mémoire de Magister en Biotechnologie, Université d'Oran, Algérie
- **Dong X., Xin Y., Jian W., Liu X. and Ling D. (2000).** Bifidobacterium thermacidophilum sp. nov., isolated from an anaerobic digester. Int .J. Syst. Evol. Microbiol., 50 119-125.
- **Duchuzeau,R, (1969).** [influence of the Zoological species on the microflora of the gastro intestinal tract]. Rev Immunol Ther Antimicrob 33(6) :345-83.
- **Duobos , R . , R. W . Schaedler . (1963).** * composition alteration , and Effect of the intestinal Flora , *Fed Proc 22 :1322-9

E

- **Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N. (2005).** Diversity of the human intestinal microbial flora. Science, , 308, 1635-8

F

- **FAO/WHO. (2002).** Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. In Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, pp.1-11
- **Felten A. (1998).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria. Food Microbiol. 55: 203 -210.
- **Fooks L.J and Gibson G.R. (2002).** Probiotics as modulators of the gut flora. Br J Nutr. 88: S39-S49.

Références bibliographiques

- **Frank AMK., Kegma F, et Weerkamp HA. (1993).** Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Neth. Milk. Dairy.J.* 47: 151-164
- **Fuller. R. (1989).** Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365 378

G

- **Gancel F., Dzierszinski F. and Taillez R. (1997).** Identification et caractérisation d'espèces de *Lactobacillus* isolés de filets de hareng (*Clupea harengus*) fumés et salés, emballés sous vide *Journal of Applied Microbiology*. N° 82, p. 722-728.
- **Gérard P.. (2011).** Nutrithérapie, Le microbiote intestinal : composition et fonctions. *Phytothérapie* 9: 72–75
- **Gibson G.R& Robdrfroid MB. (1995).** Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.*; 125:1401-12
- **Goulet O. (2009).** La flore intestinale : un monde vivant à préserver. *J Pédiatrie Puériculture*. mai [5];22(3):102-
- **Grangette C.. (2011).** Nutrithérapie Probiotiques et régulation de la réponse immunitaire : impact sur les maladies allergiques et les maladies inflammatoires intestinales. *Phytothérapie* 9: 93–99.
- **Gratia A. (1946).** Techniques selectives pour la recherche systématique des germes antibiotiques *S R SCI. SOc.Bio.Paris.*140, 1053-1055.
- **Guiraud J.-P. (2003)** .Microbiologie alimentaire. Dunod – RIA., 696.

H

- **-Haller D, Colbus H, Ganzle MG, Scherenbacher P, Bode C, Hammes WP. (2001).** Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: A comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Syst. Appl. Microbiol.* 24:218-226.
- **Haydersah J. (2010).** Étude de la fermentation lactique de plantes amylacées tropicales Potentiel des bacteries lactiques amylolytiques. Thèse de doctorat .Université des Antilles et de la Guyane.

Références bibliographiques

- **Heyman M & Henvelin E. Probiotics . (2006).** microorganisms and immune regulation the paradox.Nutr.Clin Mét, 20(2): 85-94.
- **Heyman M. and Menard S. (2002).** Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. Cell Mol Life Sci. 59: 1151-1165.
- **Hidaka,H,Eida,T.,Takizawa,T.,Tokunaga,T.,andTashiro,Y. (1986).** Effectoffructooligosaccharides on intestinal flora and humain health.Bifidobacteria Microflora 5,37-50
- **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.

I

- **Idoui T. and Karam N-E. (2008).** Lactic acid bacteria from Jijel's. traditional butter : Isolation, identification and major technological traits, Grasasy y Aceites, 59 (4).
- **ISOLAURI E. KALLIOMAKI M., SALMINEN S., ARVILOMMI H., KERO P., KOSKINEN P. (2001).** Probioticsin primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial.Lancet,vol.357, p.1076-1079.
- **Izquierdo Alegre E.(2009).** Les proteines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg.

J

- **Jin L.Z.,Ho Y.W.,Abdollahi N., Jalaludin S. (1998).** “Growth performance,intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diet containing lactobacillus cultures”.Poultry Science 77,pp 1259-1265.

K

- **Katla A.K., Kruse H., Johnsen G. and Herikstad H. (2001).** Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int.J. Food Microbiol.* 67, 147–152
- **KIHAL M, PREVOST H., LHOTTE M.E., HUANG D.Q., DIVIÈSC. (1996).** Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *J. Appl. Microbiol.*, 22, 219-223
- **Kirby-Bauer A. (1966).** L'antibiogramme.45 : 493 - 496

L

- **Leahy S.C., Higgins D.G., Fitzgerald G.F. and Van Sinderen D. (2005).** Getting better with bifidobacteria. *J Appl Microbiol* . 98: 1303 -1315
- **Lee YK., Puong KY., Ouwehand AC. And Salminen S. (2003).** Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J Med Microbiol.* 52: 925 -930.
- **Liévin V., Peiffer I., Hudault S., Rochat F., Brassart D., Neeser J.R. and Servin A.L. (2000).** Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut.* 47: 646 -652
- **Lu. (2003).** Macfarlane G.T., Cummings J.H. – The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In: Phillips S.F., Pemberton J.H., Shorter R.G. (ed.). *The large intestine: physiology, pathophysiology and disease*. New York: Raven Press, 1991, 51-92.

M

- **Macfarlane G.T., Gibson G.R. (1994).** Metabolic activities of the normal colonic flora In: Gibson S.A.W. (ed.) *Human Health. The contribution of micro-organisms*. Londres: Springer-Verlag, 1994, 17-52 ;(environ 300 ml/g de substrat fermenté).

Références bibliographiques

- **Mack DR., Michail S., Wei S., McDougall L. and Hollingsworth MA. (1999).** Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol.* 276: G941 -G50.
- **Madigan et Martinko. (2007).** Marchal N., Bourdon J. L. et Richard C.L.. 1991. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin. P. 65-149.
- **Malago J.J., Koninkx J.F.J.G. and Marinsek-Logar J. (2011).** Probiotic Bacteria and Enteric Infections. Cytoprotection by Probiotic Bacteria. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. P: 476
- **Marteau P., Pochart P., Dore J., Bera-Maillet C., Bernalier A., Corthier G. (2002).** Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* ;67:4939-42
- **Marteau P., Pochart P., Dore J., Bera-Maillet C., Bernalier A., Corthier G. (2001).** Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* ;67:4939-42.
- **Matsumoto, M.; H. Ohishi and Y.Benno. (2004).** H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Inter Jour Food Microbiology.* 93: 109–113
- **Miller T.L., Wolin M.J.(1996).** Methanogens in human and animal intestinal tracts. *System. Appl. Microbiol.*, 1986, 7, 223-9.
- **Moroni O.. 2007.** Contribution a l'étude du rôle des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections enteriques à *listeria monocytogenes*: analyse in vitro et étude in vivo des mécanismes d'action antimicrobien. Thèse de doctorat. Université Laval. P :146

O

- **O'Sullivan L., Ross R.P. et Hill C. (2002).** Review: Potential of bacteriocin producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84, 593-604.
- **Ouwehand A. C. ; Salminen S. Et Isolauri E. (2002).** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279-289.

P

- **Penner R., Fedorak R.N. and Madsen K.L. (2005).** Probiotics and nutraceuticals: non medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Current Opinion in Pharmacology* 5: 596-603.
- **Petit V. (2007)** La teneur en lipides du régime affecte les capacités d'absorption intestinale et la triglycéridémie postprandiale contribution du récepteur nucléaire PPARB Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation: 28-35.
- **Petit V., Arnould L., Martin P., Monnot MC., Pineau T., Besnard P., Niot 1. (2007).** Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the rat. *JLipidRes* 48: 278-287.
- **PICARD C., FIORAMONTI J., FRANCOIS A., ROBINSON T., NEANT F.,MATUCHANSKY C. (2005).** Bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther*,vol. 22, p.495-512.
- **Pilet M.F., Magras C. et Federigh M.. (2005).** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.

R

- **Reid G., Sebulsky J. and Mc Cormick J.K. (2003).** Potential uses of probiotics in clinical practice.*Clin Micro- biol Rev* 16,658- 672.
- **Reuter G.,Klein G., Hallmann C., Casas I.A., Abad J and Louwers J. (2000).** Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *J. Appl. Microbiol.* 89, 815–824
- **Roediger W.E.W., Duncan A., Kapaniris O., Milard S. (1993).** Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implication for ulcerative colitis. *Gastro-enterology*, , 104, 802-9.

S

- **Sachdeva A. and Nagpal J. (2009).** Effect of fermented milk-based probiotic preparations on *Helicobacter pylori* eradication: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 21(1):45-53.
- **Salminen, S.A., Ouwehand, A.C. and S. Vesterlund (2004).** Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In *Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* ed. Salminen, S.A., von Wright, A and Ouwehand, A.C. pp.375-395. New York Marcel Dekker.
- **Salminen, S., C. Bouley. (1998).** "Functional food science and gastrointestinal physiology and function." *Br J Nutr* 80 Suppl 1: S147-71.
- **Samelis J., Maurogenakis F., Metaxopoulos J. (1994).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented creak dry Somali. *Int. J. food. Microbio.* 23: 179-196.
- **Sanders M.E. and Huis in't Veld J. (1999).** Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Anton Leeuwen.* 76: 293 -315.
- **Sanders M.E. (2003).** Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev.* 61: 91 99.
- **Savage, D. C. and R.J. Dubos (1967).** *localization of indigenous yeast in the Marine stomach*. *J Bacteriol* 94 (6) : 1811-1816.
- **Scardovi, V. (1986).** Genus *Bifidobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. pp. 1418–1434. Baltimore, MD: Williams and Wilkins
- **Schaedler, R. W. and R. J. Dubos. (1962).** "The fecal flora of various strains of mice. Its bearing on their susceptibility to endotoxin." *J Exp Med* 115: 1149-60.
- **Servin AL. (2004).** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:405-440.
- **SHAH N.P. (2007).** Functional cultures and health benefits. *International Dairy J.* vol. 17, n°11, p.1262-1277.

Références bibliographiques

- **Smith, H.W. (1965).** *observation on the Flora of the alimentary Tract of animals and Factors Affecting its composition*.J Pathol Bacteriol 89 : 95-122.
- **Soulimane-Mokhtari N., Guermoché B., Yessoufou A., Saker M., Moutairou K., Hichami A., Marzouk H., AND Khan N.A. (2005).** Modulation of lipid metabolism by n 3 PUFA in gestational diabetic rat and their macrosomic offspring Clin.Sci. 109:287-295.
- **-Spears , R.W .and R.Freter. (1967).***Improved isolation of anaerobic bacteria from the mouse leucum by maintaining continuous strict anaerobiosis.Proc Soc Exp Biol Med 124(3) : 903-9.
- **Steer T., Carpenter H., Tuohy K. and Gibson G.R. (2000).** Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro - and prebiotics. Nutr Res Rev. 13: 229-254.

T

- **Tabasco R., Paarup T., Janer C., Pelaez C. and Requena T. (2007).** Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. International Dairy Journal .23:250- 255.
- **Tadesse G., Ephraim E.et Ashenafi M. (2004).** Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Borde and Shamita, traditional Ethiopian fermented beverages, on some foodborne pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity.Int. J. Food Safety. 5: 13-20.
- **Tagg J.R., Dajani A.S., Wanamaker L.W. and Gray E.D. (1973).** Group (A) Streptococci bacteriocins. The Journal .of. Experimental.Medecine, Vol11, (138):68- 1183
- **Tailliez P. (2001).** Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. Lait. 81 : 1–11.
- **Tannock G. W. (1997).** Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. Trends in Biotechnology, 15, 270-274.

Références bibliographiques

- **Tong J.L., Ran Z.H., Shen J., Zhang C.X. and Xiao S.D. (2007).** Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 25:155-68.

W

- **Waligora-Dupriet A.J., Rodriguez B. et Butel M.J. (2011).** Nutrithérapie : Probiotiques et prévention de l'allergie : quel intérêt ? *Phytothérapie* 9: 82–92.
- **WGO “World Gastroenterology Organisation”. (2011).** Global Guidelines . Probiotiques et Prébiotiques.
- **Woese, C.R. Stackebrandt,E and Fowler, V.J. (1983).** Aphylogenetic analysis of *Lactobacili.Pediococcus pentosaeus* and *Leuconostoc mesenteroides*.*Systematic and Applied Microbiology*,4,pp :326-337.165.

Z

- **Zhang H. et Cai Y. (2014).** *Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London P: 535.